



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 280**

51 Int. Cl.:

C07K 16/42 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03784106 .1**

96 Fecha de presentación : **28.07.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1581560**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.10.2005**

54

Título: **Anticuerpos antiidiotípicos contra un inhibidor del factor VIII y usos de los mismos.**

30

Prioridad: **31.07.2002 EP 02447150**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.10.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.10.2011

73

Titular/es: **LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS
Onderwijs En Navorsing Campus Gasthuisberg
K.U. Leuven, Herestraat 49
3000 Leuven, BE**

72

Inventor/es: **Gilles, Jean-Guy, G.;
Saint-Remy, Jean-Marie, R. y
Jacquemin, Marc, G.**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 366 280 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos antiidiotípicos contra un inhibidor del factor VIII y usos de los mismos.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para usar en el tratamiento de la hemofilia, especialmente para usar en el tratamiento de pacientes humanos que han desarrollado inhibidores del FVIII dirigidos contra el dominio C2. La presente invención proporciona anticuerpos antiidiotípicos contra los inhibidores del FVIII dirigidos contra el dominio C2. La presente invención se refiere además a líneas celulares monoclonales que expresan dichos anticuerpos antiidiotípicos. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas, que comprenden los anticuerpos antiidiotípicos de la presente invención.

Antecedentes de la invención

La hemofilia A es un trastorno ligado al cromosoma X que se caracteriza por la ausencia o una cantidad insuficiente del factor VIII funcional, una molécula glicoproteica de 330 kD producida por el hígado en forma de una cadena polipeptídica sencilla de 2332 aminoácidos. Esta deficiencia afecta a 1 por cada 10.000 varones y puede dar lugar a una hemorragia incontrolada en articulaciones, músculos y tejidos blandos. Los pacientes afectados por la forma más grave de la enfermedad (Actividad del FVIII menor del 1% del nivel normal) sufren hemorragias espontáneas. Los pacientes con la correspondiente actividad del FVIII de 1 al 5% o superior al 5% se definen como hemofilia A moderada o leve, respectivamente, y sufren hemorragia limitada que se produce tras un traumatismo o una cirugía menores. La vía de la coagulación se puede restablecer mediante la administración de concentrados de FVIII preparados a partir de plasma o producidos mediante tecnología de ADNc recombinante.

El gen humano del FVIII se ha aislado y expresado en células de mamífero, tal como han indicado varios autores, incluidos Wood y col., en *Nature* (1984) 312: 330-337 y la secuencia de aminoácidos se dedujo a partir de ADNc. La patente de EE.UU. nº 4.965.199 divulga un procedimiento de ADN recombinante para producir FVIII en células huésped de mamífero y purificación de FVIII humano. La estructura detallada del FVIII humano se ha investigado extensamente. La secuencia nucleotídica del ADNc que codifica el FVIII humano y la secuencia de aminoácidos predicha se han divulgado en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5663.060. En una molécula de FVIII, un dominio se puede definir como una secuencia continua de aminoácidos que se define por una homología de la secuencia de aminoácidos interna y sitios de escisión proteolítica por una proteasa adecuada como, por ejemplo, la trombina. Se ha descrito que las proteínas de FVIII constan de diferentes dominios que, para la secuencia de aminoácidos humana corresponden a: A1, residuos 1-372; A2, residuos 373-740; B, residuos 741-1648; A3, residuos 1690-2019; C1, residuos 2020-2172; C2, residuos 2173-2332. La secuencia restante, los residuos 1649-1689, normalmente se denominan el péptido de activación de la cadena ligera de FVIII. El FVIII se produce como una cadena polipeptídica sencilla que, tras el procesamiento en el interior de la célula, se escinde rápidamente tras su secreción para formar un heterodímero formado por una cadena pesada que contienen los dominios A1, A2 y 8, y una cadena ligera formada por los dominios A3-C1-C2, de acuerdo con Kaufman y col., (1988, *J Biol Chem* 263:6352-6362). Las dos cadenas están unidas de forma no covalente por cationes divalentes. Tanto el polipéptido monocatenario como el heterodímero circulan en plasma como precursores inactivos, como indican Ganz y col., (1988, *Eur J Biochem* 170:521-528). La activación del factor VIII en plasma inicia la escisión por la trombina entre los dominios A2 y B, que libera el dominio B y tiene como resultado una cadena pesada compuesta por los dominios A1 y A2, de acuerdo con Eaton y col., (1986, *Biochemistry* 25:505-512). El FVIII recombinante humano puede producirse mediante recombinación genética en células de mamífero, tal como células CHO (células de hámster chino), células BHK (células de riñón de hámster neonato) u otras células equivalentes.

Pratt y col., (1999, *Nature* 402:439-42) divulgan la estructura detallada del dominio C2 carboxi-terminal del FVIII humano, que contiene sitios que son esenciales para su unión al factor von Willebrand (vWF) y a superficies de fosfolípidos cargados negativamente. Esta estructura, que revela un núcleo beta-sándwich dos vueltas beta y un bucle exhibe un grupo del disolvente expuesto a residuos hidrofóbicos, explica parcialmente las mutaciones en la región C2 que condujeron a trastornos hemorrágicos en la hemofilia A. De acuerdo con Gale y col., (2000, *Thromb. Haemost.* 83:78-85), de las al menos 250 mutaciones de sentido erróneo que producen deficiencia de FVIII y hemofilia A, 34 en los dominios C.

El FVIII es un cofactor de la vía intrínseca de la cascada de coagulación, que actúa incrementando la actividad proteolítica del factor IX activado sobre el factor X, en la formación del denominado complejo de tenasa. Los pacientes que sufren hemofilia A presentan hemorragias que son espontáneas en las formas más graves de la enfermedad o que se producen tras traumatismos en las formas leves/moderadas.

Los pacientes de hemofilia normalmente son tratadas mediante terapia de sustitución, que consiste en infundir factor FVIII humano, bien purificado de reservas de plasma de donante o bien obtenido mediante tecnología de recombinación de ADNc.

La mayoría de los pacientes no responden inmunológicamente a estas infusiones, peor por motivos que todavía no están claros, en el 25% de ellos se produce una respuesta inmunitaria de tipo IgG frente al FVIII, que puede tener como resultado la inhibición completa de la actividad procoagulación del FVIII infundido (Briet E y col., en (1994)

Throm. Haemost.; 72: 162-164; Ehrenforth S y col., en (1992) *Lancet*; 339:594). Dicha IgG específica, que pertenece a las subclases 1, 2, 4 de IgG, se denomina inhibidores de FVIII. Los estudios publicados han demostrado que la respuesta inmunitaria anti-FVIII es policlonal y dirigida principalmente hacia los dominios A2, A3 y C2 (Scandella D y col., en (1989) *Blood*; 74: 1618-1626.; Gilles JG y col., en (1993) *Blood*; 82: 2452 2461).

5 Estudios recientes que usan anticuerpos monoclonales humanos derivados del repertorio de células B memoria periféricas de pacientes con inhibidores indicaron que epítomos importantes también se localizan en el dominio C1 (Jacquemin M y col., en (2000) *Blood* 95:156-163). El mecanismo por el cual los anticuerpos anti-FVIII interfieren en la función de FVII son numerosos, e incluyen escisión proteolítica del FVIII y la interacción con diferentes parejas, tales como el factor de von Willebrand factor (vWF), fosfolípidos (FL), FIX, FXa o APC. La mayoría de estos
10 mecanismos se describen bien en estudios que usan anticuerpos anti-FVIII de ratón o de ser humano. Por tanto, los anticuerpos pueden reducir la velocidad a la que el FVIII se activa uniéndose a un sitio de escisión proteolítica o induciendo un cambio conformacional 3D en el FVIII de modo que sea menos susceptible a proteólisis. Los anticuerpos que interfieren en la unión de vWF a FVIII parecen ser muy eficientes como inhibidores, como se muestra en estudios recientes usando anticuerpos monoclonales humanos dirigidos hacia el dominio C2, que es uno
15 de los sitios de unión principales del vWF (Jacquemin M y col., en (1998) *Blood*; 92:496501). La supresión de la producción de inhibidores y el establecimiento de un estado de falta de respuesta inmunitaria al FVIII sigue siendo un objetivo principal. No obstante, la comunidad médica está lejos de alcanzar estos objetivos, debido, básicamente, a la limitada comprensión de los mecanismos subyacentes a la producción y regulación de anticuerpos específicos.

20 Actualmente, para controlar dicha respuesta inmunitaria, se usan varios tratamientos, que incluyen agentes de cortocircuito tales como desmopresina (DDAVP), agentes estimulantes de la coagulación, tales como concentrados del complejo de protrombina (PCC) o PCC activado, FVIIa recombinante, plasmaféresis e infusiones de dosis grandes o intermedias de FVIII (200-300 UI/kg de peso corporal o 25-50 UI/kg de peso corporal, respectivamente). No obstante, ninguno de estos procedimientos son satisfactorios y todos ellos son muy costosos.

25 En función de estas observaciones y de la comprensión de los mecanismos de tolerancia inmunitaria, los anticuerpos antiidiotípicos parecen ser un prometedor modo de tratar los inhibidores. De hecho, está bien establecido que la tolerancia a las autoproteínas se induce primero en un estadio precoz mediante delección clonal de células B y células T autorreactivas en la médula ósea y el timo, respectivamente. No obstante, no todos los linfocitos autorreactivos se eliminan mediante delección central. Las células B autorreactivas son una característica común de la sangre periférica, así como células T autorreactivas de afinidad baja o intermedia. Se ha descrito una
30 serie de mecanismos por los cuales dichas células autorreactivas se convierten en no funcionales o se eliminan en la periferia. Los anticuerpos antiidiotípicos pueden representar un tercer nivel de mantenimiento de tolerancia en este esquema general, con su capacidad para ajustar de forma fina la función de los anticuerpos y mantener un sutil equilibrio entre los idiotipos complementarios expresados en las células B y T.

35 Una buena indicación de cómo los anticuerpos antiidiotípicos pueden ejercer un mecanismo regulador en la periferia se proporciona mediante la demostración de que individuos sanos con niveles normales de FVIII producen títulos significativos de anticuerpos inhibidores frente al FVIII (Algiman M y col., en (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89 :3795-3799; Gilles JG y col., en (1994) *J Clin Invest* 94:1496-505), cuya actividad es indetectable en plasma por la presencia de anticuerpos antiidiotípicos complementarios. No obstante, dicha actividad inhibidora del FVIII se puede detectar fácilmente cuando los anticuerpos anti-FVIII se purifican mediante una combinación de cromatografía e
40 inmunoabsorción específica sobre FVIII insolubilizado. La capacidad inhibidora de FVIII de los anticuerpos purificados por afinidad se demostró que era igual a la de los anticuerpos anti-FVIII purificados de plasma de pacientes de hemofilia A con niveles altos de inhibidores, medido mediante el ensayo de Bethesda (Gilles JG y col., en (1994) *J Clin Invest* 94:1496-505).

45 Dicha actividad antiidiotípica neutralizante también se ha detectado en un grupo de pacientes desensibilizados con éxito mediante la administración de dosis altas de FVIII (Gilles JG y col., en (1996) *J Clin Invest* 97:1382-1388). El estudio demostró que la concentración de anticuerpos anti-FVIII, purificados por el mismo procedimiento que para los donantes sanos, no cambiaba durante la desensibilización y que los anticuerpos mantenían su capacidad de inhibir la función procoagulación del FVIII, aunque la titulación del inhibidor usando el ensayo de Bethesda en plasma se reducía a niveles indetectables. Esto apuntaba a la potencialmente importante función de la regulación
50 antiidiotípica en la tolerancia a la molécula de FVIII. Por tanto, cualquier terapia nueva inductora de un incremento de la producción de anticuerpos antiidiotípicos puede ser de interés en el tratamiento de pacientes con inhibidores de FVIII. De acuerdo con esto, se ha notificado un primer abordaje, en el que los pacientes fueron tratados con inyecciones de complejos inmunitarios formados por FVIII y anticuerpos autólogos específicos frente al FVIII, que dio como resultado una reducción significativa del nivel de inhibidores de FVIII circulantes, que se neutralizaron con los correspondientes anticuerpos antiidiotípicos Gilles JG, Arnout J. XXI Congreso Internacional de la Federación
55 Mundial de Hemofilia, abril de 1994; resumen). Dicho abordaje puede abrir el camino hacia nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a inhibidores del FVIII como de potencialmente bajo coste en comparación con los tratamientos disponibles en la actualidad.

60 Hallazgos previos del laboratorio de los inventores han mostrado que los anticuerpos antiidiotípicos ejercen propiedades fisiológicas en la homeostasis de la respuesta inmunitaria anti-FVIII. Por tanto, la sangre periférica de individuos sanos contiene anticuerpos específicos del FVIII, algunos de los cuales tienen la propiedad de inhibir la

función de procoagulante del FVIII (Gilles JGG & Saint-Remy JMR en (1994) *J Clin Invest* 94: 1496-1505). En estos individuos, la función del FVIII en realidad no se altera, ya que la inhibición del FVIII mediada por anticuerpos se neutraliza por acción de los anticuerpos antiidiotípicos específicos. Por tanto, los inventores han concluido que los anticuerpos antiidiotípicos tienen una relevancia fisiológica en el mantenimiento de la actividad normal del FVIII.

5 Además, los inventores han mostrado que cuando los pacientes de hemofilia A con inhibidores se tratan mediante infusión regular de dosis altas de FVIII, un tratamiento también denominado desensibilización o inducción de tolerancia (véase anteriormente), una de las consecuencias biológicas de dichas infusiones es la producción de anticuerpos antiidiotípicos específicos capaces de neutralizar el inhibidor (Gilles JG y col., en (1996) *J Clin Invest* 97: 1382-1388). Estos hallazgos sugieren que el uso de anticuerpos antiidiotípicos podría representar un valioso enfoque del control de los anticuerpos inhibidores del FVIII.

10 El anticuerpo monoclonal BO2C11 es un anticuerpos de tipo igG4 kappa específico de FVIII derivado del repertorio natural de un paciente con inhibidor (Jacquemin MG, y col., en (1998) *Blood* 92: 496-506). El Ac BO2C11 reconoce el dominio C2 e inhibe la unión de FVIII a vWF y a fosfolípidos (FL). Este anticuerpo es representativo de una clase principal de anticuerpos inhibidores humanos. Su mecanismo de acción normalmente se encuentra en pacientes con inhibidor y anticuerpos específicos de C2 son los anticuerpos inhibidores observados con mayor frecuencia. Además, el sitio de unión exacto del Ac BO2C11 sobre el dominio C2 se ha descifrado mediante análisis con rayos X de cristales realizados de los fragmentos Fab del anticuerpo y del dominio C2 (Spiegel P.C. Jr. y col., (2001) *Blood* 98: 13- 19).

15 En informes anteriores se han descrito anticuerpos antiidiotípicos dirigidos contra los anticuerpos antiidiotípicos anti-FVIII. Sultan y col., (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84 824-831, describen un fragmento F(AB')₂ policlonal obtenido de un paciente que ha superado con éxito la inhibición mediada por autoanticuerpos de la actividad del FVIII y que inhibe la actividad anti-FVIII:C de los autoanticuerpos. Lubahn y Reisner (1990), *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8232-8236 describen anticuerpos anti-FVIII humanos parcialmente purificados mediante precipitación en sal y cromatografía del plasma de un paciente de hemofilia A con inhibidor. Estos autores han demostrado que la IgG purificada reconocía la cadena pesada del FVIII nativo y su cadena de 43 kDa digerida por trombina. La preparación (SP8.4) se inyectó en ratones en un intento de obtener anticuerpos antiidiotípicos. Se obtuvieron varios clones, uno de los cuales, Mab20-2H, inhibía la unión del anticuerpo anti-FVIII a la cadena pesada. En un ensayo funcional, el Mab20-2H no modificó la actividad inhibidora de la fracción IgG del SP8.4, incluso cuando se añadía a concentraciones altas. El Mab20-2H detectó anticuerpos en el 3,2% de los plasmas de hemofílicos con inhibidor analizados, pero nunca neutralizó la actividad inhibidora. Los autores concluyeron que Mab20-2H reconocía un anticuerpo anti-FVIII no inhibidor que está dirigido contra la cadena de 43 kDa (dominio A2) de la molécula de FVIII.

20 En el laboratorio de los inventores se desarrolló y describió otro anticuerpo antiidiotípico (B6A2C1) (Gilles JG y col., en (1999) *Blood* 94, resumen 2048: 460a). Este anticuerpo antiidiotípico está dirigido contra un dominio C1 anti-FVIII

Sumario de la invención

25 Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica para usar en pacientes humanos que sufren hemofilia (primaria o adquirida), que han desarrollado inhibidores contra el FVIII.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar líneas celulares para general anticuerpos neutralizantes dirigidos contra inhibidores del FVIII humanos, así como los anticuerpos neutralizantes.

30 Un aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal antiidiotípico contra un anticuerpo inhibidor del Factor VIII humano, estando dicho anticuerpo inhibidor dirigido contra el dominio C2 del Factor VIII, que se caracteriza por el hecho de que las regiones determinantes de complementariedad de las cadenas pesadas variables de dicho anticuerpo antiidiotípico tienen las secuencias de aminoácidos representadas en la SEC ID N° 5, SEC ID N° 6 y SEC ID N° 7, respectivamente, y las regiones determinantes de complementariedad de las cadenas ligeras variables de dicho anticuerpo tienen las secuencias de aminoácidos representadas en la SEC ID N° 8, SEC ID N° 9 y SEC ID N° 10, respectivamente, y por el hecho de que el anticuerpo antiidiotípico a) neutraliza la actividad anti-coagulante de dicho anticuerpo inhibidor del factor VIII humano en al menos un 50% en un ensayo cromogénico de FVIII y b) no interfiere en la unión de FVIII a vWF y fosfolípidos.

35 De acuerdo con una realización, el anticuerpo antiidiotípico está dirigido contra un anticuerpo inhibidor de FVIII cuya cadena pesada está codificada por un segmento de la línea germinal de VH DP-5 derivado de la familia VH1. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo inhibidor del factor VIII es Ac B02C11.

Otras realizaciones de la presente invención se refieren a anticuerpos antiidiotípicos humanizados.

40 Otras realizaciones se refieren a anticuerpos antiidiotípicos monoclonales, tales como los que se pueden obtener con la línea celular 14C12. La línea celular 14C12 se depositó el 30 de julio de 2001 en la Colección coordinada de Bélgica de Microorganismos (BCCM), LMBP (colección de plasma, Laboratorium voor Moleculaire Biologie, Universiteit, K.L. Ledeganckstraat 35, 9000 Gent, Bélgica), con número de registro LMBP 5878CB.

45 Otras realizaciones son anticuerpos antiidiotípicos en los que la cadena pesada variable del anticuerpo antiidiotípico

está codificado por la secuencia nucleotídica representada en la SEC N° 1 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia, preferentemente que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, más preferentemente que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia, incluso más preferentemente que tiene al menos un 95-99% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 1, y en los que la cadena ligera variable del anticuerpo antiidiotípico está codificado por la secuencia nucleotídica representada en la SEC N° 3 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia, preferentemente que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, más preferentemente que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia, incluso más preferentemente que tiene al menos un 95-99% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 3. En particular, las secuencias nucleotídicas pueden incluir aquéllas que usan trinucleótidos equivalentes a los especificados en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 3, determinado por la redundancia del código genérico, de modo que conserva la capacidad para neutralizar los anticuerpos inhibidores del FVIII.

Otras realizaciones se refieren a anticuerpos antiidiotípicos que tienen una secuencia de proteínas de la cadena pesada variable como se representa en la SEC ID N° 2 o una secuencia de proteínas que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 80% de identidad de secuencia, incluso más preferentemente que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia, todavía más preferentemente que tiene al menos un 95% de identidad, más preferentemente que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 2 y/o que tiene una secuencia de proteínas de la cadena ligera variable como se representa en la SEC ID N° 4 o una secuencia de proteínas que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 80% de identidad de secuencia, incluso más preferentemente que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia, todavía más preferentemente que tiene al menos un 95% de identidad, más preferentemente que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 4, de modo que conserva la capacidad para neutralizar anticuerpos inhibidores del FVIII.

Otras realizaciones se refieren a versiones modificadas de anticuerpos antiidiotípicos de las presentes invenciones y también se refieren a fragmentos F(Ab)₂, fragmentos Fab', fragmentos Fab y otros fragmentos que comprenden al menos una región CDR de un anticuerpo antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo contra el dominio C2 de FVIII. La invención también se refiere a versiones modificadas de dichos fragmentos.

Otro aspecto más de la presente invención es una línea de células monoclonales que expresa un anticuerpo antiidiotípico tal como la línea celular monoclonal depositada 14C12 con número de registro LMBP 5878CB.

Otro aspecto más de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos antiidiotípicos descritos anteriormente contra los anticuerpos inhibidores frente al dominio C2 del Factor VIII y fragmentos, y versiones modificadas de los mismos, tal como se ha divulgado con detalla en el presente documento anteriormente.

Otro aspecto más de la presente invención es el uso de los anticuerpos antiidiotípicos o fragmentos descritos anteriormente y las versiones modificadas de los mismos como un medicamento.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de los anticuerpos antiidiotípicos o fragmentos descritos anteriormente y las versiones modificadas de los mismos para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de la hemorragia, más particularmente de la hemorragia en un paciente con hemofilia con anticuerpos inhibidores contra el dominio C2 del FVIII.

Otro aspecto más de la presente invención es el uso de los anticuerpos antiidiotípicos o fragmentos descritos anteriormente, dichos anticuerpos antiidiotípicos y versiones modificadas de los mismos para la fabricación de un medicamento para la inhibición de la producción de anticuerpos inhibidores. De acuerdo con una realización de este aspecto de la invención, los anticuerpos antiidiotípicos descritos anteriormente dirigidos contra los inhibidores de FVIII se usan para la inducción de la apoptosis de células B portadoras de anticuerpos inhibidores anti-C2. Por tanto, los anticuerpos antiidiotípicos y sus fragmentos de la presente invención son capaces de suprimir tanto la función efectora de los inhibidores frente al dominio C2 del FVIII (neutralización del efecto de los anticuerpos solubles) como la producción de dichos anticuerpos (interacciones con células portadoras de idiotipos idénticos o similares a B02C11).

La presente invención también se refiere a un procedimiento de prevenir o tratar las hemorragias en un paciente, opcionalmente un paciente de hemofilia, que tenga anticuerpos inhibidores contra dominio C2 del FVIII, en el que el procedimiento comprende la etapa de administrar al paciente el anticuerpo antiidiotípico descrito anteriormente, fragmentos o versiones modificadas de los mismos.

El procedimiento también se refiere a un procedimiento de inducir apoptosis de células B portadoras de anticuerpos inhibidores anti-C2 en un paciente de hemofilia con anticuerpos inhibidores contra dominio C2 del FVIII de la invención o fragmentos de dichos anticuerpos antiidiotípicos y versiones modificadas de los mismos.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de los anticuerpos antiidiotípicos dirigidos contra inhibidores del FVIII de la invención para detectar anticuerpos del FVIII en fluidos corporales.

A lo largo de la descripción se hace referencia a las siguientes secuencias representadas en el listado de

secuencias:

- SEC ID N° 1: Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de Ac 14C12
- SEC ID N° 2: Secuencia de aminoácidos la región variable de la cadena pesada de Ac 14C12
- SEC ID N° 3: Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de Ac 14C12
- 5 SEC ID N° 4: Secuencia de aminoácidos la región variable de la cadena ligera de Ac 14C12
- SEC ID N° 5: Secuencia de aminoácidos la región CDR1 (H1) de la región variable de la cadena pesada de Ac 14C12
- SEC ID N° 6: Secuencia de aminoácidos la región CDR2 (H2) de la región variable de la cadena pesada de Ac 14C12
- 10 SEC ID N° 7: Secuencia de aminoácidos la región CDR3 (H3) de la región variable de la cadena pesada de Ac 14C12
- SEC ID N° 8: Secuencia de aminoácidos la región CDR1 (L1) de la región variable de la cadena ligera de Ac 14C12
- SEC ID N° 9: Secuencia de aminoácidos la región CDR2 (L2) de la región variable de la cadena ligera de Ac 14C12
- 15 SEC ID N° 10: Secuencia de aminoácidos la región CDR3 (L3) de la región variable de la cadena ligera de Ac 14C12

Definiciones

20 **Factor VIII**, abreviado **FVIII**, se refiere al factor de coagulación de la sangre glicosilado con un peso molecular de 330 kD y 2332 aminoácidos, que sufre procesamiento proteolítico.

Cadena ligera del FVIII se refiere a la parte procesada proteolítica del FVIII que contiene los dominios A3, C1 y C2.

Dominio C2 se refiere a la región sin los residuos 2173 a 2332 de FVIII **Sitio de unión a fosfolípidos (FL)** se refiere a una región en el dominio C2 entre los aminoácidos 2302 y 2332.

Idiotipo se refiere a un único determinante antigénico.

25 Idiotipo se refiere a la colección de idiotipos dentro de la región variable que confiere sobre una molécula de inmunoglobulina una individualidad antigénica y que es característico de un anticuerpo concreto en un individuo.

Se dice que un idiotipo corresponde a la **imagen interna de un epítipo** cuando simula conformacionalmente a un epítipo antigénico.

30 El término "**Anticuerpo**" ("**Ac**"), como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas intactas de anticuerpo monoclonal o policlonal, así como a fragmentos de los mismos, que comprende:

a) las cadenas pesadas y ligeras (tales como Fab, F(ab)₂, F(ab')₂) o cadenas sencillas pesadas o ligeras (p. ej., dímeros de cadena ligera), que opcionalmente incluyen su región constante (o partes de las mismas) u, opcionalmente, modificaciones menores (tales como variantes alotópicas) de la región constante; ;

35 b) partes de los mismos, en particular las partes determinantes de especificidad de los mismos, es decir, las regiones variables de los anticuerpos.

c) (subpartes de los mismos, en particular las partes hipervariables de los mismos, tales como péptidos, formados por tiras de aminoácidos que comprenden las seis secuencias de CDR, opcionalmente con secuencias estructurales, por ejemplo secuencias de hasta aproximadamente 10 aminoácidos en una o más CDR.

40 Opcionalmente, de acuerdo con la presente invención, los anticuerpos con anticuerpos de tipo IgG, particularmente IgG1. **F(ab')₂** se refiere al fragmento de anticuerpo que se obtienen tras la escisión con pepsina que está en las cadenas ligeras y las partes de las cadenas pesadas unidas por puentes disulfuro a través de la región bisagra. El fragmento **Fab** se puede obtener del anticuerpo intacto o de F(ab')₂ mediante digestión con papaína de la región bisagra y contiene una cadena ligera y una parte de la cadena pesada. Fragmentos de anticuerpos pueden también obtenerse mediante síntesis o mediante procedimientos recombinantes descritos en la técnica.

45

Un "**anticuerpo inhibidor**" o "inhibidor de FVIII" (Ac1), como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que inhibe la actividad de FVIII. De acuerdo con la presente invención, un anticuerpo inhibidor es un

anticuerpo dirigido contra el dominio C2 del VIII. Anticuerpo inhibidores pueden ser aloanticuerpos contra FVIII exógeno o autoanticuerpos. Los anticuerpos inhibidores pueden ser de origen humano o animal. Opcionalmente, un anticuerpo inhibidor es un anticuerpo inhibidor humano contra el Factor VIII humano.

5 **Anticuerpo antiidiotípico** en la presente invención se refiere a un anticuerpo de segunda generación (Ac2) que puede ser policlonal pero que, preferentemente, es monoclonal y dirigido contra la parte variable de los anticuerpos inhibidores (Ac1). Los anticuerpos antiidiotípicos de acuerdo con la presente invención tienen, preferentemente, la capacidad de neutralizar los anticuerpos inhibidores y, opcionalmente, la producción de Ac1. El anticuerpo antiidiotípico de la presente invención puede ser de origen humano. El anticuerpo antiidiotípico de la presente invención es, preferentemente, monoclonal y, opcionalmente, recombinante.

10 La “**capacidad para neutralizar anticuerpos inhibidores**” se refiere a una propiedad de un anticuerpo antiidiotípico de la presente invención para bloquear la actividad inhibidora de los inhibidores de FVIII (Ac1). Esto se puede determinar mediante análisis de la actividad de FVIII en presencia del inhibidor y el Ac antiidiotípico en un ensato, tal como la prueba cromógena del Factor VIII como describen Jacquemin y col., (1998) *Blood* 92, 494-506. **Regiones determinantes de la complementariedad (CDR)** en la presente invención se refieren a las secuencias de aminoácidos hipervariables dentro de las regiones variables del anticuerpo que interactúan con el epítipo del antígeno. En la presente invención, las regiones CDR son las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) variables, respectivamente (L1, L2, L3 y H1, H2, H3 respectivamente) de un anticuerpo antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo inhibidor anti-dominio C2. Una realización específica se refiere a las correspondientes regiones en el anticuerpo antiidiotípico 14C12.

20 “**Anticuerpo humanizado**”, como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de anticuerpo no humano en las que los aminoácidos han sido sustituidos en las regiones de unión no antigénica con el fin de simular más estrechamente un anticuerpo humano.

Un “**anticuerpo humano reconfigurado**” o un “**anticuerpo híbrido humano**”, como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo humano en el que los aminoácidos en las regiones de unión al antígeno se han sustituido con secuencias de acuerdo con la presente invención, por ejemplo CDR u otras partes de regiones variables que se han obtenido del repertorio de anticuerpos humanos.

30 **Comparaciones de secuencia.** Se han diseñado comparaciones de secuencias de proteínas o nucleótidos en términos de identidad de secuencia o de similitud de secuencia. Cuando de acuerdo con la presente invención se realizan comparaciones entre las secuencias de aminoácidos de dos regiones VH o de dos regiones VL, o se realizan comparaciones entre dos secuencias de nucleótidos que codifican regiones CDR, el nivel de identidad o similitud de secuencia entre dos secuencias puede incluir tener al menos 70%, preferentemente al menos 80%, más preferentemente al menos 90%, incluso más preferentemente al menos 95% y, más preferentemente, al menos 99% de identidad o similitud de secuencia entre dos secuencias.

35 Secuencias de nucleótidos o de aminoácidos que son “**idénticas**” significa que cuando se alinean dos secuencias, el porcentaje de identidad de secuencia, es decir el número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido por el número de los nucleótidos o aminoácidos (cuando son de longitud diferente, el más corto) de las secuencias es superior al 70%, preferentemente al menos 80%, incluso más preferentemente al menos 90%, más preferentemente al menos 95-99%, más específicamente es 100%. La alineación de dos secuencias de nucleótidos se realiza mediante el algoritmo, tal como describen Wilbur y Lipmann (1983, *Proc Natl Acad Sci USA* 80:726) usando un tamaño de margen de 20 nucleótidos, una longitud de texto de 4 nucleótidos y una penalización por hueco de 4.

45 Dos aminoácidos se consideran “**similares**” si pertenecen a uno de los grupos siguientes GASTCP; VILM; YWF; DEQN; KHR. Así, las secuencias que son similares significa que cuando se alinean las dos secuencias de proteínas, el porcentaje de similitud de secuencia, es decir el número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos o similares dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos (cuando son de longitud diferente, el más corto) de las secuencias es superior al 70%, preferentemente al menos 80%, incluso más preferentemente al menos 90% y más preferentemente al menos 95-99%, más específicamente es 100%.

50 Las secuencias de nucleótidos se consideran “**similares**” si codifican secuencias de aminoácidos similares o idénticas (Es decir, entre dos secuencias de nucleótidos que codifican proteínas idénticas, la variación está entre los límites de la degeneración del código genético). “**modificado**” indica cualquier molécula proteica (o polipéptido) en la que uno o una serie de aminoácidos han sido sustituidos por cualquier otro residuo aminoácido o eliminados. Dicha sustitución o delección de aminoácido puede localizarse en cualquier lugar en la molécula proteica. También indica las moléculas proteicas en las que se han sustituido y/o eliminado residuos aminoácido en más de un lugar. En el último caso, se puede considerar cualquier combinación de sustitución o delección. También se refiere a polimorfismos (es decir, la aparición regular y simultánea en una única población cruzada de dos o más alelos de un gen, en la que la frecuencia de los alelos más raros es mayor, normalmente mayor que 1%, que se puede explicar por mutación recurrente sola).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá con referencia a ciertas realizaciones y a ciertas figuras, pero la presente invención no está limitada por ellos sino sólo por las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a anticuerpos antiidiotípicos contra anticuerpos inhibidores del Factor VIII humano. Los anticuerpos inhibidores contra el FVIII se desarrollan con mayor frecuencia en hemofílicos, en los que la incidencia de desarrollar un inhibidor es 15-20%. Particularmente, los hemofílicos muy expuestos a concentrados de FVIII, tales como pacientes jóvenes o pacientes con un defecto genético que tiene como resultado la ausencia de síntesis y/o secreción de la proteína FVIII (hemofilia congénita) están en riesgo alto de desarrollar inhibidores de FVIII. No obstante, también se producen anticuerpos inhibidores en pacientes en el contexto de trastornos autoinmunitarios, neoplasias malignas (tales como trastornos linfoproliferativos, linfomas y tumores sólidos), reacciones farmacológicas (p. ej., penicilina, cloranfenicol, fenitoína), durante el embarazo y el posparto. Excepcionalmente, la presencia de anticuerpos inhibidores puede ser idiopática (p. ej., en pacientes ancianos). No obstante, normalmente, la presencia de anticuerpos inhibidores se asocia con síntomas tal como fácil formación de hematomas y hemorragias incontroladas. Normalmente, a esto se le denomina hemofilia adquirida. Por tanto, la presente invención se refiere a composiciones para usar en el tratamiento o prevención de cualquier afección asociada con la presencia de anticuerpos inhibidores o caracterizada por ella. La presencia de anticuerpos inhibidores en un paciente se puede determinar mediante diferentes procedimientos, incluida la cuantificación de la actividad anti-FVIII, ELISA para inhibidores de FVIII y purificación usando cromatografía e inmuoadsorción (cada uno de estos procedimientos se ha descrito en Algiman et al (1992), en lo que antecede).

La presente invención se refiere a anticuerpos antiidiotípicos capaces de neutralizar el efecto inhibidor de los inhibidores del FVIII. La inhibición del FVIII por los anticuerpos inhibidores se puede producir, por ejemplo, reduciendo la velocidad a la que el FVIII se activa uniéndose a un sitio de escisión proteolítica o induciendo un cambio conformacional 3D en el FVIII de modo que sea menos susceptible a proteólisis. La inhibición también se puede producir cuando los anticuerpos interfieren en la unión de FVIII a FIX y FC.

La presente invención se refiere a anticuerpos antiidiotípicos contra anticuerpos inhibidores del Factor VIII humano dirigidos contra el dominio C2 de FVIII neutralizando en al menos un 50% la inhibición de la actividad procoagulante de FVIII de anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio C2 de FVIII. La inhibición de la actividad procoagulante se puede medir mediante la prueba de cromógeno del Factor VIII, como se ha descrito en el presente documento. De acuerdo con un aspecto concreto de la presente invención, los anticuerpos antiidiotípicos están dirigidos contra anticuerpos inhibidores, tales como el anticuerpo monoclonal B02C11 (anticuerpo IgG4 kappa derivado del repertorio natural de un paciente con inhibidor, Jacquemin MG, y col., 1998, Blood 92: 496506) u otros anticuerpos con propiedades de unión a C2 similares. Más particularmente, los anticuerpos antiidiotípicos están dirigidos contra inhibidores del FVIII, de los que los dominios VH están codificados por el segmento génico de VH de DP5 derivado de la familia génica VH1. Dichos y otros anticuerpos inhibidores se pueden obtener de seres humanos (Es decir, del suero de pacientes que tienen anticuerpos inhibidores) o pueden obtener de ratones, cobayas, caballos, cabras, primates no humanos y otros mamíferos mediante inmunización con FVIII, o fragmentos del mismo, más particularmente con un fragmento que comprende todo o parte del dominio C2.

La presente invención se refiere a anticuerpos antiidiotípicos contra anticuerpos inhibidores del Factor VIII humano dirigidos contra el dominio C2 de FVIII capaces de neutralizar en al menos un 50% la inhibición de la actividad procoagulante de FVIII, pero que no inhiben interfieren en la actividad fisiológica de FVIII, más particularmente la unión de FVIII a vWF o FL. En el presente documento se describen procedimientos para identificar la influencia de un anticuerpo antiidiotípico sobre la capacidad del FVIII para unirse a vWF y/o a PL. Estos se pueden usar para la selección de anticuerpos antiidiotípicos que no interaccionan con la unión de FVIII a vWF o a PL, de acuerdo con la presente invención.

Procedimientos adicionales para analizar más el desarrollo de anticuerpos antiidiotípicos que no interfieran con la unión de FVIII a vWF o a PL incluyen ,entre otros, a) usar como inmunógeno en el desarrollo de anticuerpos antiidiotípicos un anticuerpo inhibidor que se ha generado contra un FVIII modificado, que no comprende el dominio de unión a FL ((Pratt y col., anteriormente) o regiones importantes para la unión de Vd. (Jacquemin y col., 2003, J *Thromb Haemost* 1:456-463); b) usar como inmunógeno un anticuerpo inhibidor del que se han eliminado el(los) idiotipo(s) que reconocen el sitio de unión a FL o las regiones importantes para la unión de vWF y FVIII, c) analizar la similitud entre el sitio de unión al antígeno del anticuerpo antiidiotípico obtenido y el dominio C2 del FVIII, e i) seleccionar anticuerpos antiidiotípicos en función del hecho de que la correspondencia entre el idiotipo del anticuerpo antiidiotípico y el FVIII no incluye el sitio de unión a PL o las regiones importantes para la unión de vWF y FVIII o ii) eliminación de dichas regiones dentro del idiotipo del anticuerpo antiidiotípico que corresponde al sitio de unión a FL de C2 o las regiones para la unión de vWF a FVIII. Tras cada uno de estos procedimientos de selección, se deberán tomar precauciones para que los anticuerpos antiidiotípicos seleccionados o modificados conserven su capacidad para neutralizar los anticuerpos inhibidores.

De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos antiidiotípicos monoclonales pueden ser de origen humano o animal. De acuerdo con esto, los anticuerpos antiidiotípicos monoclonales se pueden obtener de diferentes formas. Las células productoras de anticuerpos antiidiotípicos se pueden obtener de linfocitos de sangre periférica de

pacientes (p. ej. de hemofilia) con anticuerpos anti-FVIII o de individuos sanos. Éstas se pueden inmortalizar usando técnicas estándar y se pueden seleccionar sobre la base de la capacidad de los anticuerpos antiidiotípicos para neutralizar los anticuerpos inhibidores y, opcionalmente, en ausencia de interacción del anticuerpos antiidiotípico con la unión de FVIII a FL y vWF. Opcionalmente, los anticuerpos monoclonales producidos por cada una de estas líneas celulares se pueden secuenciar para la identificación de idiotipos relevantes y la selección en base a ellos, tal como se ha descrito con anterioridad.

Como alternativa, los anticuerpos antiidiotípicos de la presente invención se pueden producir con el fin de inmunización de animales, tales como ratones, inyectando anticuerpos inhibidores de FVIII (tal como el anticuerpo inhibidor B02C11 dirigido contra el dominio C2 de FVIII) en ratones y, después, fusionando los linfocitos de bazo con una línea celular de mieloma de ratón, seguido de identificación y clonación de los cultivos celulares que producen anticuerpos antiidiotípicos dirigidos contra los anticuerpos inhibidores del factor VIII.

Así, la presente invención proporciona también líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales que son reactivos contra los inhibidores de FVIII, producidos como se ha descrito anteriormente. Estas líneas celulares pueden ser células inmortalizadas de origen humano, opcionalmente pueden originarse del paciente que se va a tratar. Como alternativa, las células inmortalizadas pueden ser de origen animal (particularmente de roedores). Una realización concreta de la presente invención es proporcionada por la línea celular depositada 14C12, número de registro 5878CB, que produce el anticuerpo antiidiotípico 12C12.

Opcionalmente, los anticuerpos monoclonales producidos en animales se pueden humanizar, por ejemplo asociando la región determinante de complementariedad (CDR) de la unión del anticuerpo monoclonal no humano con regiones estructurales humanas, en particular la región constante C del gen humano, tal como divulgan Jones y col., en *Nature* (1986) 321: 522 o Riechmann en *Nature* (1988) 332: 323.

Como alternativa, los anticuerpos antiidiotípicos se pueden obtener de suero humano o animal mediante purificación de afinidad en anticuerpos anti-FVIII (ellos mismos se pueden identificar mediante inmuoadsorción sobre FVIII insolubilizado (como queda demostrado por Algiman 1994, y Gilles 1994, anteriormente). Opcionalmente, el dominio C2 se puede usar por purificación por afinidad, con el fin de estimular la selección de anticuerpos anti-C2 (inhibidores).

Una realización concreta de la presente invención es proporcionada por el anticuerpo monoclonal antiidiotípico 14C12 y los anticuerpos que incluyen fragmentos de anticuerpo derivados de los mismos. La presente invención se refiere a un anticuerpo antiidiotípico que comprende las secuencias de las regiones CDR tal como se identifica en las SEC ID N° 5 a 10.

La presente invención también proporciona fragmentos de cualquiera de los anticuerpos antiidiotípicos anteriores contra anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio C2 de FVIII, incluyendo dichos fragmentos Fab, Fab', F (ab')₂, CDR, dominios de variable sencilla así como versiones modificadas de los mismos y combinaciones de estos fragmentos y modificaciones.

Más particularmente, la presente invención proporciona fragmentos y versiones modificadas de los anticuerpos antiidiotípicos de la presente invención, en particular fragmentos que comprenden regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") de los anticuerpos antiidiotípicos monoclonales, obtenidos como se ha descrito anteriormente, así como versiones modificadas de los mismos. Por ejemplo, la invención proporciona fragmentos de unión a antígeno Fab, Fab' y F (ab')₂ generados mediante digestión proteolítica de dichos anticuerpos monoclonales usando procedimientos bien conocidos en la técnica, tal como describen Stanworth y col., *Handbook of Experimental Immunology* (1978), vol. 1 capítulo 8 (Blackwell Scientific Publications). Dichos fragmentos o secuencias artificiales que contienen el sitio de unión al anticuerpo, pueden haber perdido o no una serie de propiedades del anticuerpo parental, tales como activación del complemento o la capacidad para unirse a receptores de gamma, aunque sin perder su capacidad para inhibir los anticuerpos inhibidores contra el FVIII. La presente invención también incluye fragmentos del dominio variable de cadena sencilla (scFv), fragmentos del dominio variable de cadena sencilla de los anticuerpos y combinación de estos fragmentos y de los fragmentos mencionados con anterioridad. Los anticuerpos en los que las respectivas secuencias de CDR son diferentes en una rama en comparación con la otra rama del anticuerpo también entran dentro del alcance de la invención.

La presente invención proporciona además anticuerpos monoclonales reconfigurados o anticuerpos monoclonales híbridos humanos contra los anticuerpos inhibidores de FVIII dirigidos contra el dominio C2 de FVIII obtenido de los anticuerpos antiidiotípicos monoclonales y los descritos anteriormente, Por anticuerpos monoclonales híbridos humanos se quiere decir un anticuerpo híbrido construido a partir de un anticuerpo humano y a partir de regiones variables de acuerdo con la presente invención. La presente invención también proporciona partes variables de cadena sencilla solubles o fijadas a la membrana de los anticuerpos monoclonales anteriores. Éstas se pueden obtener en base a procedimientos descritos en la técnica, un ejemplo de los cuales se proporciona en el presente documento. Las secuencias de ADN de las partes variables de las cadenas pesadas y ligeras humanas se amplifican en reacciones distintas y se clonan. Por ejemplo, una secuencia ligadora de quince ácidos nucleicos (Gly4 Ser) 3 se inserta entre VH y VL mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de dos etapas según Dieffenbach y Dveksler, "PCR Primer, a laboratory manual" (1995), Cold Spring Harbour Press, Plainview, NY, USA.

A continuación, el fragmento resultante se inserta en un vector adecuado para la expresión del fragmento variable de cadena sencilla (scFv) como polipéptido soluble o de expresión en fagos. Esto se puede conseguir mediante procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica, tal como describen Gilliland y col., 1996, *Tissue Antigens* 47: 1-20. En el presente documento se divulgan ligandos que comprenden péptidos representativos de las regiones hipervariables de un anticuerpo monoclonal, que se pueden obtener mediante síntesis usando un sintetizador de Applied Biosystem, por ejemplo un sintetizador de polipéptidos tal como el modelo 9050 disponible en Milligen (EE.UU.) o un modelo de una tecnología relacionada que, solas o en combinación con otras regiones hipervariables similares ejercerán propiedades similares a las del anticuerpo parental. Mediante la tecnología de ADN recombinante se pueden generar fragmentos y péptidos. Se pueden fabricar péptidos de secuencias con una longitud de hasta 100 aminoácidos, tales como síntesis de BOC (terc-butoxicarbonilo) o FMOC (9-fluorenilmetoxicarbonilo) Mediante síntesis de péptidos sintéticos y otras técnicas conocidas en la materia. Opcionalmente, los grupos amino y carboxi se pueden modificad químicamente con el fin de aumentar la estabilidad y duración del péptido (p. ej., formilación, acetilación). Como alternativa, el péptido puede estar unido de forma covalente o no covalente a un transportador.

De acuerdo con la presente invención, anticuerpos antiidiotípicos para usar en el tratamiento de pacientes que presentan inhibidores del FVIII se obtienen de forma óptima mediante el procedimiento siguiente:

- a) aislamiento de anticuerpos humanos dirigidos contra el FVIII de un paciente que sufre de inhibidores de FVIII.
- b) selección de los anticuerpos obtenidos en (a) de un anticuerpo inhibidor de la actividad coagulante de FVIII en base a su unión a C2
- c) inmunización de u animal con los anticuerpos seleccionados en (b) o la parte de reconocimiento antigénico de los mismos (preferentemente al menos VH y/o VL)
- d) opcionalmente, clonación de los anticuerpos producidos en el animal en (c)
- e) selección de un anticuerpo antiidiotípico en base a 1) su capacidad para neutralizar la actividad inhibidora de los inhibidores de FVIII, 2) el hecho de que no interfiere en la unión de FVIII a vWF o FL.
- f) opcionalmente, obtención de una versión humanizada, o un fragmento de anticuerpo del anticuerpo antiidiotípico seleccionado en (e).

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de hemorragias en un paciente con hemofilia que tiene anticuerpos inhibidores frente al dominio C2 del FVIII en seres humanos, que comprende, como principio activo, el anticuerpo antiidiotípico monoclonal y fragmentos y versiones modificadas como las descritas anteriormente en el presente documento, en mezcla con un transportador farmacéuticamente aceptable. Más preferentemente, dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal, o un fragmento, versión modificada obtenibles de la línea celular 14C12 depositada en las Colecciones Coordinadas Belgas de Microorganismos, número de registro LMBP 5878CB Un ligando de acuerdo con la presente invención puede incluir también un polipéptido sintético de potencia equivalente. La composición farmacéutica de la presente invención debería comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente citado anteriormente, tal como se indica a continuación en el presente documento en relación con el procedimiento de tratamiento o prevención.

Transportadores farmacéuticos adecuados para uso en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se describen en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences 16 ed. (1980) y su formulación es bien conocida para los expertos en la técnica Incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (p. ej., fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro sódico) y similares. Pueden incluirse ingredientes adicionales con el fin de controlar la duración de la acción del ingrediente activo del anticuerpo monoclonal en la composición.

Así, se pueden conseguir composiciones de liberación controlada seleccionando los transportadores poliméricos adecuados, tales como poliésteres, poliaminoácidos, polivinilpirrolidona, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina y similares. La velocidad de la liberación del fármaco y la duración de la acción también se pueden controlar incorporando el principio activo del anticuerpo monoclonal en partículas, por ejemplo microcápsulas, de una sustancia polimérica, tales como hidrogeles, ácido poliláctico, hidroximetilcelulosa, metacrilato de polimetilo y los otros polímeros descritos con anterioridad. Dichos procedimientos incluyen sistemas de liberación de fármaco coloidal, como liposomas, microesferas, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas etc. Dependiendo de la vía de administración, la composición farmacéutica que comprende el principio activo puede requerir recubrimientos protectores. La forma farmacéutica adecuada para uso inyectable incluye soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de los mismos. Así, transportadores típicos incluyen tampones acuosos biocompatibles, etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y mezclas de los mismos.

La presente invención también proporciona el uso como medicamento de un anticuerpo antiidiotípico monoclonal contra los anticuerpos inhibidores contra el FVIII dirigidos contra el dominio C2 de FVIII, tal como se ha descrito en el presente documento. Más preferentemente, el medicamento usado en la presente invención es un medio adecuado

para reducir y/o prevenir y/o tratar hemorragias en un paciente hemofílico con anticuerpos inhibidores contra el dominio C2 de FVIII. Dicho ligando se puede proporcionar a un paciente por cualquier medio bien conocido en la técnica, por ejemplo por vía intravenosa, intraarterial, parenteral o mediante cateterización.

5 Así, la presente invención proporciona composiciones para uso en un procedimiento de tratamiento y/o prevención para prevenir y/o tratar y/o reducir la hemorragia en un paciente, más particularmente en un paciente de hemofilia que tiene anticuerpos inhibidores contra el dominio C2 de FVIII en un mamífero, preferentemente un ser humano, que comprende administrar a un mamífero que necesite dicho tratamiento o prevención o atenuación una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando como se ha divulgado anteriormente en tal el presente documento. Preferentemente, dicho ligando es un anticuerpo monoclonal obtenible de la línea celular 14C12 o un fragmento de unión a antígeno Fab, Fab' o F(ab')₂, o un péptido que comprende las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR), una parte variable de cadena sencilla unida a la membrana (scFv), un dominio variable sencillo o una versión modificada o combinación de cualquiera de estos elementos. Opcionalmente, dicho procedimiento de tratamiento se combina con la administración al paciente de FVIII.

15 Una cantidad terapéuticamente eficaz como se usa en tal el presente documento significa de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 10 microgramos por kilogramo de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 10 microgramos a aproximadamente 1 miligramo por kilogramo de peso corporal del mamífero que se va a tratar. Se apreciará que, en vista de la prolongada semivida de la mayoría de anticuerpos IgG, los ligandos de la presente invención que son anticuerpos monoclonales de dicha clase disfrutará de una periodicidad del tratamiento que participa en la comodidad del paciente.

20 Los pacientes de hemofilia A con inhibidor producen con frecuencia anticuerpos contra el dominio C2 de FVIII. Los ligandos de la presente invención, tal como el anticuerpo producido por la línea celular 14C12, son, por tanto, útiles para el tratamiento de dichos pacientes, en situaciones de emergencia, como, por ejemplo, antes de un procedimiento quirúrgico, o como tratamiento más prolongado en el que el Ac 14C12 puede inducir apoptosis de las células B portadoras de los correspondientes anticuerpos anti-C2.

25 Los ligandos de la presente invención, tal como el anticuerpo antiidiotípico AC 14C12 de la línea celular 14C12, tienen la capacidad para neutralizar en un ensayo de coagulación funcional en la menos 50%, preferentemente al menos 70 %, más preferentemente en al menos 80 % y más preferentemente en al menos 90%, las propiedades inhibidoras de FVIII de los anticuerpos inhibidores contra el dominio C2 de FVIII.

30 El lector experto en la técnica entenderá que se pueden concebir varias variantes del Ac 14C12 a partir del conocimiento de la secuencia del AC 14C12 y de la estructura cristalina del fragmento Fab de BO2C11 en combinación con el dominio C2. Así, se pueden introducir mutaciones puntuales en la región VH del Ac 14C12 para reforzar la imagen interna de C2, reforzando de este modo la capacidad inhibidora del Ac 14C12 sobre la unión a C2 del BO2C11 y similares. Como alternativa, la secuencia se puede alterar de tal modo que se aumente el número de residuos de contacto entre BO2C11 y el Ac 14C12, con o sin mantenimiento de la imagen interna de C2. Un aspecto concreto de este enfoque es derivar un anticuerpo mutante contra 14C12 que contendría residuos de contacto que reconocen aminoácidos incluidos en las regiones estructurales de BO2C11. Esto último pertenece a los segmentos génicos de la subfamilia de la cadena pesada de DP5 (Jacquemin MG et al en (1998) *Blood* 92: 496) como otros anticuerpos con propiedades de unión a C2 similares. Dado que la frecuencia de los miembros de la familia DP5 es muy baja en el repertorio humano, la neutralización de toda la subfamilia DP5 se puede conseguir usando el Ac 14C12, de modo que se neutralizan todos los anticuerpos inhibidores de los que los dominios VH están codificados por el segmento génico DP5 VH derivado de la familia de genes Vh1 (Jacquemin et al (1998) citado anteriormente; Van den Brink y col., en (2000) *Blood* 99, 2828-2834.

35 De acuerdo con los conocimientos generales de un experto en la técnica, se pueden preparar varios péptidos sintéticos a partir del anticuerpo 14C12. Uno o más de ellos, solos o en combinación, se puede usar para neutralizar anticuerpos similares a BO2C11 in vivo. Dichos péptidos derivan de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada del Ac 14C12 y están representados por los péptidos con una secuencia de aminoácidos GYTFTSSVMHWL [SEC ID N° 5], GYINPYNDGTTYNEKFTA [SEC ID N° 6] y SGGLLRGYWYFDV [SEC ID N° 7]. Como alternativa, estos péptidos derivan de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena ligera del Ac 14C12 y están representados por los péptidos con una secuencia de aminoácidos RASQDITNTLH [SEC ID N° 8], YVQSIS [SEC ID N° 9] y QQSTSWPYT [SEC ID N° 10]. Así, péptidos sintéticos derivados de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Ac 14C12 se usan para infundir a los pacientes anticuerpos inhibidores contra el dominio C2 de FVIII antes de la cirugía. Los péptidos se combinan con anticuerpos inhibidores y neutralizan sus capacidades inhibidoras. Como alternativa, un polipéptido recombinante se elabora combinando la secuencia de diferentes CDR con las secuencias polipeptídicas ligadoras adecuadas, para mantener una conformación 3D adecuada. El polipéptido se administra en pacientes antes de un procedimiento de emergencia como, por ejemplo, una cirugía.

45 Una aplicación adicional de los anticuerpos antiidiotípicos de la presente invención, tal como Ac 14C12, es su uso para inactivar la producción de inhibidores de FVIII por el sistema inmunitario. Por ejemplo, los anticuerpos antiidiotípicos de la presente invención se pueden usar para inducir apoptosis de células B portadoras de anticuerpos anti-C2. Dichas células B, como células de memoria o como algunas células productoras de

60

anticuerpos, expresan un anticuerpo de superficie equivalente a su forma secretada. La reticulación de idiotipos en la superficie de las células B transluce una señal que conduce a la inhibición de la proliferación o apoptosis de la célula.

- 5 Otra aplicación de los anticuerpos antiidiotípicos de la presente invención es su uso en la detección y/o purificación de inhibidores de FVIII. Los procedimientos de detección y purificación inmunológicos que se pueden aplicar en el contexto de la presente invención se describen extensamente en la técnica.

Los Ejemplos siguientes se pueden entender junto con las figuras adjuntas en las que:

Figura 1: Neutralización dependiente de la dosis de la inhibición de FVIII por BO2C11, neutralizada por Ac 14C12 de acuerdo con una realización de la presente invención.

- 10 **Figura 2:** Resultados de experimentos de reconstitución en ratones C57Bl/6 FVIII^{-/-} de acuerdo con una realización de la presente invención. El panel A muestra la reconstitución con el Factor VIII en ausencia o presencia del inhibidor Ac BO2C11. El panel B muestra la neutralización dependiente de la dosis por el Ac 14C12 de BO2C11 mediada por la inhibición de FVIII. El Ac BO2C11 y Ac 14C12 se preincubaron; tanto en el Panel C como en el B se administró Ac BO2C11 FVIII tras la administración de Ac 14C12.

- 15 **Figura 3:** Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la cadenas pesada y ligera del anticuerpo antiidiotípico 14C12. Las regiones CDR se indican bajo la secuencia de aminoácidos.

Figura 4: Neutralización de la unión de FVIII a los anticuerpos inhibidores humanos contra el dominio C1 (2E9) y el dominio C2 (Bo2c11) por el AcMo antiidiotípico de ratón contra un inhibidor del dominio C1 (B6A2C1)

- 20 **Figura 5:** Superposición del dominio C2 de FVIII (negro) con la región variable VH del Ac 14C12, en la que las líneas de color gris oscuro representan el dominio C2 de FVIII y que las líneas de color gris claro representan el dominio VH de 14C12.

Figura 6: Neutralización de la actividad inhibidora de BO2C11 sobre FVIII tras la adición de varias concentraciones del anticuerpo antiidiotípico Ac 14C12. La actividad de FVIII se midió en un ensayo cromogénico funcional.

- 25 **Figura 7:** Ausencia de inhibición de la unión de FVIII a fosfolípidos o vWF por el Ac 14C12; se añadió FVIII a placas de microtitulación revestidas con fosfatidilserina (panel A) o un anticuerpo frente a VWF y VWF purificado (panel B). La capacidad del Ac 14C12 para inhibir la unión a FL o a VWF se analizó añadiendo concentraciones crecientes del Ac 14C12. Se evaluó la unión residual de FVIII usando un anticuerpo dirigido hacia la cadena pesada.

- 30 **Figura 8:** Influencia del Ac 14C12 sobre el aclaramiento de FVIII de la circulación; en ratones FVIII^{-/-} C57Bl/6 se inyectó IV FVIII solo (FVIII) o Ac 14C12, seguido 15 minutos después por FVIII (VIII + 14C12). La tasa de aclaramiento de FVIII se evaluó avalizando la función de FVIII a 3 y 6 horas.

Figura 9: Unión del Ac 14C12 a células B productoras de BO2C11. La línea celular linfoblastoide BO2C11 portadora del anticuerpo de superficie se incubó con el Ac 14C12 (panel superior) o con un anticuerpo ficticio de la misma subclase (panel inferior). El desplazamiento hacia la derecha de la curva mostrada en el panel superior indica que el 68% de la línea celular linfoblastoide BO2C11 es reconocido por el Ac 14C12.

35 Ejemplos

EJEMPLO 1: Generación de un Ac monoclonal contra el inhibidor FVIII BO2C11.

- Para la generación de anticuerpos antiidiotípicos en ratones se usó el anticuerpo BO2C11 humano OgG4 kappa humano específico del factor VIII. Las propiedades de BO2C11 se describen en Jacquemin et al (1998) *Blood* 92,496-506. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de las cadenas ligera y pesada de BO2C11 se divulgan en la solicitud de patente PCT WO01/04269.

- Ratones Balb/c se inmunizaron en la almohadilla de la pata con BO2C11 emulsionado en adyuvante de Freund, primero completo y después incompleto. Tras 4 de estas inyecciones, los sueros de ratón se analizaron en un sistema ELISA para detectar la presencia de anticuerpos que reconocen BO2C11, pero no otros anticuerpos anti-FVII o anticuerpos no relacionados del mismo isotipo. Esplenocitos de ratones productores de anticuerpos anti-BO2C11 específicos se condensaron con una línea de células de mieloma para producir clones de células B (Kohler G y col., en (1978) *Eur J Immunol* 8 : 82-88.). Éstos se expandieron e cultivo y se analizó la especificidad de BO2C11. Un clon, 14C12, se unió de forma efectiva a las placas de poliestireno revestidas con BO2C11.

- La línea celular 14C12 se depositó el 30 de julio de 2001 en la Colección Coordinada de Bélgica de Microorganismos (BCCM), LMBP (colección de plasma, Laboratorium voor Moleculaire Biologie, Universiteit, K.L. Ledeganckstraat 35, 9000 Gent, Bélgica), con número de registro LMBP 5878CB.

EJEMPLO 2: Propiedades in vitro del anticuerpo antiidiotípico obtenido de la línea celular 14C12.

Las propiedades del anticuerpo antiidiotípico (Ac 14C12) obtenido de la línea celular 14C12 se analizaron en sistemas de ensayo in vitro. Se demostró que el Ac 14C12 se unía a BO2C11 e inhibía, de forma dependiente de la dosis, la unión de BO2C11 a su antígeno diana, el dominio C2 del FVIII-. Además, también se evaluó la capacidad del Ac 14C12 para neutralizar las propiedades inhibitoras de FVIII del BO2C11 en un ensayo de coagulación funcional. El ensayo cromogénico (Faktor VIII chromogen test, Dade Behring, Marburg, Alemania) se basa en la conversión de un sustrato incoloro que es escindido específicamente por la trombina. El sistema de ensayo contiene cada reactivo requerido para producir trombina, a excepción de FVIII. Así, la intensidad del desarrollo del color en el tiempo es proporcional a la cantidad de FVIII añadido al sistema. La adición de BO2C11 (0,1 µg/ml) inhibe completamente la conversión dependiente de FVIII (0,3 UI/ml) del sustrato. Al ensayo cromogénico se añadió BO2C11 a una concentración final de 0,1 µg/ml, que se determinó como la concentración mínima de BO2C11 capaz de inhibir el 100% de FVIII (0,3 UI/ml) en el sistema del ensayo. Diferentes concentraciones del Ac 14C12 se preincubaron con esta cantidad fija de BO2C11 antes de la adición de FVIII. Después, se aplicó la mezcla al ensayo cromogénico.

La figura 2 muestra que la adición de Ac 14C12 al sistema de ensayo neutraliza de un modo dependiente de la dosis la capacidad inhibitora de BO2C11. Además, se obtiene una neutralización del 50% a una proporción molar de 1/1 con BO2C11.

La capacidad del Ac 14C12 para neutralizar los anticuerpos policlonales anti-FVIII se analizó en un ensayo cromogénico, tal como se ha descrito anteriormente. Con este fin, los anticuerpos policlonales del paciente del que se obtuvo BO2C11 se añadieron al sistema como sustituto de BO2C11. En estas condiciones se obtuvo hasta un 60% de neutralización tras la adición de diluciones en serie del Ac 14C12. Se sabe que dicha preparación de anticuerpo policlonal contiene una cantidad significativa de anticuerpos dirigidos contra la cadena pesada de FVIII, es decir, contra epítomos completamente distintos del dominio C2. Así, se concluyó que el 60% de la neutralización de la inhibición observada con los anticuerpos policlonales es una subestimación de la capacidad del Ac 14C12 para neutralizar el inhibidor anti-C2.

Además, el Ac 14C12 neutralizó significativamente las propiedades inhibitoras de los anticuerpos policlonales de pacientes no relacionados. Así, se añadieron anticuerpos policlonales a diferentes diluciones en un ensayo de inmunoprecipitación en el que los dominios de FVIII radiomarcados se producen mediante transcripción/traducción combinada usando reticulocitos de conejo (Promega kit, TNT couplet reticulocyte lystate, Madison, EE.UU.). La cantidad traza de los dominios radiomarcados producida se mezcla con muestras de anticuerpos y proteína A sefarosa. Las perlas de sefarosa se añaden a una concentración a la cual se capturan esencialmente todos los anticuerpos. Después de centrifugar y lavar, se cuenta la radioactividad en las muestras, que es proporcional a la presencia de anticuerpos con especificidad por el fragmento de FVIII analizado. Así, se añadieron anticuerpos policlonales de 6 pacientes no relacionados con hemofilia A e inhibidor frente al dominio C2 a una concentración definida en un ensayo en el que se tradujo el dominio C2. Después, a todas las muestras se añadió Ac 14C12 a concentraciones crecientes. Tres de las 6 muestras dieron una neutralización significativa (aprox. 50%) de las propiedades inhibitoras de los anticuerpos policlonales, lo que muestra que el Ac 14C12 reconoce un epítipo expresado habitualmente en anticuerpos anti-C2 humanos.

EJEMPLO 3: Propiedades in vivo del Ac 14C12.

La capacidad del Ac 14C12 para neutralizar la propiedad inhibitora de FVIII de BO2C11 in vivo se analizó en ratones FVIII-/- C57Bl/6 reconstituidos con FVIII recombinante humano (Singh I y col., en (2002) *Blood* 99: 3235-3240).

Dichos ratones se consideran un modelo animal adecuado para la hemofilia A, en cuanto a que no se puede detectar actividad de FVIII o antigénica, con un fenotipo, por lo contrario, normal (Reipert BM y col., en *Thromb Haemost* 2000; 84: 826-32). La administración de 1 UI de FVIII humana en la vena de la cola de ratones FVIII-/- C57Bl/6 tuvo como resultado una concentración plasmática de 110 ng/ml tras 10 minutos, es decir \pm 60% de la concentración normal de FVIII en plasma humano (1 UI o 192 ng/ml). Cuando se inyecta primero en estos ratones 0,5 µg de BO2C11, la actividad procoagulante de FVIII se inhibe en un 98%. Después, el modelo se usó para determinar si el Ac 14C12 tenía la capacidad para neutralizar la inhibición dependiente de BO2C11 de FVIII. Así, diferentes concentraciones del Ac 14C12 se mezclaron con una cantidad fija de BO2C11 (0,5 µg) antes de la inyección del complejo en ratones FVIII-/- o directamente se infundieron en los ratones, seguido de 0,5 µg de BO2C11 y 1 UI de FVIII.

La preadministración de 0,5 µg de BO2C11 inhibió el 98% de la actividad procoagulante de FVIII (Fig. 2A). La cantidad fija de BO2C11 se preincubó con varias concentraciones de Ac 14C12 (0,1 a 10 µg) y la mezcla se infundió en ratones FVIII-/-. Se observó una neutralización dependiente de la dosis de la inhibición del FVIII mediada por BO2C11 (Fig. 2B). El experimento se repitió, pero con administración secuencial de Ac 14C12, seguido de BO2C11 y FVIII, dando una neutralización idéntica dependiente de la dosis mediada por 14C12.

A partir de las Figuras 2A, 2B y 2C se puede ver que el Ac 14C12 neutraliza de un modo dependiente de la dosis las

propiedades de inhibición de BO2C11, confirmando de este modo el potencial del Ac 14C12 como terapia para pacientes de hemofilia A con inhibidor frente al dominio C2 del FVIII. Es interesante el hecho de que, como se muestra en los ensayos in vitro, se obtenía un 50% de neutralización a una proporción equimolar entre BO2C11 y Ac 14C12. Un exceso molar del Ac 14C12 de 3,5 bastó para neutralizar completamente BO2C11 y restablecer una actividad procoagulante normal del FVIII.

EJEMPLO 4: Característica de unión del Ac 14C11 a BO2C11

Se llevó a cabo una evaluación bioquímica exhaustiva del Ac 14C12. El Ac 14C12 se une con afinidad elevada a BO2C11, con valores de k_{on} y k_{off} de $10^5 \text{ m}^{-1}\text{s}^{-1}$, 10^{-5}s^{-1} respectivamente, medidas usando un sistema de resonancia en plasmón superficial. Los dominios VH y VL del Ac 14C12 se secuenciaron mediante procedimientos convencionales (figura 3). Así, el Ac 14C12 pertenece a la familia de anticuerpos de cadena pesada IJ1, con una cadena ligera kappa. La capacidad del Ac 14C12 para inhibir la unión de BO2C11 al dominio C2 de FVIII urgió a los inventores a comparar la secuencia de los dominios VH y VL del Ac 14C12 con la de C2. Las CDR1 y CDR2 de VH contienen 6 y 7 residuos de aminoácidos que son idénticos u homólogos al dominio C2, respectivamente. La CDR2 es casi idéntica a la región C2 de V2223-T2237, que contiene un sitio de unión a fosfolípido crucial y una serie de residuos de contacto para BO2C11. Además, en base a la secuencia de las partes variables de BO2C11 (Jacquemin MG et al en (1998) *Blood* 92: 496-506) y su estructura cristalina en asociación con C2 (Spiegel P.C. Jr. et al. en (2001) *Blood* 98: 13-19), se identificaron los residuos de contacto sustitutos entre BO2C11 y el Ac 14C12, algunos de los cuales se localizan dentro de la estructura de las partes variables de BO2C11. En conjunto, estos datos muestran que la parte variable de la cadena pesada del Ac 14C12 contiene tanto una imagen interna de C2 formada por 13 residuos aminoácidos idénticos u homólogos y una serie de residuos de contacto para la parte variable de BO2C11.

Así, el Ac 14C12 representa el primer ejemplo de un anticuerpo antiidiotípico dirigido contra el dominio C2 de FVIII, cuya administración restablece la actividad de FVIII in vivo en un modelo murino de hemofilia A. Como tal, divulga una terapia efectiva para pacientes de hemofilia A con inhibidores del FVIII.

Para determinar si otro anticuerpo antiidiotípico contra un inhibidor del dominio C1 del FVIII, denominado B6A2C1 (Gilles JG et al en (1999) *Blood* 94, resumen 2048, 460a), puede interferir en la unión de BO2C11 a FVIII, se realizaron diluciones seriadas de este anticuerpo y se analizó su capacidad para inhibir la unión de BO2C11 a placas de poliestireno revestidas con FVIII. La figura 4 muestra que no se producía inhibición, lo que indica que B6A2C1 no expresaba especificidad por BO2C11.

EJEMPLO 5: Análisis de la homología entre el Ac 14C12 y el dominio C2 de FVIII

Las propiedades in vitro e in vivo del anticuerpo antiidiotípico (Ac 14C12) descrito en los ejemplos 1 y 2, respectivamente (véase anteriormente) sugirieron que existe una extensa homología entre las partes variables del anticuerpo antiidiotípico y el dominio C2 de FVIII. Se ha obtenido la estructura cristalina del dominio C2 (Pratt K y col., en (1999) *Nature* 402: 439-442). Así, las secuencias de las partes variables de las cadenas pesada y ligera del Ac 14C12 se alinearon a las del dominio C2.

Se encontró una homología significativa con la región VH. La Tabla 1 muestra que se encontraron 31 residuos aminoácidos idénticos o similares. Esto incluyó 13 residuos asociados con regiones CDR, pero agrupadas con CDR1 (residuos H1-16) y CDR2 (residuos H3-6). Es interesante el hecho de que se observa una contribución significativa de los residuos localizados en las regiones estructurales (18 aminoácidos). Además, sólo dos residuos (marcados con un asterisco) de la región VH mutan con respecto a la secuencia de la línea germinal del Ac 14C12. Los 31 residuos están expuestos en la superficie de C2, de acuerdo con la estructura cristalina del dominio C2 (Pratt K y col., en (1999) *Nature* 402: 439-442), así como en la región VH del Ac 14C12. Una característica importante de esta alineación es que indica la implicación de uno de los dos sitios de unión a fosfolípidos en C2 formado por Leu2251 y Leu2252 (superficie total de 180Å²), que corresponde a Leu102 y Leu103 en la CDR3 de la VH del Ac 14C12, mientras que el segundo sitio (Met2199 y Phe2200) no está representado. En conjunto, estas observaciones indican que la región VH del Ac 14C12 en la configuración su línea germinal porta una homología extendida con el dominio C2. La figura 5 ilustra la superposición del dominio C2 con la región VH del Ac 14C12.

Otro aspecto importante de la información proporcionada en la Tabla 1 es que los residuos aminoácidos de VH del Ac 14C12 que imitan los residuos de la superficie del dominio C2 no forman parte de una secuencia continua, sino que se extienden sobre toda la VH (del residuo S7 al S121). Este hallazgo concuerda con la demostración de que los inhibidores del dominio C2 del FVIII se unen a epítopos conformacionales en lugar de a secuenciales (véase, por ejemplo, la estructura cristalina de BO2C11 y el dominio C2 en Spiegel P y col., (2001) *Blood* 98: 13-19).

EJEMPLO 6: Determinación de las regiones de interacción entre BO2C11 y Ac 14C12

La especificidad de un anticuerpo por un antígeno dado es, en general, dependiente de los residuos localizados en uno o dos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), a menudo localizadas en la región VH. La unión se produce correspondiente a las condiciones termodinámicas más favorables (Manivel y col., (2000) *Immunity* 13:611-620). Tras la posterior exposición al antígeno, se dice que la respuesta del anticuerpo madura, un proceso que implica la introducción aleatoria de mutaciones en las regiones VH y VL. A esto le siguió una selección basada

en la avidéz por el antígeno. Así, la avidéz de la unión de anticuerpos completamente maduros (que son los que se pueden detectar o aislar del repertorio natural de células B de los pacientes, en este caso frente a FVIII) depende de las fuerzas colaboradoras producidas por los residuos localizados a lo largo de las regiones VH y VL.

5 Para determinar si la interacción entre BO2C11 y el Ac 14C12 dependía de los residuos localizados en un número pequeño de regiones pequeñas dentro de la región VH o, por el contrario, su dependía de residuos dispersos por la totalidad de las regiones VH y VL, se realizó una alineación de secuencia entre las regiones VH y VL de BO2C11 y las regiones VH y VL del Ac 14C12. Los resultados mostrados en la Tabla 2 indican que los residuos extendidos por las regiones VH y VL de ambos anticuerpos dan lugar a una contribución significativa a las interacciones mutuas. Este dato confirma que un modo preferido de obtener anticuerpos antiidiotípicos para administración en pacientes con inhibidores de FVIII es usar anticuerpos anti-FVIII completos.

EJEMPLO 7: Neutralización de la actividad inhibidora de BO2C11 por fragmentos Fab del Ac 14C12

Se prepararon fragmentos Fab del Ac 14C12 mediante digestión con papaína en perlas de agarosa (Pierce, Rockford, IL) y se purificaron mediante pasos en una columna de proteína a Sefarosa, según los procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica.

15 Para evaluar la capacidad de los fragmentos Fab del Ac 14C12 para restablecer la función de FVIII en presencia del inhibidor BO2C11, primero los autores determinaron la concentración de BO2C11 necesaria para inhibir el 80% de la actividad de FVIII en un ensayo cromogénico funcional (Faktor VIII chromogen test, Dade Behring, Marburg, Alemania) usando 1 UI/ml del FVIII recombinante, tal como se describe en el Ejemplo 2 (véase anteriormente). La cantidad de BO2C11 necesaria para inhibir el 80% de la actividad de FVIII se mezcló con un volumen igual de varias concentraciones de fragmentos Fab del Ac 14C12. La mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C antes de la adición de FVIII recombinante. Tras 1 hora más de incubación a 37 °C se recuperó un alícuota de la mezcla y se añadió a los reactivos del ensayo cromogénico. Los experimentos control incluyeron FVIII recombinante incubado solo o con un Ac de especificidad no relacionada. La Figura 6 muestra que los fragmentos Fab neutralizan el 50% de la actividad inhibidora de BO2C11 a una proporción molar de 1/8 entre BO2C11/Fab del Ac 14C12.

EJEMPLO 8: Influencia del Ac 14C12 sobre la unión de FVIII a vWF y FL.

El dominio C2 del FVIII contiene el sitio de unión para fosfolípidos (FL) y los principales sitios de unión para el factor von Willebrand (vWF). La unión a los FL es esencial para la actividad fisiológica de FVIII, es decir la formación del completo de tenasa con FIX y FX. El vWF actúa como proteína chaperona, protegiendo al FVIII de la degradación precoz y su aclaramiento.

30 La capacidad del Ac 14C12 para inhibir la unión de FVIII a FL o a VWF se investigó del siguiente modo. Placas de microtitulación se revistieron con un anticuerpo anti-vWF, seguido de vWF purificado tal como se ha descrito en otros lugares (Jacquemin M y col., (1998) *Blood* 95: 156-163). Se prepararon diluciones del AC 14C12 (de 100 a 0,3 µg/ml) y un alícuota de cada dilución se añadió a las placas revestidas con vWF, seguido de la adición de FVII a una concentración final de 1 UI/ml. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. La unión de FVIII a las placas revestidas con vWF se detectó mediante la adición de 2 µg/ml de Acmo15 marcado con biotina (un anticuerpo anti-FVIII que reconoce un sitio distante del FVIII localizado en la cadena pesada), seguido de avidina-peroxidasa y un sustrato específico. Para evaluar la unión de FVIII a PL, las placas se revistieron con fosfatidilserina diluida a 10 µg/ml en metanol y el ensayo se realizó como para las placas revestidas con vWF.

40 No se observó inhibición de la unión de FVIII (y, por tanto, del dominio C2) a vWF o FL (Figura 7). Un experimento control en el que se substituyó Ac 14C12 por BO2C11 mostró inhibición completa de la unión de FVIII a placas revestidas tanto con vWF como con FL (datos no mostrados; véase la Figura 3 en Jacquemin M y col., (1998) *Blood* 95: 156-163). Así, se concluye que la extensa homología entre el dominio C2 y la VH del Ac 14C12 no es suficiente para interferir en la unión de FVIII a FL y/o VWF. Así, la administración del Ac 14C12 o de uno de sus derivados, como modo de terapia para pacientes que tiene inhibidores del dominio C2 no debería tener como resultado una inhibición indeseada de las propiedades funcionales de FVIII.

EJEMPLO 9: Influencia del Ac 14C12 sobre el aclaramiento de FVIII

El aclaramiento del FVIII de la circulación se debe, al menos en parte a la unión del dominio C2 al receptor LRP (Saenko y col., (1999) *J Biol Chem* 274: 37685-37692; Lenting y col., (1999) *J Biol Chem* 274: 23734-23739) y, por tanto, se podría reducir por la acción del Ac 14C12. Esto se analizó en ratones FVIII^{-/-} C57BL/6 reconstituidos mediante inyección en la cola de 1 UI de FVIII recombinante humano. Los cálculos previos han demostrado que la t1/2 media del FVIII humano en este modelo fue de 165 minutos. Para garantizar que el Ac 14C12 no modificaba el aclaramiento del FVIII, se inyectó en ratones C57BL/6 FVIII^{-/-} 10 µg/ml de Ac 14C12 o de un anticuerpo monoclonal de tipo IgG2a de especificidad no relacionada, seguido 15 minutos después de una inyección IV de 1 UI de FVIII recombinante. Las muestras de sangre se recogieron mediante venopunción tras 3 y 6 horas. La actividad residual de FVIII se evaluó usando un ensayo cromogénico funcional (Faktor VIII chromogen test, Dade Behring, Marburg, Alemania). No se observó una diferencia significativa en la t1/2 del FVIII en presencia del Ac 14C12, como se muestra en la Figura 8. La administración del Ac 14C12, o de uno de sus derivados, como modo de terapia para

pacientes que tienen inhibidores del dominio C2, no debería tener como alterar el aclaramiento fisiológico de FVIII.

EJEMPLO 10: Unión de Ac 14C12 a la línea de células B productoras de BO2C11.

Se puede usar Ac 14C12 dirigido a células B de memoria y algunas líneas de células B productoras de anticuerpos que inhiben la función de FVIII. Dichos linfocitos B se expresan en la superficie de una molécula de anticuerpo con regiones variables idénticas a las de la forma secretada del anticuerpo. La unión del Ac 14C12 a sus células diana se puede usar para transmitir una señal que daría lugar a la muerte celular, o apoptosis, de modo que purga el sistema inmunitario de células productoras de inhibidores anti-FVIII de un modo exquisitamente específico.

La línea de células B productoras de BO2C11 (Jacquemin M y col., (1998) Blood 95: 156-163) produce el anticuerpo BO2C11 soluble y expresa las partes variables del anticuerpo sobre su superficie. Para determinar si el Ac 14C12 podría unirse a la superficie celular, la línea celular BO2C11 se lavó en un tampón que contenía 0,5% de seroalbúmina bovina y EDTA 2 nM, se centrifugó a 400 g durante 5 minutos y se resuspendió en el mismo tampón a una concentración de 5×10^5 células en 100 μ l. Los anticuerpos, bien el Ac 14C12 o un anticuerpo de tipo IgG2a ficticio, se añaden después a la suspensión celular, usando dos concentraciones diferentes, bien 1 o bien 10 μ g/ml. Las mezclas se incuban durante 20 minutos en hielo, se lavan mediante centrifugación y resuspensión en tampón, tal como se ha descrito anteriormente. Un anticuerpo IgG anti-ratón acoplado a FITC se añade después a cada suspensión celular a una concentración final de 1 μ g/ml durante una incubación adicional en hielo durante 20 minutos. Por último, las suspensiones celulares se lavan mediante centrifugación y resuspensión en tampón como se ha indicado anteriormente. La suspensión final se efectuó para obtener una concentración celular de 1×10^5 en 500 μ l para contar en un clasificador celular activado por fluorescencia.

La Figura 9 muestra que, tras la incubación con Ac 14C12, la línea celular BO2C11 se marcó específicamente con el Ac 14C12, con el 68% de las células positivas para el anticuerpo mientras que un anticuerpo ficticio de la misma subclase no mostró ninguna reactividad.

Así, el Ac 14C12 se puede usar como reactivo específico de las células diana productoras de anticuerpos idénticos o similares a BO2C11, proporcionando de este modo un procedimiento para la inducción de la apoptosis en un contexto altamente específico.

Tabla 1

	VH 14C12		dominio C2
FW1	87	=	82175
	P9	=	P2177
	V12	±	M2180
	P14	±	82182
	A16	=	A2184
CDR1	A24	=	A2192
	825	=	82193
	G26	±	82194
	Y27	=	Y2195
	F29	=	F2196©
	T30	=	T2197©
FW2	W36	=	W2203
	K40	=	K2207
	043	±	L2210
	145	=	L2212
	W47	±	G2214
COR2	056	±	V2223©
FW3	877	±	P2226
	M81	±	L2230
	*E82	±	02231
	L83	±	V2232
	T87	=	T2237
	*A92	±	T2241
COR3	G101	±	82250©
	L102	=	L2251©
	L103	=	L2252©
	G105	±	82254
	0110	±	E2259
	V111	=	V2293
FW4	V120	±	L2302
	8121	±	T2303

Tabla 1: Alineación de secuencia entre la VH del Ac 14C12 y el dominio C2 de FVIII: Los residuos idénticos y

homólogos se indican con "=" y "±", respectivamente. Los residuos de VH mutados en ACNO 14C12 se muestra con un asterisco. Los supuestos residuos de C2 en contacto con AcMo 2C11 se indican con ©. CDR: Región determinante de la complementariedad; FW: estructura;

Tabla 2

HC 2C11		HC 14C12		
F	*567	>>	A16	F
W	G66	>	517	W
3	065	>	V18	1
	F64	>	K19	
C	*E63	>>	*L20	
D	A61	>>	C22	
R	2*555	>>	T28	
2	E54	>>	F29	
	*V48	>>	H35	
F	E46	>>	*L37	W
W				?
2				

LC 2C11		LC 14C12		
C	©Y33	>>	V120	F
D	©S32	>	5121	W
R	531	>	5122	4
1	©S30	>>	A123	
	*F29	>>	K124	C
	528	>>	T125	H
	526	>>	T126	1
	R24			
	C23			

HC 2C11		LC 14C12		
F	V18	>>	H41	F
1	P14	>>	R45	W
	K13	>>	L46	2
	K12	>>	L47	

LC 2C11		LC 14C12		
F	C89	>>	T69	F
	Y88	>>	*V70	W
	D83	>>	ir5	3
	E80	>	V78	
	L79	>	E79	
	R78	>	T80	
	I76	>	D82	
	T70	>>	C88	C
	568	>	090	D
	566	>	T92	R
	G65	>	593	3
	P60	>	W94	
	©T57	>	T97	
	*T54	>>	G100	
	553	>	G101	
	©Y50	>	L104	
	149	>	E105	

5

Tabla 2: Correspondencia de secuencia entre Acmo2C11 y Acmo14c12. La fuerza de las interacción se representa como ">>" y ">", respectivamente. Los residuos de VH mutados en ACNO 14C12 se muestran con un asterisco. Los supuestos residuos de C2 en contacto con AcMo 2C11 se indican con ©. CDR: Región determinante de la complementariedad; FW: estructura; CH1: primer dominio constante de la cadena pesada.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> D. Collen Research Foundation vzw
 Gilles, Jean Guy G
 Jaequemin, Marc
 5 Saint-Remy, Jean-Marie R

<120> Anticuerpos antiidiotípicos contra el inhibidor del Factor VIII y usos de los mismos

<130> C 2104 EP

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.1

10 <210>1
 <211>411
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (411)
 <223>

20 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (78) .. (111)
 <223> CDR1

25 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (150) .. (198)
 <223> CDR2

30 <220>
 <221> Región V
 <222>(1) .. (411)
 <223> Cadena pesada del anticuerpo monoclonal 14C12

<400> 1

35	gag gtc cag ctt cag cag tct gga cct gag ctg gtt aag cct ggg get Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15	48
	tea gtg aag ctg tee tge aag gct tet gga tac aca ttc act ago tet Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser 20 25 30	96
	gtt atg cae tgg etg aag eag aag tet ggg cag ggc ett gag tgg att Val Met His Trp Leu Lys Gln Lys Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	144

```

          35              40              45
gga tat att aat eet tae aat gat ggt act aag tae aat gag aag tte      192
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
      50              55              60

aca gee aag gee aca etg act tea gae aaa tee tee age aca gte tae      240
Thr Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
      65              70              75              80

atg gag ete age gge etg ace tet gag gae ttt geg gte tat tae tgt      288
Met Glu Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95

gca ega teg gga ggt tta eta ega ggt tae tgg tae tte gat gte tgg      336
Ala Arg Ser Gly Gly Leu Leu Arg Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
      100              105              110

gge gca ggg aee aeg gte ace gte tee tea gee aaa aea aca gee eea      384
Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro
      115              120              125

teg gte tat eee ttg gte eet gge 'tge      411
Ser Val Tyr Pro Leu Val Pro Gly Cys
      130              135

```

5 <210> 2
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (78)..(111)
 <223> CDR1

10 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (150)..(198)
 <223> CDR2

15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (297)..(333)
 <223> CDR2

<400> 2

```

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1              5              10              15

Ser Val Lys Leu Ser Cys' Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
      20              25              30

Val Met His Trp Leu Lys Gln Lys Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35              40              45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

```

50 55 60

Thr Ala Lys Ala **Thr** Leu **Thr** *Ber* *Asp* Lys *Ber* *Ber* *Bar* **Thr** Val **Tyr**
 65 70 75 80

Met Glu Leu *Bar* Gly Leu **Thr** *Bar* Glu *Asp* Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala **Arg** *Ber* Gly Gly Leu Leu Arg Gly Tyr **Trp** **Tyr** Phe *Asp* Val Trp
 100 105 110

Gly Ala Gly Thr **Thr** Val **Thr** Val *Ber* *Bar* Ala Lys Thr **Thr** Ala Pro
 115 120 125

Ber Val Tyr Pro Leu Val Pro Gly Cys
 130 135

5 <210> 3
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (369) <223>

10 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (72) .. (102)
 <223> CDR1

15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (150).. (168)
 <223> CDR2

20 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (267) .. (291)
 <223> CDR3

<220>
 <221> Región V
 <222> (1) .. (369)
 <223> Cadena ligera del anticuerpo monoclonal 14C12

25 <400> 3

gat ett gtg eta act **ca**g tet eca **g**cc ace etg tet **gtg** act eea gga 48
 Asp Leu Val Leu Thr Gln *Ber* Pro Ala **Thr** Leu *Ber* Val **Thr** Pro Gly
 1 5 10 15

gat agt **g**tc agt ett tee tgt **agg** **g**cc age eaa gat att ace aae ace 96
 Asp *Ber* Val *Bar* Leu *Ber* Cys **Arg** Ala *Ber* Gln Asp **Ile** **Thr** Asn **Thr**
 20 25 30

ett cae tgg **t**at cat eaa aaa tea cat gag tet eea agg ett etc ate 144
 Leu His **Trp** **Tyr** His Gln Lys *Ber* His Glu *Ber* Pro Arg Leu Leu Ile

ES 2 366 280 T3

aag tat gtt tee **cag** tee ate tet ggg ate eee tee agg tte agt gge 192
 Lys **Tyr** Val Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga **tca** ggg aea gtt tte act etc agt ate aae agt gtg gag act 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Leu Ser Ile **Asn** Ser Val Glu **Thr**
 65 70 75 80

gaa gat **ttt** gga gtg **tat** tte tgt eag eag agt ace age tgg eeg tae 288
 Glu Asp Phe Gly Val **Tyr** Phe Cys Gln Gln Ser Thr Ser **Trp** Pro **Tyr**
 85 90 95

aea tte gga ggg ggg aee aag ttg gaa ata aaa egg get gat get gea 336
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala **Asp** Ala Ala
 100 105 110

eca act gta tee ate tte eea eea tee agt gag 369
 Pro **Thr** Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120

- <210> 4
- <211> 123
- <212> PRT
- 5 <213> Mus musculus

- <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (72)..(102)
- <223> CDR1

- 10 <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (150)..(168)
- <223> CDR2

- 15 <220>
- <221> característica_misclánea
- <222> (267)..(291)
- <223> CDR3

<400> 4

Asp Leu Val. Leu **Thr** Gln Ser Pro Ala **Thr** Leu Ser Val. Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Asp Ser Val. Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Thr **Asn** Thr
 20 25 30

Leu His **Trp** **Tyr** His Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys **Tyr** Val Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Sar Gly **Thr** Val Phe **Thr** Leu Ser **Ile** Asn Ser Val Glu **Thr**
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Val **Tyr** Phe Cys Gln Gln Ser **Thr** Ser Trp Pro **Tyr**
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu **Ile** Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

Pro Thr Val Sar **Ile** Phe Pro Pro Sar Ser Glu
 115 120

<210> 5
 <211>12
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus
 <400>5

Gly **Tyr** Thr Phe Thr *Bar Bar* Val Met His Trp Leu
 1 5 10

<210> 6
 <211>18
 10 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 6

Gly **Tyr** **Ile** Asn Pro **Tyr** Asn Asp Gly **Thr** Lys **Tyr** Asn Glu Lys Phe
 1 5 10 15

Thr Ala

<210> 7
 15 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400>7

Bar Gly Gly Leu Leu Arg Gly **Tyr** Trp **Tyr** Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 8
 20 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400>8

Arg Ala Ser Gln Asp **Ile** Thr Asn Thr Leu His
 1 5 10

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <400>9

Tyr Val Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 10

Gln Gln Ser Thr Ser Trp Pro Tyr Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal antiidiotípico contra un anticuerpo inhibidor del Factor VIII humano, estando dicho anticuerpo inhibidor dirigido contra el dominio C2 del Factor VIII, que se caracteriza por el hecho de que las regiones determinantes de complementariedad de las cadenas pesadas variables de dicho anticuerpo antiidiotípico tienen las secuencias de aminoácidos representadas en la SEC ID Nº 5, SEC ID Nº 6 y SEC ID Nº 7, y las regiones determinantes de complementariedad de las cadenas ligeras variables de dicho anticuerpo antiidiotípico tienen las secuencias de aminoácidos representadas en la SEC ID Nº 8, SEC ID Nº 9 y SEC ID Nº 10, y por el hecho de que el anticuerpo antiidiotípico a) neutraliza la actividad anti-coagulante de dicho anticuerpo inhibidor del factor VIII humano en al menos un 50% en un ensayo cromogénico de FVIII y b) no interfiere en la unión de FVIII a vWF y fosfolípidos.
2. El anticuerpo antiidiotípico según la reivindicación 1, en el que la cadena pesada variable de dicho anticuerpo antiidiotípico está codificado por la secuencia nucleotídica representada en la SEC Nº 1 o una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95% con la SEC ID Nº 1, o en el que la cadena ligera variable del anticuerpo antiidiotípico está codificado por la secuencia nucleotídica representada en la SEC Nº 3 o una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95% con la SEC ID Nº 3.
3. El anticuerpo antiidiotípico según la reivindicación 1, en el que la cadena pesada variable de dicho anticuerpo antiidiotípico está codificado por la secuencia nucleotídica representada en la SEC Nº 1 o una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 70% con la SEC ID Nº 1, y en el que la cadena ligera variable del anticuerpo antiidiotípico está codificada por la secuencia nucleotídica representada en la SEC Nº 3 o una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 70% con la SEC ID Nº 3.
- 4 El anticuerpo antiidiotípico monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento Fab o una versión modificada de dicho fragmento.
- 5 El anticuerpo antiidiotípico monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un anticuerpo antiidiotípico monoclonal humanizado.
- 6 El anticuerpo antiidiotípico monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es 14C12 producido por la línea celular 14C12 depositada en la BCCM con el número de registro LMBP 5878CB o un fragmento de anticuerpo del mismo que contiene el sitio de unión al anticuerpo.
- 7 Una línea celular monoclonal que expresa un anticuerpo antiidiotípico monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 8 La línea celular monoclonal según la reivindicación 7, que es la línea celular 14C12 depositada en la BCCM con número de registro LMBP 5878CB.
- 9 Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antiidiotípico monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, mezclado con al menos un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 10 Uso de un anticuerpo antiidiotípico monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con hemofilia que sufre hemorragia, o para la prevención de hemorragias en dicho paciente.
- 11 Uso de un anticuerpo antiidiotípico monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la hemorragia incontrolada en un paciente de hemofilia con anticuerpos inhibidores de FVIII.
- 12 La composición farmacéutica según la reivindicación 9, que además comprende FVIII.
- 13 Un procedimiento para desarrollar anticuerpos antiidiotípicos monoclonales para la fabricación de un medicamento contra inhibidores del FVIII, comprendiendo dicho procedimiento inmunizar un animal no humano con anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio C2 del FVIII y cribar los esplenocitos INMORTALIZADOS DE DICHO ANIMAL Para la producción de anticuerpos que a) neutralizan la actividad anticoagulante de dichos anticuerpos inhibidores en al menos un 50% en un ensayo cromogénico de FVIII y b) no interfieren en la unión de FVIII a vWF y fosfolípidos.
- 14 Uso de los anticuerpos antiidiotípicos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la detección o purificación *in vitro* de anticuerpos inhibidores de FVIII.

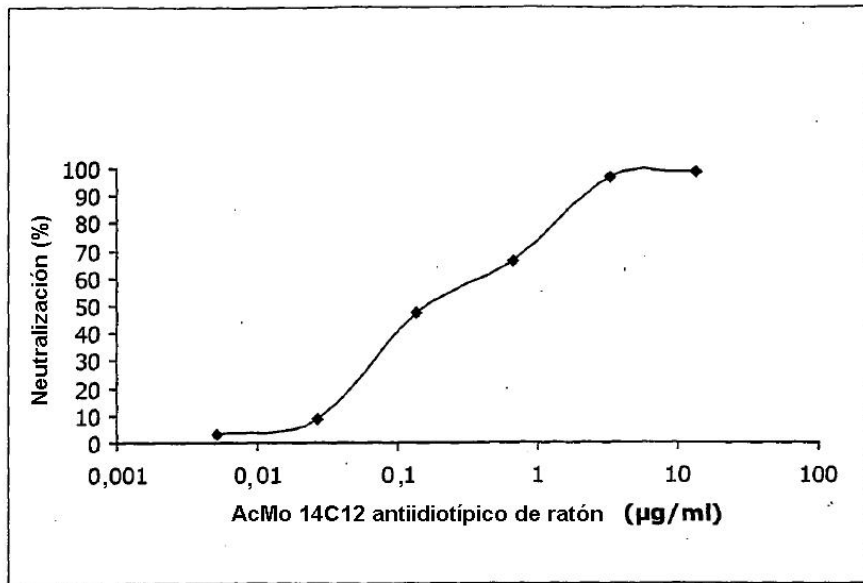


Figura 1

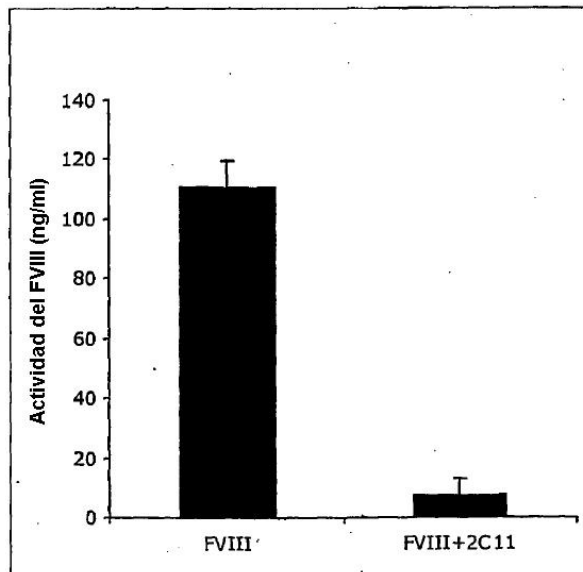


Figura 2A

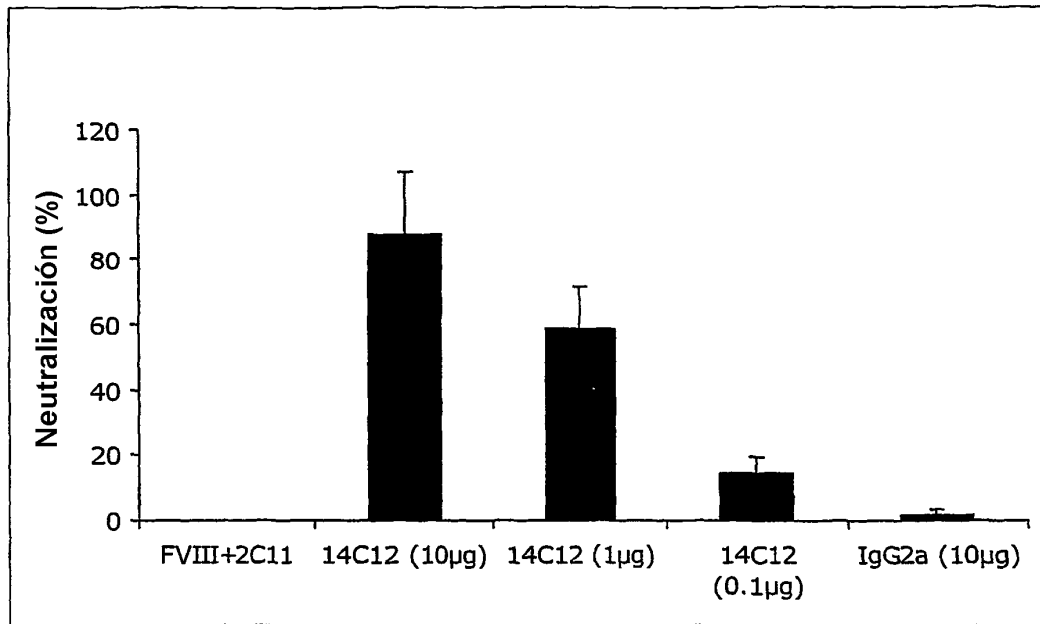


Figura 2b

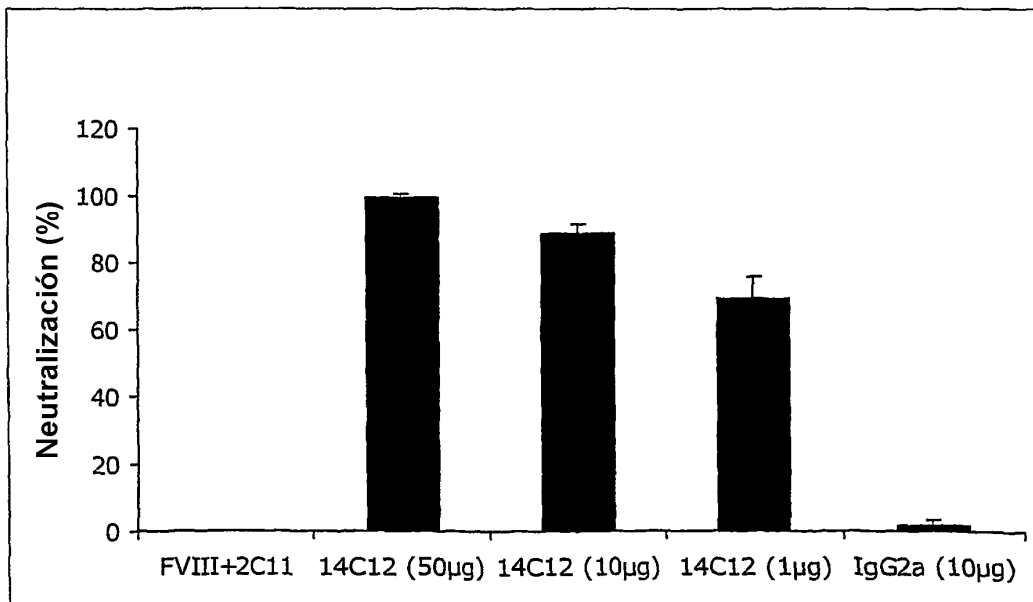


Figura 2c

```

GAG GTC CAG CTT CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTT AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG CTG
60
E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K L
20

TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC ACT AGC TCT GTT ATG CAC TGG CTG AAG CAG AAG
120
S C K A S G Y T F T S S V M H W L K Q K
40
-----CDR1 (G26-L37)-----

TCT GGG CAG GGC CTT GAG TGG ATT GGA TAT ATT AAT CCT TAC AAT GAT GGT ACT AAG TAC
180
S G Q G L E W I G Y I N P Y N D G T K Y
60
-----CDR2 (G50-A66)-----

AAT GAG AAG TTC ACA GCC AAG GCC ACA CTG ACT TCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GTC TAC
240
N E K F T A K A T L T S D K S S S T V Y
80
-----

ATG GAG CTC AGC GGC CTG ACC TCT GAG GAC TTT GCG GTC TAT TAC TGT GCA CGA TCG GGA
300
M E L S G L T S E D F A V Y Y C A R S G
100
-----

GGT TTA CTA CGA GGT TAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC
360
G L L R G Y W Y F D V W G A G T T V T V
120
CDR3 (S99-V111)-----

TCC TCA GCC AAA ACA ACA GCC CCA TCG GTC TAT CCC TTG GTC CCT GGC TGC
411
S S A K T T A P S V Y P L V P G C
137

```

Figura 3a

>14C12A11C

GAT CTT GTG CTA ACT CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT GTG ACT CCA GGA GAT AGT GTC AGT
 60
 D L V L T Q S P A T L S V T P G D S V S
 20

CTT TCC TGT AGG GCC AGC CAA GAT ATT ACC AAC ACC CTT CAC TGG TAT CAT CAA AAA TCA
 120
 L S C R A S Q D I T N T L H W Y H Q K S
 40

-----CDR1 (R24-H34)-----

CAT GAG TCT CCA AGG CTT CTC ATC AAG TAT GTT TCC CAG TCC ATC TCT GGG ATC CCC TCC
 180
 H E S P R L L I K Y V S Q S I S G I P S
 60

-----CDR2 (Y50-S56)-----

AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GTT TTC ACT CTC AGT ATC AAC AGT GTG GAG ACT
 240
 R F S G S G S G T V F T L S I N S V E T
 80

GAA GAT TTT GGA GTG TAT TTC TGT CAG CAG AGT ACC AGC TGG CCG TAC ACA TTC GGA GGG
 300
 E D F G V Y F C Q Q S T S W P Y T F G G
 100

-----CDR3 (Q89-T97)-----

GGG ACC AAG TTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA
 360
 G T K L E I K R A D A A P T V S I F P P
 120

TCC AGT gAG
 369
 S S E
 123

Figura 3b

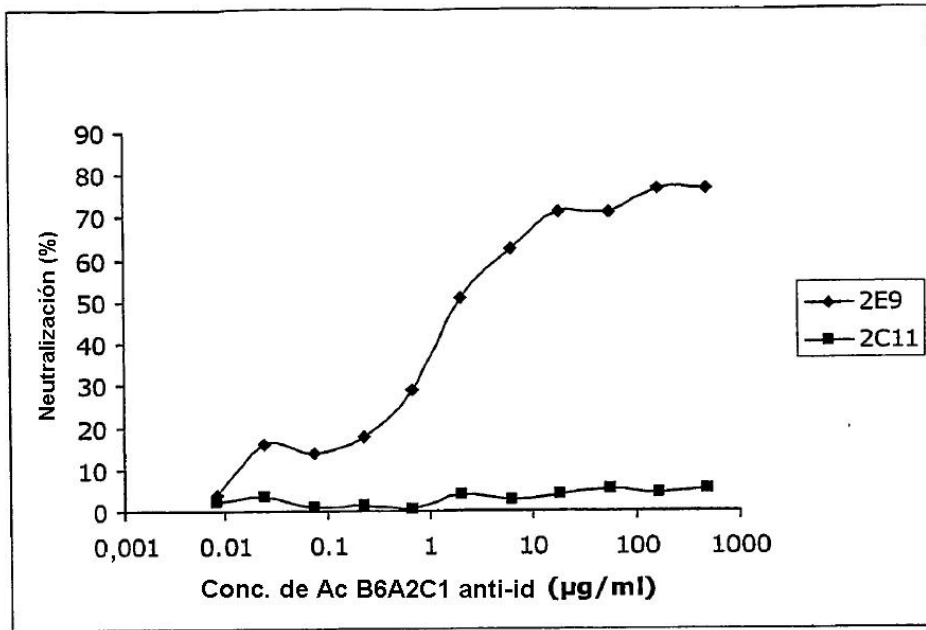


Figura 4

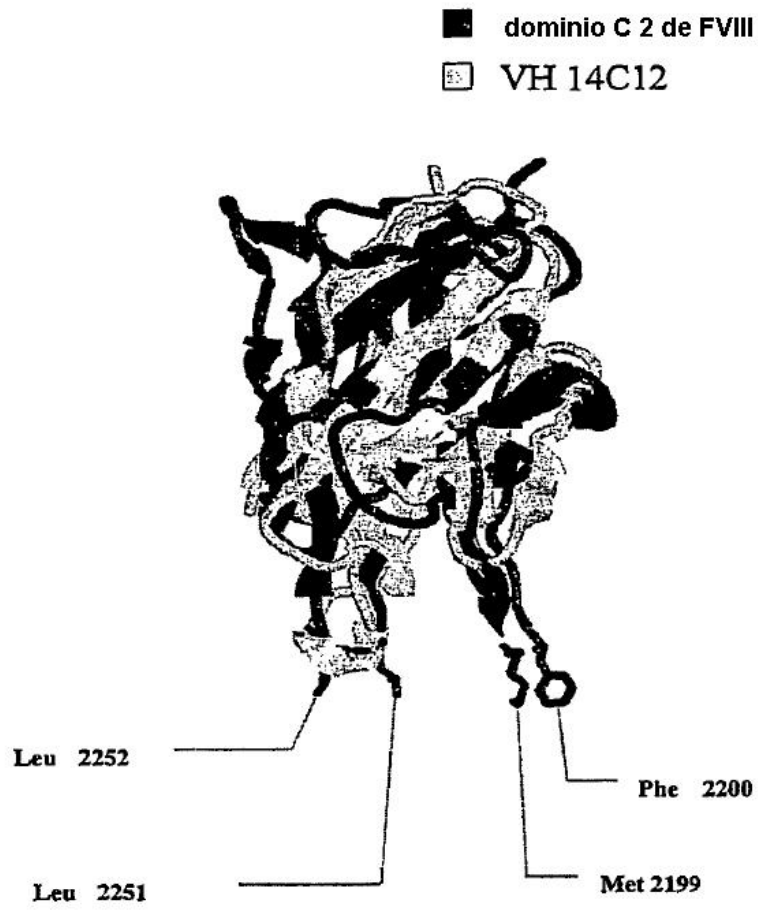


Figura 5

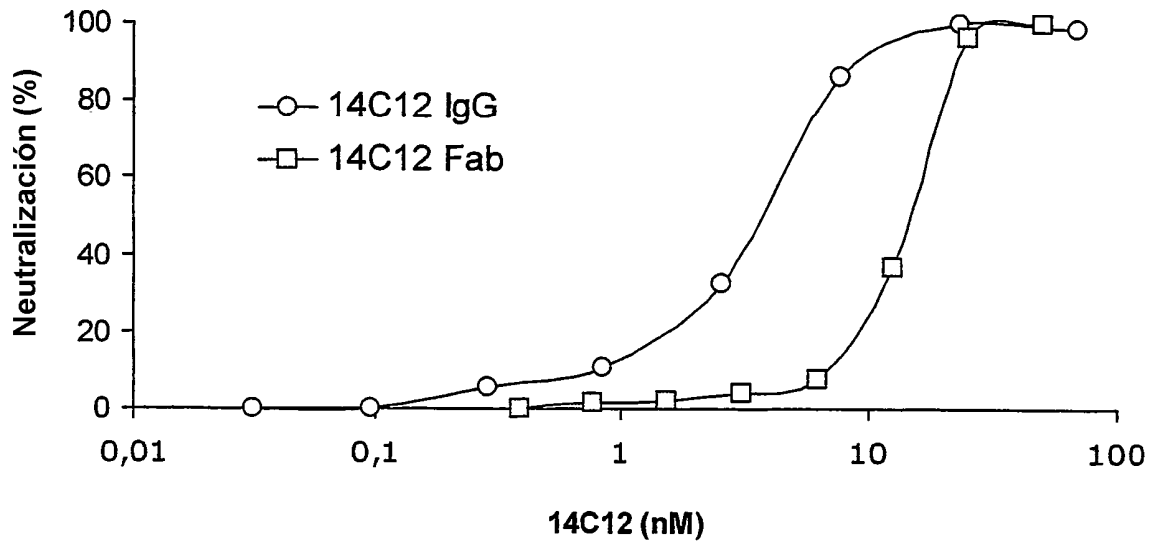


Figura 6

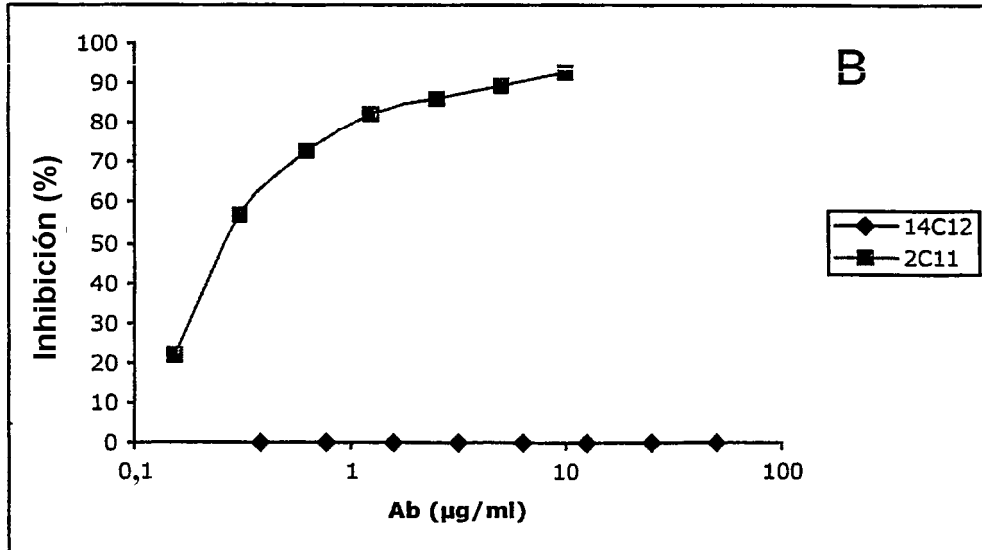
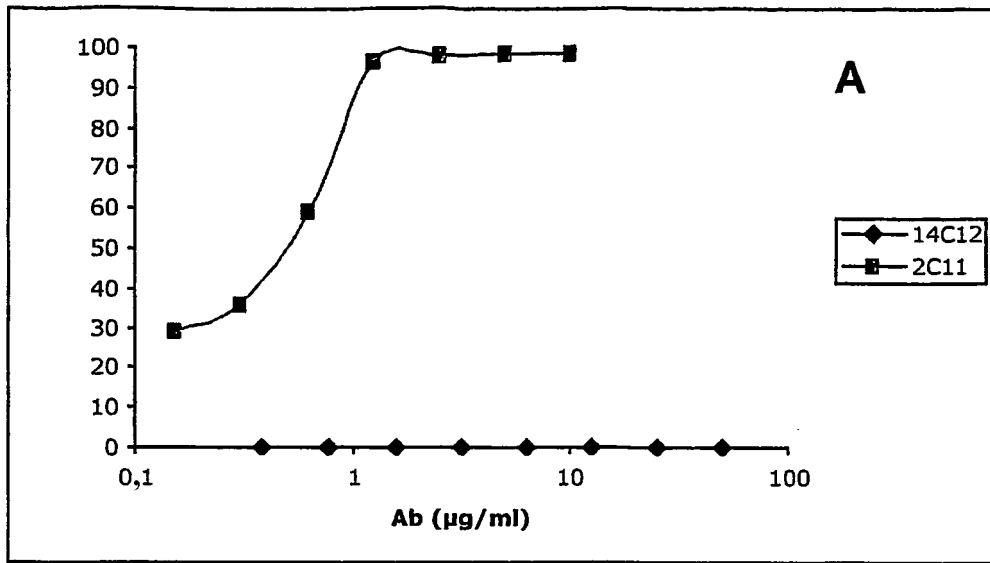


Figura 7

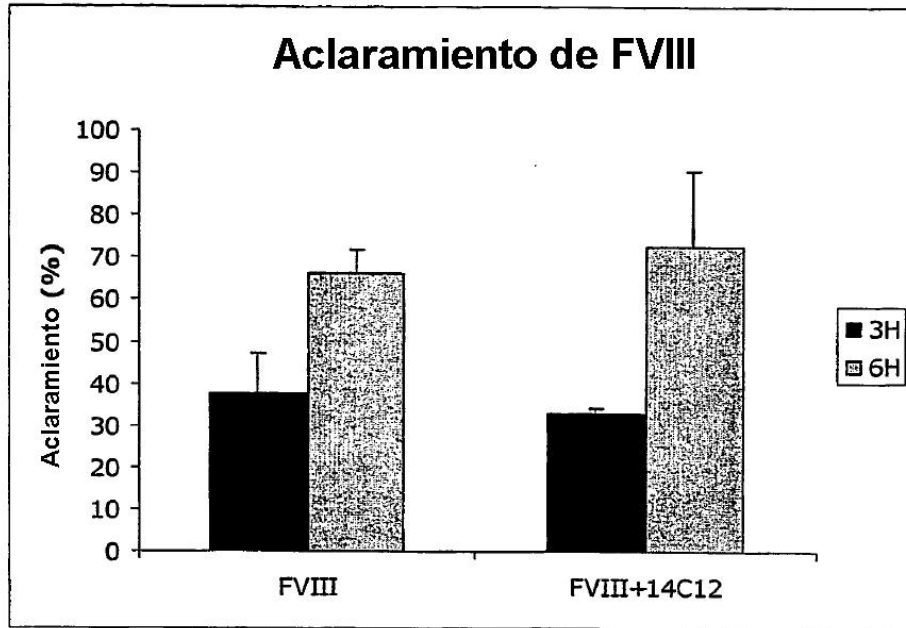


Figura 8

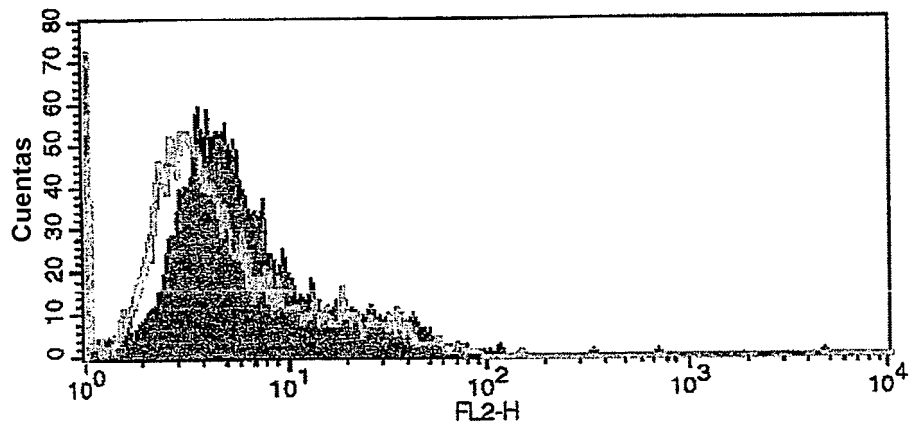
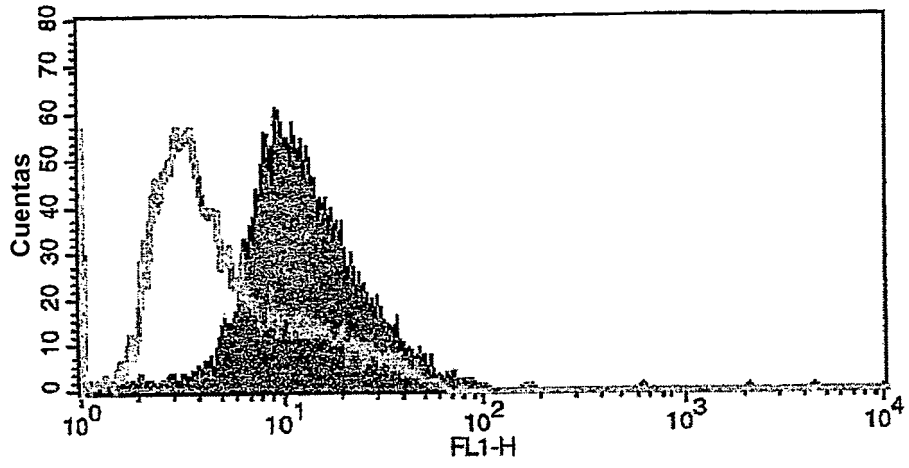


Figura 9