

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 489**

51 Int. Cl.:
C07K 16/42 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07731046 .4**
96 Fecha de presentación: **26.02.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1996626**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2008**

54 Título: **ANTICUERPOS ANTI-IDIOTÍPICOS QUE NEUTRALIZAN LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE UN ANTICUERPO INHIBIDOR DIRIGIDO CONTRA EL DOMINIO C1 DEL FACTOR VIII.**

30 Prioridad:
24.02.2006 FR 0601633

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.03.2012

73 Titular/es:
**LFB BIOTECHNOLOGIES
3 AVENUE DES TROPICQUES ZA DE
COURTABOEUF
91940 LES ULIS, FR**

72 Inventor/es:
**GILLES, Jean-Guy;
JACQUEMIN, Marc, G.;
SAINT-REMY, Jean-Marie y
BEHRENS, Christian**

74 Agente/Representante:
Sugrañes Moliné, Pedro

ES 2 376 489 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 anti-idiotípicos que neutralizan la actividad inhibitora de un anticuerpo inhibitor dirigido contra el dominio C1 del factor VIII.

Técnica anterior e introducción

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo inhibitor del factor VIII que se une al dominio C1 del factor VIII, así como a una línea celular que produce este anticuerpo monoclonal antiidiotípico, al uso de este anticuerpo monoclonal antiidiotípico como medicamento y, más particularmente, a su uso para fabricar un medicamento destinado al tratamiento de la hemofilia A.

10 **[0002]** La hemofilia A es una enfermedad hereditaria vinculada a una anomalía del cromosoma X, que se traduce en una incapacidad para coagular en las personas afectadas. Esta enfermedad es el resultado de mutaciones en el gen de una proteína que interviene en la coagulación, el factor VIII (FVIII), que determinan una ausencia total de factor VIII en la sangre o un déficit parcial. La hemofilia A es la más común de las deficiencias que afectan la coagulación sanguínea: en Francia, afecta a 1 hombre de cada 5000, lo que representa un 80% de los pacientes afectados de hemofilia. El otro tipo de hemofilia, la hemofilia B, afecta al 20% de los pacientes afectados de hemofilia; su causa es la deficiencia en otro factor de coagulación, el factor IX.

15 El tratamiento actual de la hemofilia (de tipo A o B) consiste en administrar, por vía intravenosa, el factor de coagulación deficiente o faltante. En Francia, el factor VIII destinado al tratamiento de las hemofilias está disponible tanto en forma de medicamentos derivados de la sangre, suministrados por el Laboratorio Francés de Fraccionamiento y Biotecnologías (LFB) o por laboratorios farmacéuticos internacionales, como en forma de
20 medicamentos recombinantes producidos por ingeniería genética. En efecto, el ADN que codifica para el factor VIII fue aislado y expresado en células de mamíferos (Wood et al., Nature (1984) 312: 330-337), y su secuencia en aminoácidos deducida a partir del ADNc.

25 El factor VIII (FVIII) secretado es una glicoproteína de masa molecular de 300 Kda (2332 aminoácidos) que juega un papel clave en la activación de la vía intrínseca de la coagulación. El FVIII inactivo está constituido por seis dominios: A1 (residuos 1-372), A2 (residuos 373-740), B (residuos 741-1648), A3 (residuos 1649-2019), C1 (residuos 2020-2172), y C2 (residuos 2173-2332), del extremo N- terminal al extremo C-terminal. Tras la secreción, el FVIII interactúa con el factor von Willebrand (vWF) que lo protege de las proteasas plasmáticas. El FVIII se disocia del vWF que es separado por la trombina. Esta separación logra que se elimine el dominio B y se forme un heterodímero. Con esta forma, el FVIII circula en el plasma. Este heterodímero está compuesto por una cadena pesada (A1, A2) y por una cadena liviana (A3, C1, C2).

30 Cuando se infunde en un paciente hemofílico, el factor VIII se fija al factor von Willebrand en la circulación sanguínea del paciente. El factor VIII activado actúa como cofactor del factor IX activado, acelerando la conversión del factor X en factor X activado. El factor X activado convierte la protrombina en trombina. La trombina convierte el fibrinógeno en fibrina y se forma un coágulo.

35 El principal problema que plantea la administración de factor VIII es que aparecen, en el paciente, anticuerpos dirigidos contra el factor VIII, llamados "anticuerpos inhibidores". Estos anticuerpos neutralizan la actividad procoagulante del factor VIII, que se vuelve inactivo apenas se infunde. En consecuencia, el factor de coagulación administrado se destruye antes de haber podido detener la hemorragia, lo que representa una complicación grave de la hemofilia, en virtud de la ineficacia del tratamiento. Además, algunos pacientes no hemofílicos genéticamente
40 pueden desarrollar inhibidores contra el factor VIII endógeno: se trata de una hemofilia adquirida.

Estudios demostraron que la respuesta inmune anti-factor VIII es de tipo IgG policlonal que pertenece, principalmente, a la subclase IgG4 e IgG1 y, menos frecuentemente, IgG2. Las IgG3 no se representan nunca. La cadena liviana suele ser de tipo Kappa. La sobrerepresentación de las IgG4 es más acentuada en los hemofílicos que tienen un inhibidor instalado desde hace mucho tiempo. Los dominios C2 y A2 de la molécula de FVIII son los blancos privilegiados de la respuesta inmune aunque, en algunos casos, se detectan anticuerpos dirigidos contra el dominio A3. Al pasar el plasma de pacientes hemofílicos a través de una columna de inmunoadsorción en la que se inmoviliza el FVIII, se pueden purificar los anticuerpos totales anti-FVIII. Las cantidades recogidas suelen superar 100µg por 10mg de IgG totales (Gilles JG et al. (1993) Blood; 82: 2452-2461). Se desarrolló un modelo animal para estudiar la formación de inhibidores del factor VIII; ratas inmunizadas con factor VIII humano recombinante muestran una respuesta inmune rápida, de tipo policlonal (Jarvis et al. Thromb Haemost. 1996 Feb; 75(2):318-25). Los mecanismos por los cuales los anticuerpos anti-factor VIII interfieren con la función del factor VIII son numerosos e incluyen la interferencia en la proteólisis del factor VIII y en la interacción del factor VIII con diferentes asociados como el factor Von Willebrand (vWF), los fosfolípidos (FL), el factor IX, el factor X activado (FXa) o la APC (Activated Protein C). Hay muchos tratamientos que permiten atenuar las consecuencias de esta respuesta inmune, por ejemplo, los tratamientos que involucran la desmopresina, una hormona sintética que estimula la producción de factor VIII, los agentes promotores de la coagulación, como los concentrados de complejos protrombínicos o los
55

concentrados de complejos protrombónicos activados, el factor VIIa recombinante, la plasmaféresis y las infusiones de cantidades importantes o intermedias de factor VIII. No obstante, estos métodos son muy costosos y poco eficaces.

Debido a la complejidad de analizar *in vivo* esta respuesta inmune policlonal, se aislaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra algunos dominios del factor VIII. Así, se aisló un anticuerpo humano monoclonal de tipo IgG4kappa, LE2E9. Este anticuerpo se dirige contra el dominio C1 del factor VIII e inhibe la actividad cofactor del factor VIII y su unión con el factor Von Willebrand (Jacquemin et al. (2000) Blood 95:156-163). Del mismo modo, se aisló un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra el dominio C2 del factor VIII, llamado BO2C11 (IgG4kappa) producido a partir de un repertorio de células de memoria B de un paciente afectado de hemofilia A con inhibidores (Jacquemin et al. Blood 1998 Jul 15;92(2):496-506). BO2C11 reconoce el dominio C2 del factor VIII e inhibe su unión con el factor Von Willebrand y los fosfolípidos. Inhibe totalmente la actividad procoagulante del factor VIII nativo y activado. Otro ejemplo de anticuerpo monoclonal es el anticuerpo BOIIB2, dirigido contra el dominio A2 del factor VIII. El anticuerpo BOIIB2 inhibe la actividad del factor VIII en un 99%. Al unirse al dominio A2, puede interferir e inhibir la fijación del FIXa que posee un sitio de fijación de poca afinidad en esta región del FVIII y, por consiguiente, inhibir la actividad enzimática del FIXa. El segundo modo de acción que puede considerarse es su interferencia en el equilibrio entre la forma heterodimérica (A2:A1 y A3:C1:C2) del FVIII y la forma heterotrimérica (A2 y A1 y A3:C1:C2) del FVIII acelerando la disociación del dominio A2 de estos complejos, volviéndolos no funcionales. (Ananyeva NM et al (2004) Blood Coagul Fibrinolysis. Mar;15(2):109-24. Review). Gracias a estas nuevas herramientas, otra estrategia de lucha contra los anticuerpos inhibidores del factor VIII, más reciente, considera la administración de anticuerpos antiidiotípicos (anticuerpos que tienen la capacidad de interactuar con la región variable de otros anticuerpos) que neutralizan los anticuerpos inhibidores (Saint-Rémy JM et al. (1999) Vox Sang; 77 (suppl 1): 21-24). Un anticuerpo antiidiotípico murino, el 14C12, descrito en el documento WO 2004/014955, neutraliza, *in vivo*, de modo dosis-dependiente, las propiedades inhibitoras del anticuerpo antifactor VIII diana (el anticuerpo monoclonal BO2C11), que se dirige contra el dominio C2 del factor VIII. Como la respuesta inmune anti-factor VIII es policlonal, también se desarrollaron (y se describieron en el documento FR 05 08320) los anticuerpos antiidiotípicos murinos dirigidos contra el dominio A2 del factor VIII. El dominio A2 es un dominio de 43 kD cuya función no se conoce mucho, pero se demostró que los anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio A2 del factor VIII inhiben la función del factor VIIIa inhibiendo la conversión del complejo FXase/FX en estado de transición (Lollar et al. J Clin Invest. 1994 Jun; 93(6): 2497-504, Fay et al. J Biol Chem. 1996; 271(11): 6027-6032).

Sin embargo, la respuesta inmune dirigida contra el factor VIII es policlonal y, en consecuencia, involucra anticuerpos inhibidores dirigidos contra dominios que no son los dominios A2 y C2. En efecto, si bien el estudio de las especificaciones epitópicas de los anticuerpos antifactor VIII reveló que la mayoría de los inhibidores reconoce zonas restringidas de la molécula de factor VIII ubicadas en el dominio A2 de la cadena pesada y/o en el dominio C2 de la cadena liviana, en algunas ocasiones se reconocieron otros epítomos. En efecto, algunos plasmas de pacientes contienen anticuerpos capaces de unirse al dominio C1 de la cadena liviana del factor VIII (Moreau et al. 2000; 95(11): 3435-441; Jacquemin et al. 2000; 95(1):156-162).

[0003] En consecuencia, se necesitan otras herramientas que permitan neutralizar otros anticuerpos inhibidores del factor VIII dirigidos contra otros dominios del factor VIII, para neutralizar, de modo más integral, las respuestas policlonales anti-factor VIII de los pacientes hemofílicos.

[0004] Por ello, la solicitante buscó implementar una nueva herramienta para tratar la hemofilia A que permita neutralizar anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio C1 del factor VIII.

Descripción detallada de la invención

[0005] Un primer objeto de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal antiidiotípico, como se define en las reivindicaciones, dirigido contra un anticuerpo humano inhibidor del factor VIII. El anticuerpo inhibidor se dirige contra el dominio C1 del factor VIII.

[0006] Las secuencias se definen según Kabat [Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", NIH Publication, 91-3242 (1991)].

[0007] "Anticuerpos inhibidores" o "inhibidores" del factor VIII son los anticuerpos que inhiben toda o parte de la actividad procoagulante del factor VIII, particularmente fijándose a este y, particularmente, un anticuerpo anti-factor VIII cuyo epítipo está ubicado en el factor VIII. De manera ventajosa, el anticuerpo según la invención tiene la capacidad de neutralizar al menos el 20%, ventajosamente al menos el 30%, ventajosamente al menos el 40%, ventajosamente al menos el 50%, ventajosamente al menos el 60% y, de manera aún más ventajosa, al menos el 70%, el 80%, el 90%, el 99% ó el 100% de la actividad inhibitora de la coagulación de los anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio C1 del factor VIII, diana de los anticuerpos monoclonales antiidiotípicos según la invención. Esta capacidad de neutralización de la actividad inhibitora de la coagulación de los anticuerpos inhibidores puede determinarse midiendo la actividad del factor VIII en presencia de un anticuerpo inhibidor y de un

anticuerpo antiidiotípico mediante un test tal como "factor VIII chromogen test" (Jacquemin et al (1998) Blood 92, 494-506).

5 **[0008]** La expresión "anticuerpo antiidiotípico" designa un anticuerpo dirigido contra la región variable de los anticuerpos inhibidores diana. En un aspecto particular de la invención, el anticuerpo antiidiotípico según la invención se dirige contra anticuerpos inhibidores cuyo dominio variable de la cadena pesada se parece a la línea germinal DP-10. Estos anticuerpos inhibidores pueden obtenerse a partir de seres humanos (por ejemplo, del suero de pacientes que presentan anticuerpos inhibidores) o de otras especies animales como el ratón, el caballo, la cabra, primates no humanos (la lista no es limitativa), mediante inmunización con el factor VIII o fragmentos derivados del factor VIII y, más particularmente, con un fragmento que incluye todo o parte del dominio C1. De modo ventajoso, el anticuerpo inhibidor diana del anticuerpo antiidiotípico según la invención reconoce el dominio C1 en su configuración nativa. Ventajosamente, el anticuerpo inhibidor diana del anticuerpo antiidiotípico según la invención no reconoce el mismo dominio con una mutación R2150H.

15 **[0009]** El anticuerpo monoclonal antiidiotípico según la invención puede ser de origen humano o animal. Además, puede obtenerse de diferentes maneras. Por ejemplo, las células que producen anticuerpos antiidiotípicos pueden obtenerse a partir de linfocitos de sangre periférica de pacientes que presentan anticuerpos inhibidores anti-factor VIII o a partir de individuos sanos. Estas células pueden immortalizarse mediante técnicas muy conocidas por el experto en la materia y seleccionarse respecto de la capacidad de los anticuerpos antiidiotípicos producidos para neutralizar los anticuerpos inhibidores dirigidos contra el factor VIII. Otra manera de producir el anticuerpo antiidiotípico monoclonal según la invención es la inmunización de animales, ventajosamente ratones, inyectando anticuerpos inhibidores del factor VIII dirigidos contra el dominio C1 del factor VIII y fusionando linfocitos de rata con una línea celular de mieloma, ventajosamente mieloma de ratón, y la posterior identificación y clonado de cultivos celulares que producen los anticuerpos antiidiotípicos dirigidos contra los anticuerpos inhibidores del factor VIII.

25 **[0010]** Cada región CDR de cada una de las cadenas livianas del anticuerpo antiidiotípico descrito en la presente invención posee una secuencia peptídica con al menos el 70% de identidad con las secuencias de las regiones CDR de las cadenas livianas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6, y cada región CDR de cada una de sus cadenas pesadas posee una secuencia peptídica con al menos el 70% de identidad con las secuencias de las regiones CDR de las cadenas pesadas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6. De este modo, la región CDR1 de cada una de las cadenas livianas del anticuerpo descrito en la presente solicitud posee una secuencia peptídica con al menos el 70% de identidad con la secuencia de la región CDR1 de las cadenas livianas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6, la región CDR2 de cada una de las cadenas livianas del anticuerpo descrito en la presente solicitud posee una secuencia peptídica con al menos el 70% de identidad con la secuencia de la región CDR2 de las cadenas livianas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6, la región CDR3 de cada una de las cadenas livianas del anticuerpo descrito en la presente solicitud posee una secuencia peptídica con al menos el 70% de identidad con la secuencia de la región CDR3 de las cadenas livianas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6 y la región CDR1 de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo de la región descrito en la presente solicitud, posee una secuencia peptídica con al menos el 70% de identidad con la secuencia de la región CDR1 de las cadenas pesadas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6, la región CDR2 de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo de la región CDR3 de las cadenas livianas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6 posee una secuencia peptídica con al menos el 70% de identidad con la secuencia de la región CDR2 de las cadenas pesadas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6, y la región CDR3 de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo descrito en la presente solicitud posee una secuencia peptídica con al menos el 70% de identidad con la secuencia de la región CDR3 de las cadenas pesadas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6. De manera particularmente ventajosa, la identidad con cada una de las secuencias mencionadas anteriormente es de al menos el 80%, de modo preferente de al menos el 90%, el 95%, el 99% y, de modo más preferente aún, del 100% de identidad.

35 **[0011]** De manera ventajosa, la región variable de cada una de las cadenas livianas del anticuerpo monoclonal antiidiotípico descrito en la presente solicitud está codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que posee al menos el 70% de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de la región variable de las cadenas livianas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6, y la región variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo monoclonal antiidiotípico está codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que posee al menos el 70% de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de la región variable de las cadenas pesadas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6.

50 **[0012]** De manera particularmente ventajosa, la identidad de las secuencias es de al menos el 80% y, de modo preferente, de al menos del 95 al 99% de identidad. El porcentaje de identidad se calcula alineando dos secuencias que se compararán, y contando el número de posiciones que poseen un nucleótido idéntico, número que se divide por el número total de nucleótidos de la secuencia. La degeneración del código genético puede producirse por el hecho de que un mismo aminoácido pueda estar codificado por varios tripletes de nucleótidos diferentes. En todo caso, estas diferencias de secuencias no afectan en nada la afinidad del anticuerpo monoclonal para su diana, ni su capacidad para neutralizar la actividad inhibidora de los anticuerpos inhibidores diana. En un aspecto preferente de

la invención, la región variable de cada una de las cadenas livianas del anticuerpo monoclonal antiidiotípico está codificada por la secuencia de ácido nucleico de la región variable de las cadenas livianas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6, y la región variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo monoclonal antiidiotípico está codificada por la secuencia de ácido nucleico de la región variable de las cadenas pesadas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6. De manera ventajosa, la secuencia peptídica de cada una de las regiones variables de las cadenas livianas del anticuerpo descrito en la presente solicitud es una secuencia que posee al menos el 70% de identidad y, de manera ventajosa, al menos el 80% o el 90% y, de manera más ventajosa aún, al menos el 99% de identidad con la secuencia peptídica de la región variable de las cadenas livianas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6.

5
10 **[0013]** De manera ventajosa, la secuencia peptídica de cada una de las regiones variables de las cadenas pesadas del anticuerpo descrito en la presente solicitud es una secuencia que posee al menos el 70% de identidad y, de modo ventajoso, al menos el 80% o el 90% y, de modo más ventajoso aún, al menos el 99% de identidad con la secuencia peptídica de la región variable de las cadenas pesadas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6.

15 **[0014]** De manera preferente, la región variable de cada una de las cadenas livianas del anticuerpo monoclonal antiidiotípico según la invención posee la secuencia peptídica de la región variable de las cadenas livianas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6 y la región variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo monoclonal antiidiotípico según la invención posee la secuencia peptídica de la región variable de las cadenas pesadas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6. De modo preferente, el anticuerpo inhibidor diana del anticuerpo antiidiotípico según la invención es el anticuerpo RHD5, depositado en la Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Plasmid Collection (BCCM/LMBP), Laboratorium voor Moleculaire Biologie, University of Ghent, Technologiepark 297, B-9052 Zwijnaarede, Bélgica, en agosto de 2004, por la Collen Research Foundation, con el número de acceso LMBP 6165CB. Este anticuerpo, así como sus secuencias nucleotídicas y peptídicas, se describe en el documento WO 2005/016455. El anticuerpo RHD5 es un anticuerpo monoclonal humano IgG1 dirigido contra el dominio C1 del factor VIII producido a partir de linfocitos de un paciente que presenta una hemofilia A, particularmente una hemofilia A adquirida, severa, con un alto nivel de inhibidores. Este anticuerpo pertenece a la subclase IgG1 y tiene su origen en la línea germinal DP-10. El epítipo que reconoce sobre el factor VIII es el dominio C1 en su configuración nativa, pero no el mismo dominio con una mutación R2150H. El anticuerpo RHD5 puede inhibir hasta el 98% de la actividad del factor VIII.

20
25 El anticuerpo también se refiere a cualquier anticuerpo modificado que responda a las características de la invención, en el que se sustituyeron o agotaron uno o varios aminoácidos. Dicha sustitución o agotamiento puede ubicarse en cualquier posición en la molécula. En caso de que se hayan sustituido o agotado varios aminoácidos, puede considerarse cualquier combinación de sustitución o agotamiento. Dichas alteraciones de la secuencia de las regiones variables del anticuerpo según la invención pueden realizarse con el objeto de aumentar el número de residuos que puedan entrar en contacto entre el anticuerpo antiidiotípico según la invención y el anticuerpo inhibidor diana.

30
35 En un modo de realización de la invención, el anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo murino.

De modo ventajoso, este anticuerpo monoclonal antiidiotípico murino es una IgG1kappa. De modo preferente, el anticuerpo monoclonal según la invención es un anticuerpo quimérico. "Anticuerpo quimérico" es un anticuerpo en el que las regiones variables de las cadenas livianas y de las cadenas pesadas pertenecen a una especie diferente a las de las regiones constantes de las cadenas livianas y de las cadenas pesadas. De este modo, el anticuerpo según la invención posee, además, regiones constantes de sus cadenas livianas y pesadas que pertenecen a una especie no murina. A este respecto, pueden utilizarse todas las familias y especies de mamíferos no murinos, particularmente el hombre, el mono, los muridos (salvo el ratón), los suidos, los bóvidos, los équidos, los félicos, los cánidos, por ejemplo, así como los pájaros.

40
45 Los anticuerpos quiméricos según la invención pueden construirse utilizando las técnicas estándar del ADN recombinante, muy conocidas por el experto en la materia y, más particularmente, utilizando las técnicas de construcción de anticuerpos "quiméricos" descritas, por ejemplo, en Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.-S.A., 81, pp. 6851-55 (1984), donde la tecnología del ADN recombinante se utiliza para reemplazar la región constante de una cadena pesada y/o la región constante de una cadena liviana de un anticuerpo que proviene de un mamífero no humano con las regiones correspondientes de una inmunoglobulina humana.

50
En un aspecto particular de la invención, el anticuerpo según la invención es un anticuerpo híbrido humano, es decir, un anticuerpo quimérico cuya parte constante es humana. Este modo de realización de la invención permite disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo en el hombre y, por consiguiente, mejorar su eficacia durante su administración terapéutica.

55 **[0015]** De modo ventajoso, el anticuerpo según la invención es un anticuerpo humanizado. Este tipo de anticuerpo puede obtenerse asociando una o varias región(es) CDR (Complementarity Determining Région) de un anticuerpo monoclonal de una especie no humana con regiones framework (regiones muy conservadas de las regiones

variables, también llamadas "infraestructura") humanas. Este tipo de procedimiento de obtención está descrito claramente en el estado de la técnica (Jones et al., Nature (1986) 321:522; Riechmann et al., Nature (1988) 332:323). Este tipo de anticuerpo humanizado, dirigido contra el dominio variable de anticuerpos inhibidores que reconocen el dominio C1 del FVIII puede incluir regiones framework humanas y una o varias de las regiones CDR.

5 **[0016]** De manera ventajosa, el anticuerpo monoclonal antiidiotípico según la invención es el anticuerpo 18B6 producido por la hibridoma 18B6 depositada con el número de registro CNCM I-3559, el 24 de enero de 2006 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15).

10 **[0017]** El método de obtención de la hibridoma 18B6 se describe en la parte "Ejemplos" del presente documento. El anticuerpo monoclonal antiidiotípico según la invención también es cualquier anticuerpo que contenga fragmentos del anticuerpo 18B6 y, más particularmente, cualquier anticuerpo que incluya la región variable de la cadena liviana y/o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 18B6, o cualquier fragmento de la región variable de la cadena liviana y/o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 18B6. El término "fragmentos" designa un fragmento F'(ab')₂ o un fragmento Fab' o un fragmento Fab o una región CDR o cualquier versión modificada de cualquiera de estos fragmentos o región.

15 En un modo de realización particular de la invención, el anticuerpo monoclonal antiidiotípico según la invención es un fragmento F(ab')₂ o un fragmento Fab' o un fragmento Fab o una región CDR o cualquier versión modificada de cualquiera de estos fragmentos o región. La digestión enzimática de las inmunoglobulinas por parte de la papaína genera 2 fragmentos idénticos que llamamos "fragmento Fab" (Fragment Antigen Binding) y un fragmento Fc (fracción cristalizable). El fragmento Fc es el soporte de las funciones efectoras de las inmunoglobulinas.

20 A través de la digestión con pepsina, se genera un fragmento F(ab')₂, en el que los dos fragmentos Fab permanece enlazados mediante dos puentes disulfuro, y el fragmento Fc está escindido en varios péptidos. El fragmento F(ab')₂ está formado por dos fragmentos Fab' (un fragmento Fab' consiste en un Fab y una región bisagra), enlazados por puentes disulfuro intracatenarios para formar un F(ab')₂.

25 Este tipo de fragmentos, que contienen el sitio de fijación del anticuerpo, pueden haber perdido un cierto número de propiedades del anticuerpo entero del que derivan, como la capacidad de activar el complemento o de enlazar los receptores Fc γ . Sin embargo, estos fragmentos no perdieron la capacidad del anticuerpo completo para neutralizar el anticuerpo inhibidor. De este modo, la invención también se extiende a los fragmentos F(ab')₂, Fab', Fab, de la región CDR o cualquier versión modificada de cualquiera de estos fragmentos o región del anticuerpo 18B6. En particular, estos fragmentos conservaron la capacidad del anticuerpo completo para neutralizar los anticuerpos RHD5.

30 Otro objeto de la invención es una línea celular estable que produce un anticuerpo como el que se describió anteriormente. La línea celular estable según la invención puede ser de origen humano o animal. La línea celular estable según la invención puede provenir de células humanas inmortalizadas. En otro modo de realización de la invención, esta línea puede provenir de células de origen animal, por ejemplo ratones, inmortalizadas. Un ejemplo preferente de una línea resultante de este modo de realización de la invención es la línea 18B6, depositada en la CNCM con el número de registro I-3559. En otro modo de realización, la línea celular estable según la invención es una línea que ha incorporado una construcción genética que permite la expresión del anticuerpo según la invención en el lugar deseado del genoma. La etapa que consiste en obtener este tipo de célula es una transfección estable. Esta etapa puede aplicarse en cualquier tipo de células siempre y cuando estas puedan mantenerse en cultivo *in vitro*. La transfección estable necesita la integración de la construcción genética, que puede realizarse mediante recombinación homóloga o hacerse de manera aleatoria. La presencia de un casete de selección positiva en la construcción genética que contiene el gen de interés es lo que confiere a la célula la resistencia a un antibiótico, por ejemplo, que prueba la inserción del transgén en el genoma celular. Después de una etapa de subclonación, se obtiene una línea celular productora, a largo plazo, del anticuerpo de la invención, por ejemplo 18B6, que puede mantenerse en cultivo *in vitro*.

35 La línea celular estable que expresa un anticuerpo según la invención puede elegirse entre el grupo que consiste en una línea celular humana, una línea de roedor, por ejemplo, una línea murina, SP2/0, YB2/0, IR983F, un mieloma humano como Namalwa o cualquier otra célula de origen humano como PERC6, las líneas CHO, particularmente CHO-K-1, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO dhfr- (CHO DX B11, CHO DG44), u otras líneas elegidas entre wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K6H6, NSO, SP2/0-Ag 14 y P3X63Ag8.653.

40 Otro objeto particular de la invención es la hibridoma 18B6 depositada con el número de registro CNCM I-3559 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).

45 **[0018]** El anticuerpo producido por la hibridoma 18B6 es el anticuerpo 18B6, y un método de obtención de la hibridoma 18B6 se describe en la parte "Ejemplos" del presente documento. Otro objeto de la invención es un fragmento de ADN que codifica para la región variable de la cadena pesada del anticuerpo según la invención, como se describió anteriormente. Este fragmento de ADN puede insertarse en un vector que permita la expresión de un

polipéptido, preferentemente de un anticuerpo, cuya región variable de la cadena pesada está codificada por la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de las cadenas pesadas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6, cuya secuencia peptídica deducida es la secuencia peptídica de la región variable de las cadenas pesadas del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6, para introducirlo y mantenerlo en una célula huésped.

5 **[0019]** Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención y, al menos, un excipiente y/o al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. De manera preferente, el anticuerpo monoclonal antiidiotípico contenido en la composición farmacéutica según la invención es el anticuerpo 18B6, un fragmento o región derivada de 18B6, o incluso un anticuerpo quimérico o humanizado que contiene las regiones variables o las CDR de 18B6 como se define en las reivindicaciones. La composición farmacéutica según la
10 invención puede formularse en cualquier excipiente que pueda tolerar un paciente que se someterá al tratamiento. Los ejemplos de dichos excipientes incluyen agua, soluciones salinas, solución de Ringer, soluciones de dextrosa, y cualquier otra solución acuosa fisiológica adecuada. El excipiente también puede contener bajas cantidades de aditivos, como sustancias que aumentan la isotonicidad y la estabilidad de la composición. Dichos excipientes incluyen el tampón fosfato, el tampón bicarbonato y el tampón tris. Estos excipientes son muy conocidos por el
15 experto en la materia. Las formulaciones estándar pueden presentarse en forma de líquidos inyectables o de formulaciones sólidas que pueden volver a suspenderse en un líquido apropiado antes de administrarse. La función de los vehículos que pueden utilizarse para la preparación de la composición farmacéutica según la invención es, de modo ventajoso, aumentar la vida media de la composición terapéutica en el animal o el paciente, o permitir la administración controlada del principio activo. Este tipo de vehículos pueden ser polímeros orgánicos y sintéticos y
20 otros compuestos químicos que puedan diseminar los medicamentos a un ritmo normal o diseminarlos sólo en algunos ambientes, así como liposomas, aunque la lista no es limitativa. De modo ventajoso, la composición farmacéutica contiene, además, al menos un anticuerpo antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo inhibidor que se une a un dominio distinto que el dominio C1 del factor VIII. Este otro anticuerpo puede ser un anticuerpo antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo inhibidor que se une al dominio A1 o A3 o B, A2 o C2 del factor VIII. De
25 hecho, un paciente afectado de hemofilia A, que desarrolló anticuerpos inhibidores, suele presentar varios tipos de anticuerpos inhibidores. Además, las cantidades y la naturaleza de los diferentes tipos de anticuerpos inhibidores no son fijas pero pueden cambiar a lo largo de la vida del paciente. Como los diferentes anticuerpos inhibidores de un mismo paciente están dirigidos contra los diferentes dominios del factor VIII, resulta particularmente ventajoso tratar al paciente no con uno, sino con varios tipos de anticuerpos antiidiotípicos dirigidos contra los diferentes anticuerpos
30 inhibidores.

La composición farmacéutica contiene un anticuerpo monoclonal antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo inhibidor que se une al dominio C2 del factor VIII y/o un anticuerpo inhibidor que se une al dominio A2 del factor VIII y el anticuerpo monoclonal según la invención. En efecto, los dominios A2 y C2 representan los blancos principales de la
35 reacción inmunitaria anti-factor VIII. De este modo, una composición farmacéutica que contiene una mezcla de anticuerpos antiidiotípicos dirigidos contra anticuerpos inhibidores que se unen al dominio C1 del factor VIII y anticuerpos antiidiotípicos dirigidos contra anticuerpos inhibidores que se unen al dominio C2, permite la neutralización de al menos el 70% y, ventajosamente, al menos el 80% o el 90% de la totalidad de los anticuerpos inhibidores presentes en un paciente. En un modo de realización preferente de la invención, la composición farmacéutica según la invención contiene el anticuerpo 14C12 (depositado con el número LMBP 5878CB en la
40 Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms) y/o el anticuerpo 30D1 (depositado en la CNCM con el número I-3450). En otro modo de realización preferente de la invención, la composición farmacéutica también contiene el anticuerpo 14C12 quimérico depositado en la CNCM con el número I-3510 y/o un anticuerpo quimérico o humanizado derivado del anticuerpo 30D1, es decir, un anticuerpo que contiene las regiones variables del anticuerpo 30D1.

45 Otro objeto de la invención es el uso del anticuerpo según la invención para su uso como medicamento.

Otro objeto de la invención es el uso del anticuerpo según la invención para la fabricación de un medicamento. De modo ventajoso, este tipo de medicamento se utiliza para reducir y/o prevenir y/o tratar los sangramientos en un paciente hemofílico con anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio C1 del factor VIII.

50 Otro objeto de la invención es el uso del anticuerpo según la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la hemofilia de tipo A.

[0020] Ventajosamente, la hemofilia de tipo A tratada de este modo es una hemofilia con inhibidores. Este tipo de hemofilia tratada con el anticuerpo según la invención puede ser congénita o adquirida. El anticuerpo según la invención, al neutralizar los anticuerpos inhibidores, devuelve su eficacia al tratamiento mediante la inyección de factor VIII al paciente. La actividad del factor VIII ya no está inhibida por los anticuerpos inhibidores.

55 Otro objeto de la invención es el uso del anticuerpo según la invención para neutralizar *in vitro* o *in vivo* la actividad inhibidora de un anticuerpo inhibidor dirigido contra el dominio C1 del factor VIII. Este procedimiento puede aplicarse

para agotar la sangre de un paciente de sus anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio C1 del factor VIII. Inmediatamente, la sangre se reinyecta al paciente.

Otro objeto de la invención se refiere a un medicamento que comprende un anticuerpo según la invención, preferentemente el anticuerpo 18B6.

- 5 Otro objeto de la invención es el uso del anticuerpo para adsorber los anticuerpos inhibidores, por ejemplo, para purificar anticuerpos inhibidores del factor VIII. Por último, otro objeto de la invención es el uso del anticuerpo según la invención para detectar y/o purificar anticuerpos inhibidores del factor VIII. Los procedimientos de aplicación de tales métodos de detección y purificación son muy conocidos por el experto en la materia. Como ejemplo, se puede mencionar la utilización, a tal efecto, de una columna de inmunopurificación que contiene bolillas en la superficie de las cuales se injerta el anticuerpo según la invención. Sólo las moléculas reconocidas por el anticuerpo se fijarán a las bolillas. Las otras atravesarán la columna. Para recuperar la molécula, basta con aumentar la fuerza iónica del solvente.

Otros aspectos y ventajas de la invención se describirán en los ejemplos que siguen, que deben considerarse a título ilustrativo y que no limitan el alcance de la invención.

15 Descripción de las figuras

[0021]

Figura 1: aumento (valor promedio) de la fijación de los anticuerpos antiidiotípicos al RHD5, para los 4 ratones.

Figura 2: fijación directa del anticuerpo antiidiotípico 18B6 al anticuerpo RHD5 insolubilizado.

Figura 3: inhibición de la fijación del anticuerpo RHD5 al FVIII recombinante (recFVIII) insolubilizado.

- 20 **Figura 4:** neutralización del RHD5 por el 18B6

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra el dominio C1 del factor VIII ("anticuerpo anti-C1")

- 25 **[0022]** La línea celular linfoblastoide humana RHD5 descrita anteriormente se obtuvo inmortalizando los linfocitos B de un paciente con hemofilia A adquirida que desarrolló una respuesta inmune contra el factor VIII, de conformidad con el procedimiento descrito en el documento Jacquemin et al. (1998), Blood 92, 496-506 y en el documento WO 2005/016455.

- 30 **[0023]** La línea celular que produce el anticuerpo monoclonal anti-C1 RHD5 se registró en la Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms/Plasmid Collection (BCCM/LMBP), Laboratorium voor Moleculaire Biologie, University of Ghent, Technologiepark 297, B-9052 Zwijnaarede, Belgium en agosto de 2004, por la Collen Research Foundation, con el número de accesoión LMBP 61-65CB.

- 35 La secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo RHD5 es la secuencia SEQ ID NO: 5, y la secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo RHD5 es la secuencia SEQ ID NO: 6. La secuencia peptídica que corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 5 es la secuencia SEQ ID NO: 7, y la secuencia peptídica que corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 6 es la secuencia SEQ ID NO: 8.

- 40 **[0024]** Alternativamente, los anticuerpos que poseen las características requeridas pueden producirse inmunizando animales. En este caso, el factor VIII humano se inyecta en ratones con un adyuvante. Los anticuerpos monoclonales anti-humanos se obtienen fusionando linfocitos de bazo con una línea celular de mieloma de ratón. Los sobrenadantes celulares que producen los anticuerpos anti-factor VIII se identifican y clonan mediante dilución límite. Puede encontrarse una descripción general de estos métodos en "Current Protocols in Immunology, Chapter 2, John Wiley & Sons, Inc, 1994". Más adelante, se describen otras selecciones de inhibidores con las características deseadas.

Ejemplo 2: Producción del anticuerpo antiidiotípico 18B6

I. Inmunización de ratones

- 45 **[0025]** Cuatro ratones Balb/c hembras de 6 semanas de edad, fueron inyectados en forma subcutánea (SC) en los cojinetes plantares, tres veces, con 10 µg del anticuerpo humano anti-dominio C1 del FVIII RHD5 suspendido en un adyuvante completo de Freund (ACF) (1^{era} inmunización), y después incompleto (AIF).

[0026] Se realizó un primer sangrado (sangrado 0) antes de la inmunización (sangrado al día 0 (Día 0), y las inyecciones y sangrados se sucedieron del siguiente modo:

Día 1: Inyección N°1 (10 µg de anticuerpo RHD5 en presencia de adyuvante completo de Freund)

Día 15: Sangrado N°1

5 Día 16: Inyección N°2 (10 µg de anticuerpo RHD5 en presencia de adyuvante incompleto de Freund)

Día 28: Sangrado N°2

Día 29: Inyección N°3 (10 µg de anticuerpo RHD52 en presencia de adyuvante incompleto de Freund)

Día 44: Sangrado N°3

II. Evaluación de la respuesta inmune de los ratones

10 **[0027]** Para evaluar la presencia de anticuerpos anti-RHD5 en los diferentes sangrados, se realizó un test ELISA de fijación directa. Con este objetivo, se insolubilizó el anticuerpo RHD5, o una IgG1 control a 3 µg/ml, 50 µl/pocillo, en Tampón de Glicina, por la noche (over night), a 4°C (Tampón de Glicina = Glicina 0,1M, NaCl 0,17M, pH 9.2). Se realizaron tres lavados con PBS/Tween (PBS = NaCl 140,0 mM, KCl 2,6 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, Na₂HPO₄ · 2H₂O 8,1 nM, pH 7.4). El sistema se dejó saturando durante 30 minutos, a temperatura ambiente (RT) con 100 µl/pocillo de Magic Buffer (Magic Buffer = Tris 50mM, NaCl 0,17M, BSA 1%, pH 7.2). A continuación se diluyeron los sangrados a 15 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000 en el Magic Buffer y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente (50µl/pocillo). Después se realizaron 3 lavados en PBS/Tween. A continuación, se incubó el sistema con una solución de anticuerpos policlonales de cabra anti-IgG de ratones marcados con la HRP (horseradish peroxidasa) (Bio-Rad) a 1 µg/ml durante 2 horas, a temperatura ambiente (50µl/pocillo) (dilución en el Magic Buffer). Se lavó 3 20 veces el sistema con PBS/Tween, se realizó una revelación con un cromógeno (Orto-fenil diamina) y se realizó una lectura de la intensidad de la coloración obtenida mediante un lector con los filtros correspondientes a las longitudes de ondas 490/650 nm (lector Emax Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

[0028] Resultado de las densidades ópticas obtenidas en la IgG1 control:

Cuadro 1

Dilución 1000X	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4
Sangrado 0	0,031	0,019	0,018	0,018
Sangrado 1	0,019	0,020	0,025	0,028
Sangrado 2	0,026	0,023	0,169	0,045
Sangrado 3	0,027	0,063	0,150	0,024

[0029] Resultado de las densidades ópticas obtenidas en el RHD5:

Cuadro 2

Dilución 1000X	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4
Sangrado 0	0,047	0,020	0,012	0,018
Sangrado 1	0,446	0,188	0,142	0,157
Sangrado 2	0,632	0,685	0,648	0,911
Sangrado 3	0,570	0,708	0,778	0,852

- 5 **[0030]** Los resultados obtenidos se indican en la figura 1. Conclusión: Cada ratón respondió correctamente y de modo similar a la inyección del fragmento Fab RHD5. De modo arbitrario, se seleccionó el ratón nº4 para hacer la fusión.

III. Fusión y cribado

- 10 **[0031]** Los linfocitos del bazo del ratón nº4 se fusionaron con las células de un mieloma SP2/0. La fusión se realizó de manera clásica para el experto en la materia (J. G. Gilles et al., Blood (2004) 103: 2617-23; P. Cornelis, "Les anticorps monoclonaux", Revista IRE, vol. 7, N°4, 1983).

[0032] Las células se expandieron sucesivamente en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con hipoxantina y timidina según el principio de las diluciones límites y los clones positivos se detectaron mediante un test de fijación directa ELISA como se describió en el punto II.

- 15 **[0033]** La especificidad de la fijación se confirmó mediante la insolubilización de un anticuerpo IgG1 humano de especificidad no relevante producido por nuestro laboratorio. Para determinar si las hibridomas son estables, repetimos el cribado epitópico (tests 1 a 3) durante la expansión de los clones, en diferentes volúmenes de medio que van de 200 µl a 5 ml.

Test 1 = medición en pocillos de 200 µl

- 20 Test 2 = medición en pocillos de 1 ml

Test 3 = medición en botella de 5 ml

[0034] Los resultados obtenidos en los diferentes cribados epitópicos figuran en el siguiente cuadro:

Cuadro 3

	Cribado 1	Cribado 2	Cribado 3	Cribado: 3/IgG1	Inhibición: Elisa	Neutralización: test funcional
1A1	+	-	-	-		
1F3	+	+	+	-	+ (92.5%)	+ (100%)
2A1	+	-	-	-		
2C9	+	+	+	+		
3G9	+	+	+	+		
4B7	+	+	-	-		
4B10	+	+	+	+		
4D5	+	+	+	+		

ES 2 376 489 T3

5B11	+	+	+	-	+ (93,6%)	+ (100%)
5E1	+	-	+/-	+		
5G3	+	+	+	+		
5H7	+	-	-	+		
5H8	+	+	+/-	+		
6A9	+	+	+	+		
6E1	+	+	+/--	+		
6H7	+	+	+	+		
6H8	+	+	+-	+		
9D2	+	-	-	+		
10D2	+	+	+	-	+ (93,6%)	+ (100%)
10G8	+	+	+	-	-	
11C5	+	+	+	-	-	
11D7	+	-	-	-		
11G3	+	+	+	+		
12D7	+	+	+	-	-	
12G3	+	-	-	-		
12H12	+	+	+	-	-	
13A1	+	+	+	-	+ (90,9%)	+ (95,6%)
13C3	+	+	+	-	+ (93,6%)	+ (100%)
13D7	+	+	+	-		
13H5	+	+	+/-	+		
14H1	+	+	-	-		
14D11	+	+	+/--	+		
14F11	+	+	+	-	+ (83,6%)	+ (100%)
14H2	+	+	+	+		
14H5	+	+	+	+		
15B4	+	+	-	-		
15F6	+	-	-	+		
16B4	+	+	+	-	+ (94%)	+ (90,9%)
16F6	+	+	+	-	-	
17A5	+	+	+	+		
17C4	+	+	+	-	+ (92,4%)	+ (100%)
18A5	+	+	+	-	-	

18A9	+	+	+	-	-	
18B6	+	+	+	-	+ (93.1%)	+ (100%)
18C4	+	+	+	+		
19C4	+	+	+	+		
19G3	+	+	-	+/-		
20A7	+	+	+	+		
20C4	+	-	-	-		
20G3	+	-	-	-		
21D8	+	+	+	-	+ (93.8%)	-
22H7	+	-	+	+		
23A7	+	+	+	-	-	
23E3	+	+	-	-		
23G2	+	-	+/-	-	-	
24D5	+	+	+	-	+/- (56.3%)	+/- (76.9%)
24D12	+	+	+	+		
24E3	+	-	-	-		
28C10	+	-	-	-		

IV. Test de inhibición con los sobrenadantes de cultivo

5 **[0035]** Como se refleja en el cuadro 3, se realizó un test de inhibición con los sobrenadantes de cultivo. Este test se realizó para seleccionar, entre los clones, los anticuerpos antiidiotípicos que reconocen, de manera precisa, un determinante epitópico localizado a nivel del paratopo del Ac RHD5. De este modo, se probaron los anticuerpos antiidiotípicos con un test ELISA de inhibición de fijación del RHD5 al FVIII insolubilizado.

10 **[0036]** Se insolubilizó el factor VIII recombinante (recFVIII) (Baxter) a 2 µg/ml en un tampón de glicina, 50 µl/pocillo y se dejó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se incubó previamente el anticuerpo RHD5 (o una IgG1 no relevante) a 0,6 µg/ml final durante 2 horas con los sobrenadantes de cultivo con la dilución 1/1, 1/2 y 1/4 en el Magic Buffer. Se lavaron los pocillos 3 veces con un tampón PBS/Tween, se realizó una saturación con 100 µl/pocillo de Magic Buffer (30 minutos a temperatura ambiente). A continuación, se incubó con 50 µl de RHD5 (o de IgG1 no relevante) el sobrenadante de cultivo (2 horas a temperatura ambiente, Magic Buffer) y se realizaron tres lavados. Se detectaron los anticuerpos RHD5 fijados al recFVIII insolubilizado añadiendo 50 µl/pocillo de una solución a 1 µg/ml en el Magic Buffer de anticuerpos policlonales de ratón anti-IgG humanos marcados-HRP (Southern Biotechnology). Se realizaron 3 lavados sucesivos con PBS/Tween, se realizó una revelación con un cromógeno (OPD orto-fenil diamina) y se leyó la intensidad de la coloración obtenida mediante un lector con filtros correspondientes a las longitudes 490/650 nm (lector Emax Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Conclusiones:

20 **[0037]** Como se refleja en el cuadro 3, 11 clones son capaces de inhibir específicamente la fijación del anticuerpo RHD5 al recFVIII insolubilizado. (Nota: Un valor negativo traduce la posibilidad de una fijación a una región externa del paratopo o refleja una concentración insuficiente de Ac en el sobrenadante de cultivo. Sin embargo, dado el número de positivos, los pocillos negativos se eliminaron tras los ensayos).

25 V. Test funcional con los sobrenadantes de cultivo: medida de la neutralización de la actividad inhibitoria (anti-factor VIII) del anticuerpo RHD5

5 **[0038]** El anticuerpo RHD5 se incubó con una concentración de 1 µg/ml con los sobrenadantes de los diferentes clones seleccionados durante el test de inhibición (diluciones 3 veces, 6 veces, 12 veces y 24 veces) en Magic Buffer, a 37°C. Después de 30 minutos, se agregó el FVIII Kogenate (Bayer) a 0,5 U/ml final y se realizó una incubación complementaria de 30 minutos, a 37°C. Las muestras se diluyeron 30X en el Magic Buffer, y se agregaron los reactivos del ensayo Cromogénico DADE (factor VIII cromogénico, Dade Behring GmbH, Marburg, Alemania) según las instrucciones de uso del fabricante.

[0039] Como se refleja en el cuadro 3, 10 clones son capaces de neutralizar la actividad inhibidora del Ac RHD5. En función de los resultados y las curvas de neutralización, se seleccionó el anticuerpo 18B6 para las siguientes experiencias.

10 VI. Producción de manera extensiva del clon 18B6 anti- RHD5 seleccionado

[0040] El anticuerpo antiidiotípico 18B6 se produjo en medio de cultivo DMEM. Esta producción se continuó con una purificación en columna de afinidad Proteína G (lo que permite purificar y concentrar los anticuerpos y, de este modo, cerciorarse previamente sobre la especificidad del anticuerpo antiidiotípico obtenido).

[0041] Purificación: 18B6: producción de 8 ml a 8,48 mg/ml

15 VII. Evaluación de la especificidad

[0042] Las diferentes preparaciones se evaluaron con ELISA siguiendo el mismo protocolo que el que se describió en los puntos II y IV.

1. Test ELISA: fijación directa del anticuerpo antiidiotípico 18B6 al anticuerpo RHD5 insolubilizado.

20 **[0043]** La fijación directa del anticuerpo antiidiotípico 18B6 al anticuerpo RHD5 insolubilizado se muestra en la figura 2. La curva muestra que la fijación del anticuerpo 18B6 al RHD5 es dosis dependiente.

2. Test ELISA: inhibición de la fijación del anticuerpo RHD5 al FVIII recombinante insolubilizado.

[0044] Se midió la inhibición de la fijación del anticuerpo RHD5 al FVIII recombinante insolubilizado, según el protocolo descrito en el punto IV. La concentración de RHD5 utilizada es igual a 2 µg/ml.

Cuadro 4

Conc. 18B6 µg/ml	Inhibición de la fijación (%)
50	96,1
25	97,2
12,5	96,9
6,25	96,7
3,12	94,1
1,56	90,3
0,78	50,3
0,39	9,2
0,195	0
0,098	0

25 **[0045]** Los resultados se reflejan en la figura 3. El 50% de la inhibición de la fijación del RHD5 al FVIII se obtiene con una relación molar RHD5/18B6 de 2,5 mientras que una relación equimolar inhibe el 92% de esta fijación.

30 **[0046]** 3. Test funcional: medición de la neutralización de la actividad inhibidora (anti-FVIII) del anticuerpo RHD5. El protocolo es idéntico al que se describe en el punto V con una concentración final de RHD5 de 0,4 µg/ml y una curva del antiidiotípico purificado que va de 4 a 0,002 µg/ml final.

[0047] Los resultados se indican en el cuadro 5:

Cuadro 5

Conc. antiid (µg/ml)	Neutralización (%)
4	89,5
1,33	81,2
0,44	54,3
0,148	27,4
0,049	11
0,0165	8,8
0,0055	6,7
0,00183	8,9
0,0006	6,7
0,0002	0

[0048] Los resultados se indican en la figura 4. El 50% de neutralización de la actividad inhibidora del RHD5 se obtiene con una relación RHD5/18B6 equimolar.

- 5 4. Medición de la cinética de fijación del anticuerpo antiidiotípico 18B6 mediante el método "Surface plasmon resonance Biacor".

[0049] La cinética de fijación del anticuerpo antiidiotípico 18B6 al anticuerpo inhibidor RHD5 se evaluó con el método "Surface plasmon resonance Biacore" utilizando el Pharmacia Biosensor BIACore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). Los anticuerpos RHD5 se inmovilizaron en una superficie activada de una sonda CM5. Los anticuerpos antiidiotípicos 18B6 se infundieron con varias concentraciones de RHD5 inmovilizados en la superficie de la sonda. Se determinaron las constantes de asociación y disociación:

$$K_a (M-1S-1) = 4,26 \times 10^3$$

$$K_d (S-1) = 1,45 \times 10^{-5}$$

$$K_D: M. 3,4 \times 10^{-9}$$

- 15 5. Caracterización de la subclase del anticuerpo antiidiotípico 18B6

[0050] Para determinar la subclase del anticuerpo 18B6, se utilizó el sistema IsoStrip de Roche (indicador calorimétrico). El anticuerpo 18B6 es una IgG1, Kappa.

FVIII. Secuencia del anticuerpo 18B6

20 **[0051]** Para la secuenciación, se aisló el ARNm de las hibridomas que producen el anticuerpo antiidiotípico 18B6 utilizando el Quick Prep Micro mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). El ADNc se sintetizó por medio del First-strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech). El ADNc que codifica para la cadena pesada (VH) y para la cadena liviana (VL) se amplificó mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) por medio de cebadores específicos correspondientes a las diferentes familias de genes potencialmente encontradas en el ratón. Los productos de la PCR se aislaron con un gel de agarosa al 1,5% por medio del QIA quick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y se clonaron por medio del pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI). El ADN plasmídico de las colonias positivas se aisló por medio de High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y se secuenció en ambos sentidos con la Sequenase (US Biochemical, Cleveland, OH).

IX. Propiedades particulares ligadas al anticuerpo 18B6

30 **[0052]** El anticuerpo 18B6 inhibe totalmente la fijación del anticuerpo RHD5 a su antígeno, el Factor VIII. El anticuerpo RHD5 lleva un idiotipo complementario al del 18B6.

[0053] La fijación de un anticuerpo al antígeno implica una interfaz de reconocimiento mutuo de 6 a 12 angströms², correspondiente a un gran número de aminoácidos que se asocian uno con otro con ayuda de enlaces hidrógenos, de atracción hidrófoba o polar y puentes de VanderWals.

5 **[0054]** En un plano funcional, cuando un anticuerpo inhibe totalmente la fijación de un anticuerpo al antígeno, implica que el anticuerpo inhibidor tiene una "imagen interna" del antígeno, a saber, una estructura tridimensional que imita la estructura 3-D del antígeno.

10 **[0055]** Aunque la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) de 18B6 tenga poca homología con la del dominio C1 del factor VIII, el alineamiento de las estructuras secundarias del anticuerpo 18B6 con la del dominio C1 del FVIII, diana antigénica del anticuerpo RHD5 y la modelización tridimensional del 18B6 indican, al superponerse con la estructura 3-D del dominio C1, que la parte variable de la cadena liviana (VL) del 18B6 representa una imagen interna del dominio C1.

[0056] Esta observación confiere al anticuerpo 18B6 una propiedad particular, nueva y no previsible. En otras palabras, cualquier intento de generar anticuerpos similares al 18B6 mediante inmunización con anticuerpo como el RHD5 no resulta, de facto, en la obtención de anticuerpos idénticos al 18B6.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo monoclonal antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo humano inhibidor del factor VIII, siendo dirigido dicho anticuerpo inhibidor contra el dominio C1 del factor VIII, en el que la región variable de cada una de sus cadenas livianas está codificada por la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena liviana del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6, depositada con el número de registro CNCM I-3559 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), y la región variable de cada una de sus cadenas pesadas está codificada por la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6, depositada con el número de registro CNCM I-3559 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).
- 10 2. Anticuerpo monoclonal antiidiotípico según la reivindicación 1, en el que la secuencia peptídica de la región variable de cada una de sus cadenas livianas es la secuencia de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6, depositada con el número de registro CNCM I-3559 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), y la secuencia peptídica de la región variable de cada una de sus cadenas pesadas es la secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo producido por la hibridoma 18B6, depositada con el número de registro CNCM I-3559 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).
- 15 3. Anticuerpo monoclonal antiidiotípico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque el anticuerpo inhibidor es el anticuerpo RHD5 (depositado en la colección BCCM/LMBP con el número LMBP 6165CB).
- 20 4. Anticuerpo monoclonal antiidiotípico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque es un anticuerpo murino o un anticuerpo quimérico, particularmente un anticuerpo híbrido humano o un anticuerpo humanizado.
5. Anticuerpo monoclonal antiidiotípico según la reivindicación 4, caracterizado porque es una IgG1kappa.
6. Anticuerpo monoclonal antiidiotípico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se trata de un fragmento f(ab)2, de un fragmento Fab', de un fragmento Fab.
- 25 7. Anticuerpo monoclonal antiidiotípico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque está producido por la hibridoma 18B6 depositada con el número de registro CNCM I-3559 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).
- 30 8. Línea celular estable que produce un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque la cepa celular se elige dentro del grupo que consiste en: SP2/0, YB2/0, IR983F, el mieloma humano Namalwa, PERC6, las líneas CHO, particularmente CHO-K-1, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K6H6, NSO, SP2/0-Ag 14 y P3X63Ag8.653.
9. Hibridoma 18B6 depositada con el número de registro CNCM I-3559 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).
- 35 10. Composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y al menos un excipiente y/o al menos un vehículo farmacéuticamente aceptables.
11. Composición según la reivindicación 12, caracterizada porque además comprende un anticuerpo monoclonal antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo anti-FVIII dirigido contra un dominio distinto al dominio C1 del factor VIII, particularmente un anticuerpo antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo anti-FVIII dirigido contra el dominio C2 del factor VIII y/o un anticuerpo dirigido contra el dominio A2 del factor VIII.
- 40 12. Uso de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la hemofilia de tipo A, particularmente una hemofilia de tipo A con inhibidores.
13. Uso de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para neutralizar *in vitro* la actividad inhibidora de un anticuerpo inhibidor dirigido contra el dominio C1 del factor VIII.
- 45 14. Uso de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la detección y/o la purificación *in vitro* de anticuerpos inhibidores del factor VIII.

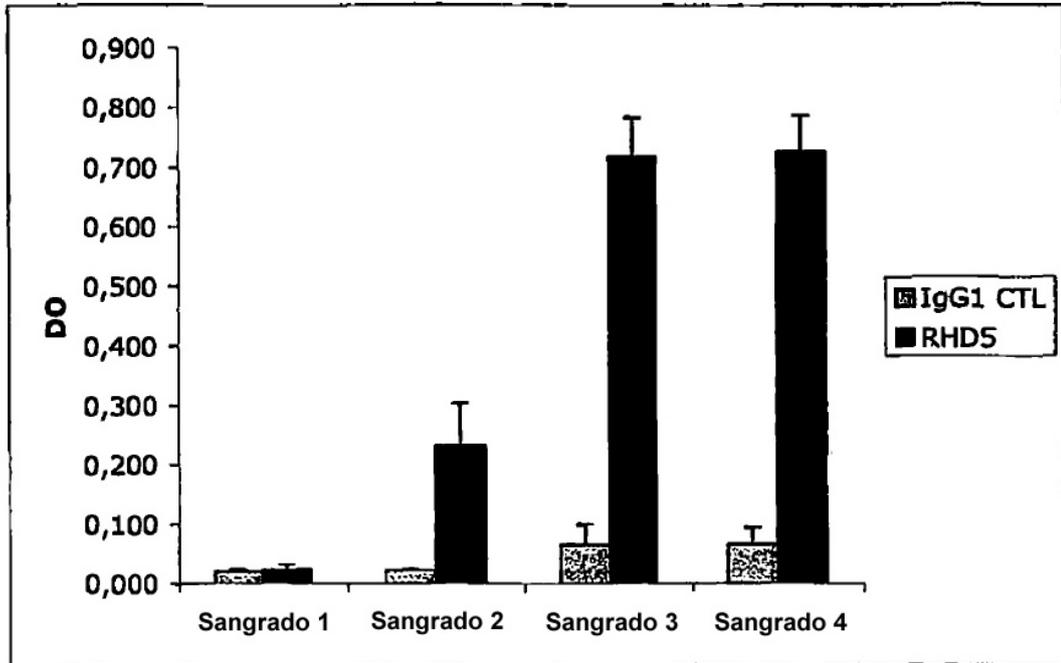


Figura 1

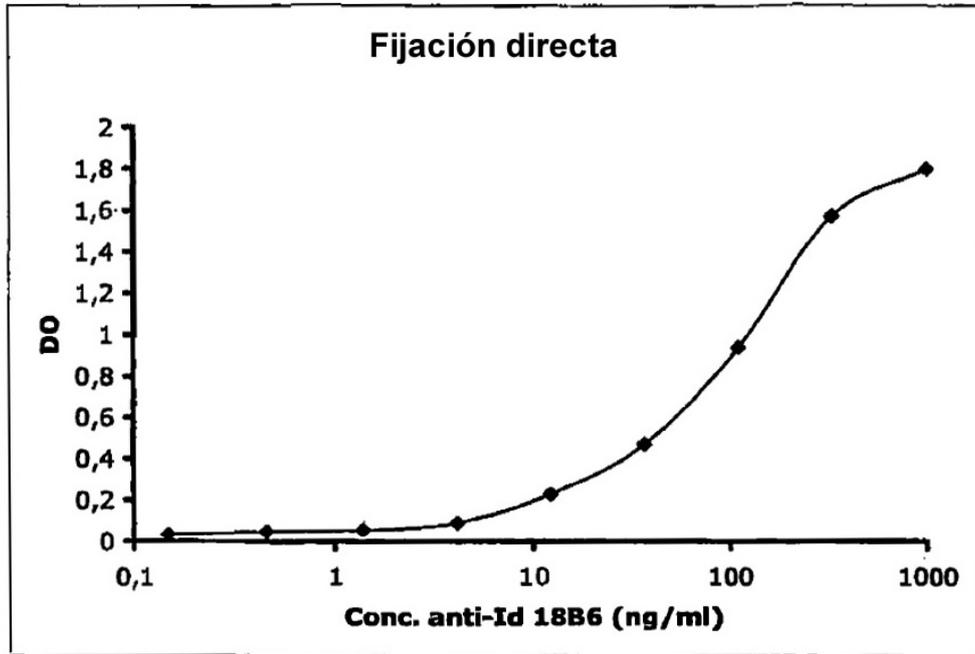


Figura 2

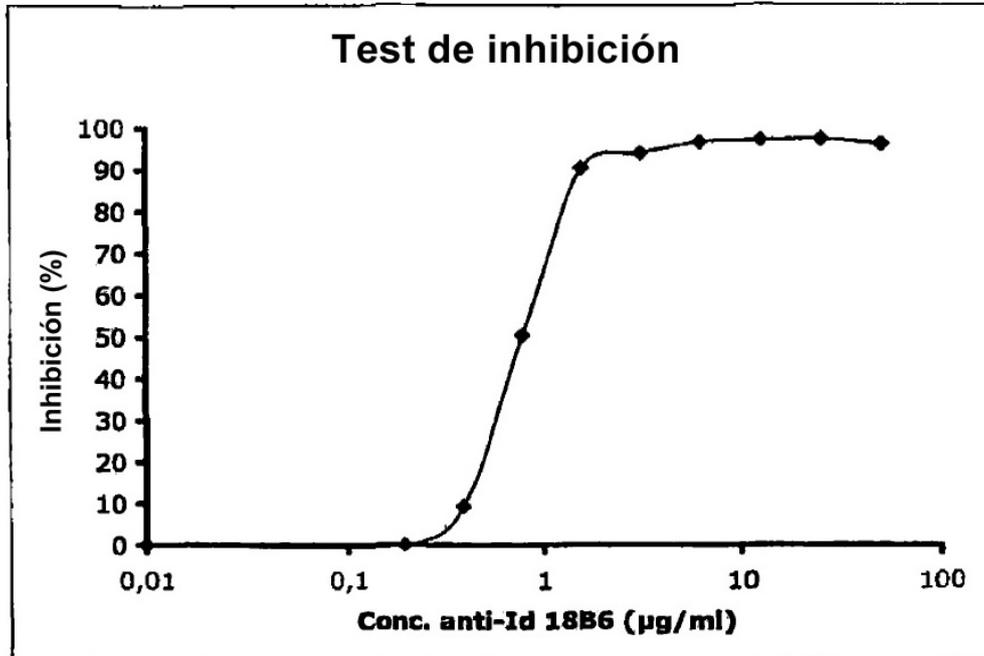


Figura 3

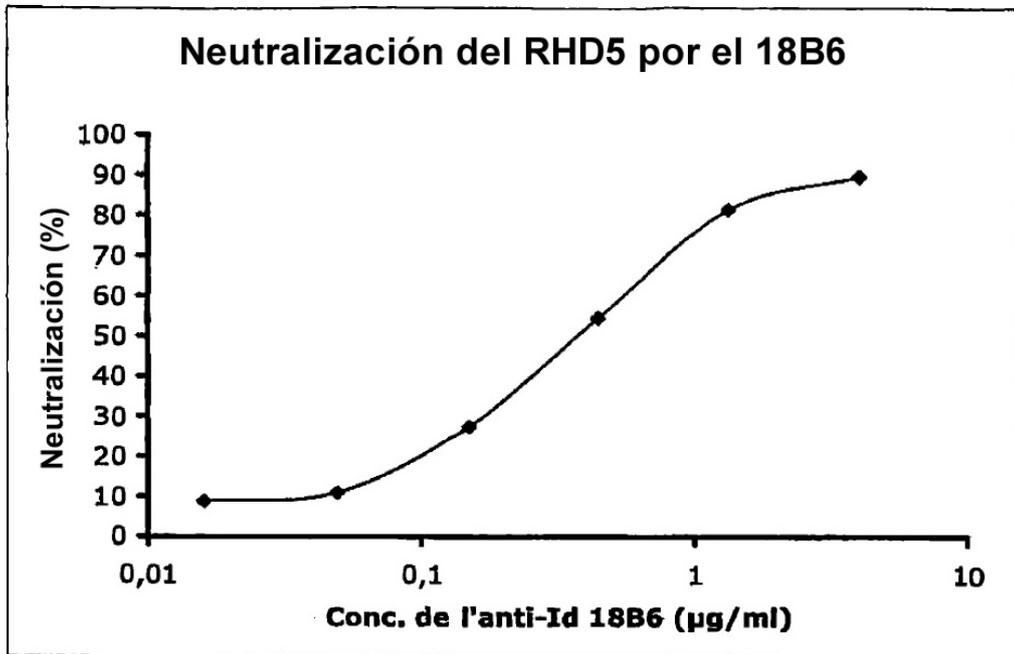


Figura 4