

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 128**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05292669 .8**
96 Fecha de presentación: **14.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1749537**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.02.2007**

54 Título: **Anticuerpo antiidiotípico que neutraliza la actividad inhibidora de un anticuerpo inhibidor del factor VIII**

30 Prioridad:
04.08.2005 FR 0508320

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.03.2012

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

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

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 377 128 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

Anticuerpo antiidiotípico que neutraliza la actividad inhibitora de un anticuerpo inhibidor del factor VIII.

Técnica anterior e introducción

5 La presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo inhibidor del factor VIII que se une al dominio A2 del factor VIII, una línea celular que produce este anticuerpo monoclonal antiidiotípico, la utilización de este anticuerpo monoclonal antiidiotípico como medicamento y, más particularmente, su utilización para fabricar un medicamento destinado al tratamiento de la hemofilia A.

10 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.

15 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.

20 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 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 rol 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 1690-2019), 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. De este modo, 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 pueden desarrollar inhibidores contra el factor VIII endógeno: se trata de una hemofilia adquirida.

40 Estudios demostraron que la respuesta inmune anti-factor VIII es de tipo IgG policlonal y 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 sobrerrepresentación 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 inmunoabsorción 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).

55 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 protrombóticos o los 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 siguen siendo 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 anti-factor VIII diana (el anticuerpo monoclonal BO2C11), que se dirige contra el dominio C2 del factor VIII. No obstante, la respuesta inmune anti-factor VIII es policlonal, y no necesariamente todos los anticuerpos inhibidores del factor VIII desarrollados por un paciente se dirigen contra el dominio C2 del factor VIII. Un tratamiento que consiste en la administración de anticuerpos 14C12 solos podría neutralizar únicamente de modo parcial la respuesta inmune anti-factor VIII desarrollada en el paciente.

Otra categoría preponderante de anticuerpos inhibidores del factor VIII hallados en los pacientes afectados de hemofilia A que desarrollaron inhibidores, está constituida por los anticuerpos inhibidores 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).

De este modo, los anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio A2 del factor VIII son muy importantes en la respuesta inmune dirigida contra el factor VIII, esta respuesta es mixta e involucra, de modo preponderante, anticuerpos dirigidos contra el dominio A2 y anticuerpos dirigidos contra el dominio C2 del factor VIII.

Ahora bien, no existe una herramienta que permita neutralizar los anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio A2 del factor VIII.

Lubahn et al. (PNAS, vol. 87, nº 21, páginas 8232-8236) describe un anticuerpo capaz de reconocer el dominio A2 del FVIII y anticuerpos antiidiotípicos capaces de unirse a este anticuerpo anti-FVIII. Lubahn et al. también sugiere el uso terapéutico de dichos anticuerpos antiidiotípicos. Sin embargo, los anticuerpos capaces de unirse al FVIII descritos en Lubahn et al. no son neutralizadores y no corresponden a anticuerpos inhibidores del FVIII. En consecuencia, los anticuerpos antiidiotípicos descritos en Lubahn son incapaces de neutralizar la actividad inhibitora de anticuerpos dirigidos contra el factor VIII.

Por ello, el solicitante buscó, en un primer momento, implementar una nueva herramienta para tratar la hemofilia A que permita neutralizar anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio A2 del factor VIII. En un segundo momento, el solicitante buscó implementar una nueva herramienta que permita neutralizar el efecto inhibitor de la mayor parte de los anticuerpos inhibidores desarrollados por un paciente afectado de hemofilia A con inhibidores.

Así, el solicitante fabricó un nuevo anticuerpo antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo inhibidor del factor VIII. Este anticuerpo inhibidor se une al dominio A2 del factor VIII. De manera sorprendente, el solicitante comprobó que la utilización del anticuerpo antiidiotípico según la invención, simultáneamente con un anticuerpo antiidiotípico dirigido contra un inhibidor que se une al dominio C2 del factor VIII tiene un efecto neutralizador del efecto inhibitor de la respuesta inmune anti-factor VIII y, en particular, la respuesta inmune inducida por los anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio A2 y por los anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio C2 del factor VIII.

Descripción detallada de la invención

La presente solicitud describe un anticuerpo monoclonal antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo humano inhibidor del factor VIII. El anticuerpo inhibidor se dirige contra el dominio A2 del factor VIII.

5 "Anticuerpos inhibidores" o "inhibidores" del factor VIII, son los anticuerpos que inhiben la actividad procoagulante del factor VIII, fundamentalmente fijándose a este y, particularmente, un anticuerpo anti-factor VIII cuyo epítipo está ubicado en el factor VIII. De manera ventajosa, el anticuerpo descrito en la presente solicitud tiene la capacidad de neutralizar 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 inhibidora de la coagulación de los anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio A2 del factor VIII, blancos de los anticuerpos monoclonales antiidiotípicos descritos en la presente solicitud. Esta capacidad para neutralizar la actividad inhibidora 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 como "factor VIII chromogen test" (Jacquemin et al. (1998) Blood 92, 494-506).

10 El anticuerpo monoclonal antiidiotípico descrito en la presente solicitud 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 descrito en la presente solicitud es la inmunización de animales, ventajosamente ratones, inyectando anticuerpos inhibidores del factor VIII dirigidos contra el dominio A2 del factor VIII y fusionando linfocitos de bazo 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.

15 El anticuerpo antiidiotípico descrito en la presente solicitud se dirige contra anticuerpos inhibidores en los que la región variable de la cadena pesada está próxima a la línea germinal DP-71. Dichos anticuerpos pueden obtenerse a partir de seres humanos (por ejemplo, suero de pacientes que presentan anticuerpos inhibidores) u otras especies animales como el ratón, el caballo, la cabra, primates no humanos, y otras, 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 A2.

20 De modo ventajoso, el anticuerpo inhibidor diana del anticuerpo antiidiotípico descrito en la presente solicitud reconoce el epítipo localizado entre los aminoácidos 484 a 508 del factor VIII. Más precisamente, el epítipo reconocido es un epítipo conformacional que comprende los residuos ácido glutámico 389, 390 y 391 del factor VIII. En efecto, el dominio A2 del factor VIII comprende los aminoácidos 373-740 del factor VIII. Este dominio está implicado en el reconocimiento del factor VIII por el factor IX, que se une a los dominios A2 y A3 del factor VIII y en la inactivación del factor VIII. Este dominio es uno de los principales epítipos reconocidos por los anticuerpos inhibidores.

25 De manera preferente, el anticuerpo inhibidor diana del anticuerpo antiidiotípico descrito en la presente solicitud es el anticuerpo BOIIB2, registrado en X, con el número X. El anticuerpo BOIIB2 es un anticuerpo monoclonal humano IgG4 dirigido contra el dominio A2 del factor VIII producido a partir de linfocitos de un paciente que presenta una hemofilia A severa con un nivel alto de inhibidores. Este anticuerpo pertenece a la subclase IgG4 y deriva de la línea germinal DP-71. El epítipo que reconoce en el factor VIII se ubica a nivel de los residuos 484 a 508. Más precisamente, el anticuerpo BOIIB2 reconoce un epítipo conformacional que comprende los residuos 484 a 508 y los residuos ácido glutámico 389, 390 y 391. El anticuerpo BOIIB2 inhibe la actividad del factor VIII en un 99%, interfiriendo en la función del complejo tenasa inhibiendo la fijación del FIXa y/o del FX en el complejo tenasa o acelerando la disociación del dominio A2.

30 En un primer objeto de la invención, la región variable de cada una de las cadenas livianas del anticuerpo monoclonal antiidiotípico de la invención está codificado por una secuencia de ácido nucleico que posee al menos el 70% de identidad con la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 2, y la región variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo monoclonal antiidiotípico está codificada por una secuencia de ácido nucleico que posee al menos el 70% de identidad con la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 1. 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 comparan, 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.

35 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 SEQ ID NO: 2, y la región variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo monoclonal antiidiotípico está codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 1.

De manera ventajosa, la secuencia peptídica de cada una de las regiones variables de las cadenas livianas del anticuerpo según la invención 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 SEQ ID NO : 4.

5 De manera ventajosa, la secuencia peptídica de cada una de las regiones variables de las cadenas pesadas del anticuerpo según la invención 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 SEQ ID NO : 3.

10 De manera particularmente ventajosa, la secuencia peptídica de cada una de las cadenas livianas del anticuerpo según la invención 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 SEQ ID NO : 4, y la secuencia peptídica de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo según la invención 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 SEQ ID NO : 3.

De manera preferente, la secuencia peptídica de cada una de las cadenas livianas del anticuerpo según la invención es la secuencia SEQ ID NO : 4.

15 De manera preferente, la secuencia peptídica de cada una de las cadenas livianas del anticuerpo según la invención es la secuencia SEQ ID NO : 3.

20 La secuencia peptídica deducida de la secuencia SEQ ID NO : 2 es la secuencia SEQ ID NO : 4 y la secuencia peptídica deducida de la secuencia SEQ ID NO : 1 es la secuencia SEQ ID NO : 3. De manera preferente, la región variable de cada una de las cadenas livianas del anticuerpo monoclonal antiidiotípico según la invención posee la secuencia peptídica SEQ ID NO : 4 y la región variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo monoclonal antiidiotípico según la invención posee la secuencia peptídica SEQ ID NO : 3.

25 El anticuerpo según la invención 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.

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

30 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 y los pájaros.

35 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.

40 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.

45 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).

50 De modo ventajoso, el anticuerpo monoclonal antiidiotípico según la invención es el anticuerpo 30D1 producido por la hibridoma 30D1 registrado con el número CNCM I-3450 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM). La región variable de cada una de las cadenas livianas del anticuerpo monoclonal antiidiotípico 30D1 está codificado por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO : 2 y la región variable de cada una de las cadenas pesadas

55

del anticuerpo monoclonal antiidiotípico 30D1 está codificado por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO : 1. El método de obtención de la hibridoma 30D1 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 30D1 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 30D1, o cualquier fragmento de la región variable de la cadena liviana y/o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 30D1. El término "fragmentos" designa un fragmento F'(ab')₂ o un fragmento Fab' o un fragmento Fab o una región CDR (Complementarity Determining Region) o cualquier versión modificada de cualquiera de estos fragmentos o región.

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 (Complementarity Determining Region) 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.

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 intercatenarios para formar un F(ab')₂.

Este tipo de fragmentos, que contienen el sitio de enlace 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 Fcγ. 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 30D1. En particular, estos fragmentos conservaron la capacidad del anticuerpo completo para neutralizar los anticuerpos BOIIB2.

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 30D1, registrada en la CNCM con el número I-3450. 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 30D1, que puede mantenerse en cultivo *in vitro*.

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, fundamentalmente 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.

Otro objeto particular de la invención es la hibridoma 30D1, registrada con el número CNCM I-3450 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM). La región variable de cada una de las cadenas livianas del anticuerpo monoclonal antiidiotípico producido por la hibridoma 30D1 está codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO : 2, y la región variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo monoclonal antiidiotípico producido por la hibridoma 30D1 está codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO : 1. El anticuerpo producido por la hibridoma 30D1 es el anticuerpo 30D1, y un método de obtención de la hibridoma 30D1 se describe en la parte "Ejemplos" del presente documento.

Otro objeto de la invención es un fragmento de ADN de secuencia SEQ ID NO : 1 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, en el que la región variable de la cadena pesada está codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO : 1 en el que la secuencia peptídica deducida es la secuencia SEQ ID NO : 3, para introducirlo y mantenerlo en una célula huésped. Este vector permite la expresión de este fragmento de ácido nucleico en la célula huésped ya que posee secuencias indispensables (promotor, secuencia de poliadenilación, gen de selección) en esta expresión.

5 Este tipo de vectores son muy conocidos por el experto en la materia y pueden ser, de modo no limitativo, un adenovirus, un retrovirus, un plásmido o un bacteriófago. Además, puede utilizarse cualquier célula de mamífero como célula huésped, es decir, como célula que expresa el polipéptido o el anticuerpo según la invención, por ejemplo SP2/0, YB2/0, IR983F, un mieloma humano como Namalwa o cualquier otra célula de origen humano como PERC6, las líneas CHO, fundamentalmente 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.

10 Otro objeto de la invención es un fragmento de ADN de secuencia SEQ ID NO : 2, que codifica para la región variable de la cadena liviana de un 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, en el que la región variable de la cadena liviana está codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO : 2 en el que la secuencia peptídica deducida es la secuencia SEQ ID NO : 4, para introducirlo y mantenerlo en una célula huésped. Este vector permite la expresión de este fragmento de ácido nucleico extraño en la célula huésped ya que posee secuencias indispensables (promotor, secuencia de poliadenilación, gen de selección) en esta expresión.

15 Este tipo de vectores son muy conocidos por el experto en la materia y pueden ser, de modo no limitativo, un adenovirus, un retrovirus, un plásmido o un bacteriófago.

20 Además, puede utilizarse cualquier célula de mamífero como célula huésped, es decir, como célula que expresa el polipéptido o el anticuerpo según la invención, por ejemplo SP2/0, YB2/0, IR983F, un mieloma humano como Namalwa o cualquier otra célula de origen humano como PERC6, las líneas CHO, fundamentalmente 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.

25 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 30D1, un fragmento o región derivada de 30D1, o incluso un anticuerpo quimérico o humanizado que contiene las regiones variables de 30D1 como se describió anteriormente en el presente documento. La composición farmacéutica según la invención puede formularse en cualquier excipiente que pueda tolerar un paciente que se someta 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 y son muy conocidos por el experto en la materia. Las formulaciones estándar pueden presentarse en forma de líquidos inyectables o 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 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.

40 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 A2 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, C1 o C2 del factor VIII. De 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 sino que 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 inhibidores.

50 De manera preferente, la composición farmacéutica contiene un anticuerpo monoclonal antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo inhibidor que se une al dominio C2 del factor VIII y el anticuerpo monoclonal según la invención. En efecto, los dominios A2 y C2 representan los blancos principales de la 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 A2 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 (registrado con el número LMBP 5878CB en la Belgian Coordinated Collections of Microorganisms) y el anticuerpo 30D1. En otro modo de realización preferente de la invención, la composición farmacéutica también contiene el anticuerpo 14C12 y un anticuerpo quimérico o humanizado derivado del anticuerpo 30D1, es decir, un anticuerpo que contiene las regiones variables del anticuerpo 30D1.

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

Otro objeto de la invención es la utilización 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 A2 del factor VIII.

- 5 Otro objeto de la invención es la utilización del anticuerpo según la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la hemofilia de tipo A.

10 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 inyectando factor VIII al paciente. La actividad del factor VIII ya no está inhibida por los anticuerpos inhibidores.

Otro objeto de la invención es la utilización del anticuerpo según la invención para neutralizar *in vitro* o *in vivo* la actividad inhibidora de un anticuerpo inhibidor dirigido contra el dominio A2 del factor VIII. Este procedimiento puede aplicarse para agotar la sangre de un paciente de sus anticuerpos inhibidores dirigidos contra el dominio A2 del factor VIII. Inmediatamente, la sangre se reinyecta al paciente.

- 15 Otro objeto de la invención es la utilización del anticuerpo para adsorber los anticuerpos inhibidores, por ejemplo, para purificar anticuerpos inhibidores del factor VIII.

20 Por último, otro objeto de la invención es la utilización 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.

25 Descripción de las figuras

Figura 1: evaluación de la capacidad del anticuerpo BOIIB2 para inhibir el factor VIII en un ensayo funcional.

Figura 2: mapeo de epítomos del anticuerpo BOIIB2.

Figura 3: respuesta inmune de los ratones inyectados con el anticuerpo BOIIB2 en función del sangrado midiendo la densidad óptica.

- 30 **Figura 4:** fijación directa de los anticuerpos antiidiotípicos a los anticuerpos BOIIB2 insolubilizados.

Figura 5: inhibición de la fijación del anticuerpo BOIIB2 al FVIII recombinante insolubilizado.

Figura 6: neutralización de la actividad inhibidora anti-factor VIII del anticuerpo BOIIB2.

Figura 7: neutralización del efecto inhibidor de la mezcla del anticuerpo BO2C11 y del anticuerpo BOIIB2 por los anticuerpos antiidiotípicos 14C12 y 30D1.

35 Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra el dominio A2 del factor VIII ("anticuerpo anti-A2")

40 Los anticuerpos humanos monoclonales que poseen la especificidad y las características deseadas se producen por transformación de linfocitos B obtenidos a partir de sangre periférica de individuos, preferentemente pacientes con hemofilia A o hemofilia adquirida. Las células B se transforman por infección con el virus Epstein-Barr y por activación de antígenos de superficie gracias a técnicas muy conocidas por el experto en la materia (Madec et al. (1996) J Immunol 156:3541-3549). Los sobrenadantes celulares que contienen los anticuerpos deseados se identifican mediante pruebas específicas.

45 De este modo, los anticuerpos dirigidos contra el factor VIII se identifican haciendo reaccionar el sobrenadante con placas de poliestireno recubiertas con factor VIII o con un complejo factor VIII/factor Von Willebrand. La unión de los anticuerpos específicos se detecta por la adición de una IgG antihumana conjugada con una enzima. La adición de un sustrato enzimático convertido en un compuesto coloreado en presencia de una enzima permite detectar anticuerpos específicos. Estos métodos, llamados ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assays), son muy conocidos por el experto en la materia. Hay una descripción detallada en la obra "Current Protocols in Immunology, Chapter 2, John Wiley & Sons, Inc, 1994".

50

A continuación, las células B que producen los anticuerpos anti-factor VIII se expanden y clonan por dilución límite. Los métodos para la clonación se describen, por ejemplo, en *Current Protocols in Immunology*, Chapter 2, John Wiley & Sons, Inc, 1994".

5 Los anticuerpos anti-factor VIII que poseen las características deseadas, a saber, la capacidad de inhibir la actividad procoagulante del factor VIII, se identifican gracias a kits de ensayos cromogénicos disponibles en el comercio y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se seleccionan los anticuerpos que inhiben la funcionalidad del factor VIII y que presentan una afinidad de enlace suficiente para el factor VIII. La figura 1 muestra la facultad de un anticuerpo, llamado BOIIB2, específico del dominio A2 del factor VIII, para inhibir el factor VIII en un ensayo funcional. La prueba funcional utilizada es una prueba cromogénica en la que el factor VIII activado por la trombina actúa como un cofactor al factor IXa en la conversión del factor X en factor Xa. Brevemente, 20 µl de factor VIII recombinante (recFVIII) diluido en una solución de PBS-BSA (1 IU/ml) se mezcla con un volumen igual de una dilución serial del anticuerpo BOIIB2 en la misma solución de PBS-BSA y se incuba durante 1 hora a 37°C. A continuación, 20 µl de la mezcla se incuban durante 3 minutos a temperatura ambiente en un pozo de microtitulación con 20 µl del reactivo 1 (factor X) y 20 µl de reactivo 2 (factor IXa) antes de agregar 100 µl de reactivo 3 (sustrato cromogénico y solución tampón). Se realizaron experimentos de control que incluyen el recFVIII incubado sin anticuerpos específicos o con la misma concentración de anticuerpos no relevantes. La densidad de coloración del sustrato se midió directamente a 405 nm con una referencia de 450 nm. El porcentaje de inhibición se calculó comparándolo con el control positivo recFVIII 1 IU/ml. La curva indica que el BOIIB2 inhibe el FVIII al 99% a una concentración de 0,1 µl/ml.

20 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.

25 Los anticuerpos producidos por los ratones se humanizan. De este modo, las secuencias de las partes variables murinas de las cadenas pesadas y livianas se alinean con las regiones variables de inmunoglobulina humana para identificar un anticuerpo humano que posea la mejor homología con las regiones Framework (FR). El fragmento de ADN que codifica para las regiones variables humanizadas se sintetizan con el método PCR-based CDR grafted, como se describe en Sato K et al. (1993); *Cancer Research* 53: 851-856.

30 **Ejemplo 2: Caracterización de la especificidad y la afinidad de los anticuerpos anti-A2.**

La especificidad de los anticuerpos dirigidos contra el dominio A2 del factor VIII se caracteriza utilizando un sistema de transcripción-traducción combinado con reticulocitos de conejos. A tal efecto, se construye un banco de plásmidos que contiene fragmentos variados del dominio A2.

35 La construcción plasmídica psP64-FVIII (ATCC, Rockville, MD) que contiene un ADNc completo de 7,2Kb se utiliza como matriz para generar todos los fragmentos por PCR. Los fragmentos de ADNc con mutaciones o deleciones se producen por SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension-PCR). En los fragmentos de factor VIII de menos de 15 aminoácidos, se agrega una secuencia tag que incluye la ubicuitina y/o el epítipo tag T7 para el reconocimiento específico por los anticuerpos anti-tag, y una secuencia complementaria de cisteínas para marcaje. Los fragmentos polipeptídicos de factor VIII se producen con el método "TNT coupled Reticulocyte Lysate Systems" (Promega), según las instrucciones del fabricante.

40 La inmunoprecipitación de los genes transcritos se realiza de la siguiente manera. Se mezclan las diluciones de las muestras que contienen los anticuerpos específicos a 40 µl de proteína A Sépharose (Pharmacia) en 500 µl de una solución tampón apropiada y se agita suavemente la mezcla durante 1 hora a 4°C. Los anticuerpos no ligados se eliminan mediante una serie de centrifugaciones y lavados. El complejo anticuerpo proteína A Sépharose se vuelve a suspender en 300 µl de una solución tampón suplementada con 3 µl de polipéptidos de factor VIII marcados *in vitro* con metionina L-(³⁵S) para una incubación a 4°C, durante 2 horas. Los complejos antígenos/anticuerpos se eluyen de las bolillas mediante ebullición durante 3 minutos en 30 µl de una solución tampón desnaturalizante y se cuenta la radioactividad. Se analiza una segunda porción alícuota mediante SDS-PAGE y se visualiza en autorradiografía.

50 La figura 2 muestra los resultados del experimento para el anticuerpo BOIIB2. Los residuos con la secuencia tag de las regiones 379-546, 379-546Mut (R484A, Y487A, R489A, P492A) y 461-531 se marcaron y produjeron por lisados de reticulocitos. Los fragmentos se inmunoprecipitaron por el anticuerpo humano BOIIB2 unido a la proteína A Sépharose. Tras el lavado, el complejo se eluyó, se midió la radioactividad (en CPM) mediante centelleo y se cargaron en SDS-PAGE, con una posterior autorradiografía. Se mostró la unión de BOIIB2 al dominio A2 incluyendo los residuos 379-546. En todos los casos, la unión se eliminó cuando se introdujeron 4 mutaciones en la región o cuando se erradicó la parte N-terminal (461-531) de la región. El anticuerpo anti-c-myc 9E10 y el plasma humano se utilizaron como controles positivos y negativos, respectivamente.

Se identificó en el dominio A2 un sitio de unión en la región que incluye los residuos 389-510. No obstante, resulta difícil un trazado más preciso del epítipo debido a que la remoción de las partes amino-terminales o carboxi-terminales de

5 dichos fragmentos erradica rápidamente la unión del anticuerpo. Por lo tanto, procedimos a un enfoque por etapas en el que se introdujeron las mutaciones únicas en el sitio de unión considerado, es decir, 484-509. La figura 2 muestra que las mutaciones únicas en dicho sitio erradican la unión del anticuerpo. Por otra parte, se introdujeron mutaciones únicas en la secuencia de 3 ácidos glutámicos ubicados en 389-391, que también resultó en una pérdida de unión. De este modo, podemos concluir que el sitio de unión está ubicado dentro de la secuencia de aminoácidos 484-509, pero que se requieren 3 residuos de ácido glutámico a una cierta distancia, para una unión eficaz del anticuerpo.

10 La afinidad del anticuerpo se calculó utilizando un sistema de "Surface Plasmon Resonance". De este modo, la cinética de interacción entre el factor VIII y el anticuerpo humano en tiempo real, se analizó utilizando un instrumento Pharmacia Biosensor BIAcore™ (Pharmacia Biosensore AB). El anticuerpo BOIIB2 purificado (20 µg/ml en 10mM de solución tampón de acetato de sodio pH5.0) quedó inmovilizado en una superficie activada de un chip "CM5 sensor chip", según las indicaciones del fabricante. Todos los experimentos se realizaron en HBS con un flujo constante de 10 µg/min. El factor VIII en HBS se infundió en diferentes concentraciones a través de los ECR inmovilizados en una sonda de superficie. Al final de cada ciclo, la superficie se regeneró mediante enjuague con HCl, pH2, durante 36 segundos. Las constantes de asociación y disociación se determinaron por medio de un programa de evaluación BIA, según modelos que suponen la unión de un analito con uno o dos ligandos inmovilizados.

15 El K_{disoc} de BOIIB2 se evaluó a $1.10^{-8} s^{-1}$ y el k_{asoc} de BOIIB2 se evaluó a $1.10^3 M^{-1} s^{-1}$.

Ejemplo 3: secuenciado del anticuerpo BOIIB2

20 El aislamiento del ARN de líneas celulares humanas B inmortalizadas por el EBV se produce por medio de reactivo TRIZOL según las indicaciones del fabricante (Life Technologies). El ADNc se sintetiza con el sistema de pre-amplificación SuperScript para la síntesis de la primera hebra de ADNc. El ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo se amplifica por PCR por medio de iniciadores específicos de la secuencia líder de las familias VH y para el primer exón de la región CH, como se describe en Jacquemin et al. (2000); Blood. Jan 1:95(1):156-63. El acoplamiento se realiza a 60°C durante 40 ciclos de PCR. Los productos PCR de tamaño apropiado (460bp) se aíslan a partir del 1,5% de gel de agarosa y se clonan utilizando el Kit TA Cloning (Invitrogen BV, Leek, The Netherlands). Se realiza un screening PCR con pares de iniciadores correspondientes a la familia del gen VH de interés en cultivos de colonias randomizadas. El ADN plasmídico de las colonias positivas se aísla utilizando Wizard Plus Minipreps (Promega, Menlo park, CA) y se secuencia en las 2 direcciones con la Sequenase (United States Biochemical, Cleveland, OH), según las instrucciones del fabricante. El análisis de las secuencias del gen de la región variable se realiza utilizando "V BASE Sequence Directory" (Tomlinson et al., MRC Centre for proteína Engineering, Cambridge, UK).

30 El gen VH de BOIIB2 pertenece al grupo VH4 y es homólogo de DP-71. El segmento J es homólogo de JH6c. El secuenciado del gen de la cadena liviana clonada identificó el VL como un VLIII y el segmento J como un JL5.

35 La secuencia nucleotídica de la cadena pesada del BOIIB2 es la secuencia SEQ ID NO : 5, y la secuencia nucleotídica de la cadena liviana del anticuerpo BOIIB2 es la secuencia SEQ ID NO : 6. La secuencia peptídica correspondiente a la secuencia SEQ ID NO : 5 es la secuencia SEQ ID NO : 7 y la secuencia peptídica correspondiente a la secuencia SEQ ID NO : 6 es la secuencia SEQ ID NO : 8.

Ejemplo 4: Producción del anticuerpo antiidiotípico 30D1

I. Inmunización de ratones

40 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 A2 del FVIII BOIIB2 suspendido en un adyuvante completo de Freund (ACF) (1^{era} inmunización), y después incompleto (AIF).

Se realizó un primer sangrado (sangrado 0) antes de la inmunización (sangrado al D0), y las inyecciones y sangrados se sucedieron del siguiente modo:

D1: Inyección N°1 (10 µg de anticuerpo BOIIB2 en presencia de adyuvante completo de Freund)

45 D15: Sangrado N°1

D16: Inyección N°2 (10 µg de anticuerpo BOIIB2 en presencia de adyuvante incompleto de Freund)

D28: Sangrado N°2

D29: Inyección N°3 (10 µg de anticuerpo BOIIB2 en presencia de adyuvante incompleto de Freund)

D44: Sangrado N°3

50

II. Evaluación de la respuesta inmune de los ratones

5 Para evaluar la presencia de anticuerpos anti-BOIIB2 en los diferentes sangrados, se realizó un test ELISA de fijación directa. Con este objetivo, se insolubilizó el anticuerpo BOIIB2 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
 10 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 1/10, 1/50, 1/250 y 1/1250 en el Magic Buffer y se incubaron durante 2 horas a temperatura de cámara (RT) (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 (peroxidada del rábano) (Bio-Rad) a 1 µg/ml durante 2 horas, a temperatura ambiente (RT) (50µl/pocillo) (dilución en el Magic Buffer). Se lavó 3 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).

15 Resultado de las densidades ópticas obtenidas:

Dilución 250X	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4
Sangrado 0	0.012	0.013	0.006	0.016
Sangrado 1	0.255	0.273	0.245	0.254
Sangrado 2	0.357	0.388	0.366	0.386
Sangrado 3	0.362	0.34	0.334	0.357

Los resultados obtenidos se indican en la figura 7.

Conclusión: cada ratón respondió correctamente y de modo similar a la inyección del anticuerpo BOIIB2. De modo arbitrario, se seleccionó el ratón n°2 para hacer la fusión.

20 III. Fusión y cribado

Los linfocitos del bazo del ratón n°2 se fusionaron con las células del 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).

25 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.

30 La especificidad de la fijación se confirmó utilizando un anticuerpo IgG4 humano de especificidad no relevante anti-Der P2 (AK6A3, anticuerpo dirigido contra uno de los alérgenos principales del ácaro Dermatophagooides Pteronisinus (DPT) disponible en nuestro laboratorio. Para el experto en la materia, resulta evidente que puede utilizarse como control negativo cualquier anticuerpo de isotipo que no sea el IgG4.

Para determinar si las hibridomas son estables, repetimos el test (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

Test 2 = medición en pocillos de 1 ml

35 Test 3 = medición en botella de 5 ml

Resultados de las densidades ópticas obtenidas:

	Test 1		Test 2		Test 3	
clon	BOIIB2	IgG4 (AK6A3)	BOIIB2	IgG4 (AK6A3)	BOIIB2	IgG4 (AK6A3)
10C11	0,353	0,094	clon muerto	clon muerto	clon muerto	clon muerto
10H7	0,436	0,093	clon muerto	clon muerto	clon muerto	clon muerto
11F5	0,134	0,040	clon muerto	clon muerto	clon muerto	clon muerto
12F5	0,291	0,087	0,024	0,002	0,012	0,002
14E7	0,231	0,077	0,234	0,006	0,216	0,003
25F7	0,362	0,071	0,205	0,003	0,178	0,002
27B5	0,333	0,046	0,238	0,003	0,259	0,003
28C5	0,125	0,077	clon muerto	clon muerto	clon muerto	clon muerto
30D1	0,324	0,093	0,311	0,003	0,293	0,002

Conclusión: 4 clones positivos por fijación directa al anticuerpo BOIIB2: 14E7, 25F7, 27B5, 30D1. Estos clones son estables en los tres tests.

IV. Test de inhibición con los sobrenadantes de cultivo

5 Para realizar la selección de un clon productor de anticuerpo antiidiotípico (Ac anti-Id) que reconoce, de manera precisa, un determinante epitópico localizado a nivel del paratopo del anticuerpo BOIIB2 entre los 4 clones retenidos en el punto III, se probaron los anticuerpos anti-Id con un test ELISA de inhibición de fijación del BOIIB2 en el FVIII insolubilizado. 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 de cámara. Se incubó previamente el anticuerpo BOIIB2 (o una IgG4 no relevante) a 0,4 µg/ml final durante 2 horas con los sobrenadantes de cultivo de los anticuerpos 14E7, 25F7, 27B5, 30D1 con la dilución 10 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 de cámara). A continuación, se incubó con 50 de BOIIB2 (o IgG4 no relevante) el sobrenadante de cultivo (2H, RT, Magic Buffer) y se realizaron tres lavados. Se detectaron los anticuerpos BOIIB2 fijados al recFVIII insolubilizado añadiendo 50 µl/pocillo de una solución a 1 µg/ml en 15 el Magic Buffer de anticuerpos policlonales de ratón anti-IgG humanas marcadas-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).

La inhibición se calcula de la siguiente manera:

20 $I (\%) = 1 - (\text{señal con anticuerpos antiidiotípico} / \text{señal sin anticuerpo antiidiotípico})$

Resultados obtenidos:

Clones	Inhibición (%), dilución 1/1
14E7	0
30D1	73
27B5	0
25F7	0

25 **Conclusiones:** sólo un clon (30D1) es capaz de inhibir específicamente la fijación del anticuerpo BOIIB2 al recFVIII insolubilizado.

V. Producción de los 4 clones productores de los anticuerpos anti-BOIIB2, de manera extensiva

5 Para contar con más cantidad de anticuerpos que permitan confirmar la especificidad de los anticuerpos 14E7, 25F7, 27B5, 30D1 del ejemplo IV, produjimos anticuerpos antiidiotípicos en medio de cultivo DMEM. Esta producción se continuó con una purificación en columna de afinidad Proteína G que permite purificar y concentrar los anticuerpos y, de este modo, cerciorarse previamente sobre la especificidad de los anticuerpos antiidiotípicos obtenidos.

La concentración de anticuerpos purificados se determinó por fotometría, de manera clásica para el experto en la materia.

- 30D1: producción de 4 ml a 3,23 mg/ml
- 10 27B5: producción de 7,5 ml a 3,24 mg/ml
- 14E7: producción de 4 ml a 2,74 mg/ml
- 25F7: producción de 5 ml a 0,392 mg/ml

Las cantidades obtenidas de los diferentes anticuerpos son:

- 30D1: 12.92 mg
- 15 27B5: 24.3 mg
- 14E7: 10.96 mg
- 25F7: 1.96 mg

VI. Evaluación de la especificidad

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

6.1. Test ELISA: fijación directa de los anticuerpos antiidiotípicos 14E7, 25F7, 27B5, 30D1 a los anticuerpos BOIIB2 insolubilizados.

25 Los resultados se muestran en la figura 6. Los cuatro anticuerpos se unen de modo dosis-dependiente al anticuerpo BOIIB2 insolubilizado en placa. Los resultados sugieren una afinidad diferente de los cuatro anticuerpos, que es decreciente, en el orden 30D1, 27B5, 14E7, 25F7.

6.2. Test ELISA: inhibición de la fijación del anticuerpo BOIIB2 al recFVIII insolubilizado.

Se siguió el mismo protocolo que el descrito en el punto IV.

La concentración de BOIIB2 utilizada es igual a 0,4 µg/ml, que es la concentración capaz de inhibir alrededor del 90% de la actividad de una unidad de FVIII.

30 La inhibición se calculó del siguiente modo:

$$I (\%) = 1 - (\text{señal con anticuerpo antiidiotípico} / \text{señal sin anticuerpo antiidiotípico})$$

Conc. µg/ml	Porcentaje de inhibición			
	30D1	27B5	14E7	25F7
50	94.8	86.9	0	0
16.7	94.8	62.7	0	0
5.56	94.8	42.8	0	0
1.85	92.7	14.4	0	0
0.62	90.6	17.1	0	0
0.21	46	16.5	0	0
0.07	28	16.7	0	0

0.023	17.5	16.8	0	0
0.0076	0	0	0	0
0.0025	0	0	0	0

5 Los resultados se reflejan en la figura 7. Los anticuerpos 30D1 y 27B5 muestran un efecto inhibitor mientras que los anticuerpos 14E7 y 25F7 son negativos. Los efectos inhibitorios de los anticuerpos 30D1 y 27B5 se distinguen cuantitativamente. Mientras que el 30D1 provoca una inhibición con muy bajas dosis (90% de inhibición a 0.6 µg/ml y un máximo del 94.8% a menos de 0.6 µg/ml), hay que utilizar alrededor de 10 µg/ml para alcanzar el 50% de inhibición.

6.3. Test funcional: medición de la neutralización de la actividad inhibitoria (anti-FVIII) del anticuerpo BOIIB2. En función de los resultados obtenidos en el ejemplo anterior, sólo se evaluó el anticuerpo 30D1.

10 Se incubó el anticuerpo BOIIB2 en diferentes concentraciones (de 1.6 a 0.05 µg/ml) con el anti-Id 30D1 (curva de dilución que va de 1.25 a 0.02 µg/ml final) en Magic Buffer. 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. Se diluyeron las muestras 30X en el Magic Buffer y se agregaron los reactivos del test cromogénico DADE (factor VIII cromogénico, Dade Behring GmbH, Marburg, Alemania), según el modo de empleo del productor.

Resultados:

BOIIB2 (µg/ml)	0,2 µg/ml	0.1 µg/ml	0.05 µg/ml
30D1 (µg/ml)			
1.25	100	100	100
0.63	100	100	100
0.32	100	100	100
0.16	54.6	90.5	100
0.08	0.9	61.9	100
0.04	0	17.6	62
0.02	0	3.9	37.3

15 Los resultados se reflejan en la figura 6. Los resultados muestran que el anticuerpo 30D1 neutraliza la actividad inhibitoria del BOIIB2 de modo dosis-dependiente.

La inhibición se calculó del siguiente modo:

$$I (\%) = 1 - (\text{señal con anticuerpo antiidiotípico} / \text{señal sin anticuerpo antiidiotípico})$$

20 6.4. Medición de la cinética de fijación del anticuerpo anti-Id 30D1 mediante el método "Surface plasmon resonance BiAcore".

25 La cinética de fijación del anticuerpo antiidiotípico 30D1 al anticuerpo inhibitor BOIIB2 se evaluó con el método "Surface plasmon resonance Biacore" utilizando el Pharmacia Biosensor BiAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). Los anticuerpos BOIIB2 se inmovilizaron en una superficie activada de una sonda CM5. Los anticuerpos antiidiotípicos 30D1 se infundieron con varias concentraciones de BOIIB2 inmovilizados en la superficie de la sonda. Se determinaron las constantes de asociación y disociación:

$$K_a (M-1S-1) = 6 \cdot 10^4$$

$$K_d (S-1) = 1 \cdot 10^{-5}$$

$$K_D: 1 \cdot 10^{-5} / 6 \cdot 10^4 = 0.17 \cdot 10^{-9} \text{ M.}$$

30

6.5. Caracterización de la subclase del anticuerpo antiidiotípico 30D1

Para determinar la subclase del anticuerpo 30D1, se utilizó el sistema IsoStrip de Roche (indicador calorimétrico). El anticuerpo 30D1 es una IgG1, Kappa.

6.6. Secuencia

5 Para la secuenciación, se aisló el ARNm de las hibridomas que producen el anticuerpo antiidiotípico 30D1 utilizando el Quick Prep Micro mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). El ADNc se sintetizó utilizando el 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) utilizando cebadores específicos correspondientes a las diferentes familias de genes potencialmente encontradas en el ratón. Los
10 productos de la PCR se aislaron con un gel de agarosa al 1,5% utilizando el QIA quick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y se clonaron utilizando el pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI). El ADN plasmídico de las colonias positivas se aisló con el High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y se secuenció en ambos sentidos con la Seqenase (US Biochemical, Cleveland, OH).

15 **Ejemplo 5: Neutralización del efecto inhibitor de la mezcla del anticuerpo BO2C11 y del anticuerpo BOIIB2 por los anticuerpos antiidiotípicos 14C12 y 30D1.**

Se realizó una prueba Bethesda utilizando anticuerpos monoclonales BO2C11 y BOIIB2 para evaluar la capacidad de los anticuerpos antiidiotípicos 30D1 y 14C12 (anticuerpo dirigido contra un anticuerpo inhibitor que se une al dominio C2 del factor VIII, descrito en la patente WO 2004/014955) para neutralizar la capacidad de inhibición de los anticuerpos humanos anti-FVIII. La concentración de anticuerpos BO2C11 (0,03 µg/ml) + BOIIB2 (0,013 µg/ml) se define como la
20 concentración que inhibe el 80% de la actividad del FVIII en la prueba Bethesda.

Se evaluó el efecto de la neutralización:

1° para cada anticuerpo antiidiotípico agregado por separado (14C12 -- ◆-- y 30D1 --- ■--) en concentración creciente (de 0,0063 a 6,4 µg/ml) a la mezcla BO2C11 + BOIIB2.

25 2° para la asociación de los 2 anticuerpos antiidiotípicos 14C12 y 30D1 (--▲--) agregados en las mismas concentraciones a la mezcla BO2C11 + BOIIB2.

La figura 7 muestra que la utilización de una combinación de 2 anticuerpos antiidiotípicos cuyos blancos son los anticuerpos inhibidores dirigidos contra dominios diferentes del FVIII (dominios A2 y C2) tiene un efecto superior a la utilización de un solo anticuerpo antiidiotípico.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies

<120> Anticuerpo antiidiotípico que neutraliza la actividad inhibidora de un anticuerpo inhibidor del Factor VIII

<130> anti-A2

5 <160> 8

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 461

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<400> 1

```

atggaatgga gctggatcat tctcttctctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccaactctgag      60
gtccagctgc aacagctctgg acctgagctg gtgaagcctg gagcttcaat gaagatatec      120
tgcaaggctt ctggttactc attcactgac tacacatga actgggtgaa gcagagccat      180
ggaaagaacc ttgagtggat tggacttatt aatccttaca atgttatttc ttctacaac      240
cagaagtcca agggcaaggc cacattaact gtagacaagt catccagcac agcctacatg      300
gagctcctca gtctgacatc tgaggactct gcagcttatt actgtgcaag aaagggctac      360
ggtagtagca tgtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgcagccaaa      420
acgacacccc catctgtcta tccactggcc cctgggtctg a                          461

```

<210> 2

<211> 431

15 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 2

```

atggagtcaac atactcaggt cttcgtatctc gtgtttctct ggttgtctgg tgttgacgga      60
gacattgtga tgaccagtc tcacaaatc atgtccacat cagtaggagg cagggtcagc      120
atcacctgca aggccagtca ggatgtaact actgctgtag cctggatca acagaaacca      180
ggacaatctc ctaaactact gatttactcg gcatectacc ggtacactgg agtcctgat      240
cgcttactg gcagtggate tgggacggat ttcacttca ccttcagcag tgtgcaggct      300
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatagta ttccgtggac gttcgggtgga      360
ggcaccaagc tggaaatcaa acgggtgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca      420
tccagtgcgc a                          431

```

<210> 3 <211> 153

20 <212> PRT

ES 2 377 128 T3

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Glu Trp Ser Trp Ile Ile Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Val Ile Ser Ser Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Gly Tyr Gly Ser Ser Met Phe Ala Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro
130 135 140

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser
145 150

<210> 4

5 <211> 143

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

ES 2 377 128 T3

atgaaacacc tgtggttctt ccttctcctg gtggcagctc ccagatgtgt cctgtcccag 60
 gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtcctcacc 120
 tgcactgtct ctggtgactc catcagtgat tactactgga gctggatccg gcagccccca 180
 ggggaaggac tggagtggat tggctatfff ttttacagtg ggggcagcaa ttacaacccc 240
 tccctcaaga gtcgagtcac catgtcagta gacacatcca agaaccagtt ctcctgaag 300
 ctgggctctg tgaccgctgc ggacacggcc gtctattact gtgcgagatc gcagttacga 360
 tattacctgg acgtctgggg ccaagggacc acggtcacog tctcctcggc ctccaccaag 420
 ggcccatcgg tcttccccct ggccccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc 540
 gccctgacca ggggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
 ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cgaagaccta cacctgcaat 660
 gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagagag ttgagtcaa atatggtccc 720
 ccatgccat catgccagc acctgagttc ctggggggac catcagttct cctgttcccc 780
 ccaaaaccca aggacactct catgatctcc cggaccctcgt aggtcacgtg cgtggtggtg 840
 gacgtgagcc aggaagacc cagggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg 900
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 960
 gtctcaccg tctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020
 aacaaaggcc tccogtctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1080
 gagccacagg tgtacaccct gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
 ctgacctgcc tggtaaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
 gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgctg tggactccga cggctcctc 1260
 ttctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcagggtggc aggaggggaa tgtcttctca 1320
 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctcctgtct 1380
 ctgggtaaat ga 1392

<210> 6

<211> 699

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 377 128 T3

```

atggaacc cagckcagct tctcttctc ctgctactct ggtcccaga taccaccgga      60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc    120
ctctcctgca gggccagtc gagtggtgac agcaactact tagcctggta ccagcagaaa    180
cctggccagg ctcccagggt cgtcatctat ggtgcatcca acagggccac tggcatccca    240
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gagttcactc tcaccatcag cagactggac    300
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gcttcttcgg ccaagggaca    360
cgactggaga ttaaacgaac tgtggctgca ccactctgtct tcattctccc gccatctgat    420
gagcagttga aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga    480
gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt    540
gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc    600
aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgogaag tcacccatca ggcctgagc    660
tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtggttag                          699

```

<210> 7

<211> 463

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Cys
1           5           10          15

```

ES 2 377 128 T3

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile
 35 40 45

Ser Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Pro
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Gly Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Ser Gln Leu Arg Tyr Tyr Leu Asp Val Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 225 230 235 240

Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255

ES 2 377 128 T3

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 275 280 285

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450 455 460

<210> 8

<211> 232

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 377 128 T3

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

ES 2 377 128 T3

1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Val Asp Ser Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 Pro Arg Val Val Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90
 Ser Arg Leu Asp Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110
 Gly Ser Phe Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
 115 120 125
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 130 135 140
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 145 150 155 160
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 165 170 175
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 195 200 205
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo monoclonal antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo inhibidor del factor VIII dirigido contra el dominio A2 del factor VIII y capaz de neutralizar la actividad inhibidora del anticuerpo inhibidor diana, caracterizado porque la región variable de cada una de sus cadenas livianas está codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO : 2, y porque la región variable de cada una de las cadenas pesadas está codificada por la secuencia SEQ ID NO : 1.
- 10 2. Anticuerpo monoclonal antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo inhibidor del factor VIII dirigido contra el dominio A2 del factor VIII y capaz de neutralizar la actividad inhibidora del anticuerpo diana, caracterizado porque la secuencia peptídica de la región variable de cada una de sus cadenas livianas es una secuencia que posee al menos el 70% de identidad con la secuencia SEQ ID NO : 4, y porque la secuencia peptídica de la región variable de cada una de las cadenas pesadas es una secuencia que posee al menos el 70% de identidad con la secuencia SEQ ID NO : 3.
- 15 3. Anticuerpo según la reivindicación 2, caracterizado porque la secuencia peptídica deducida de la secuencia SEQ ID NO : 2 es la secuencia SEQ ID NO : 4 y porque la secuencia peptídica deducida de la secuencia SEQ ID NO : 1 es la secuencia SEQ ID NO : 3.
4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo murino.
5. Anticuerpo según la reivindicación 4, caracterizado porque dicho anticuerpo antiidiotípico es una IgG1kappa.
- 20 6. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo quimérico.
7. Anticuerpo según la reivindicación 6, caracterizado porque dicho anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo híbrido humano.
- 25 8. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo humanizado.
9. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque se trata de un fragmento F(ab')₂, de un fragmento Fab' o de un fragmento Fab.
- 30 10. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque puede ser producido por la hibridoma 30D1 registrada con el número CNCM I-3450 en la Collection Nationale de Cultures et Microorganismes (CNCM).
11. Línea celular estable que produce un anticuerpo monoclonal antiidiotípico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 35 12. Línea celular estable según la reivindicación 11, elegida entre el grupo que consiste en: SP2/0, YB2/0, IR983F, el mieloma humano Namalwa, PERC6, las líneas CHO, fundamentalmente 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.
13. Hibridoma 30D1 registrada con el número CNCM I-3450 en la Collection Nationale de Cultures et Microorganismes (CNCM).
- 40 14. Fragmento de ADN de secuencia SEQ ID NO : 1 que codifica para la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal antiidiotípico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
15. Fragmento de ADN de secuencia SEQ ID NO : 2 que codifica para la región variable de la cadena liviana de un anticuerpo monoclonal antiidiotípico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 45 16. Composición farmacéutica que contiene un anticuerpo monoclonal antiidiotípico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y al menos un excipiente y/o al menos un vehículo, farmacéuticamente aceptables.
17. Composición según la reivindicación 16, caracterizada porque contiene, al menos, un anticuerpo antiidiotípico dirigido contra un anticuerpo inhibidor dirigido contra un dominio del factor VIII distinto del dominio A2.

18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, caracterizada porque contiene un anticuerpo antiidiotípico dirigido contra el dominio C2 del factor VIII.
19. Utilización de un anticuerpo monoclonal antiidiotípico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la fabricación de un medicamento.
- 5 20. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la hemofilia de tipo A, dicha hemofilia de tipo A es una hemofilia con inhibidores.
21. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para neutralizar *in vitro* la actividad inhibidora de un anticuerpo inhibidor dirigido contra el dominio A2 del factor VIII.
- 10 22. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la detección *in vitro* y/o la purificación de anticuerpos inhibidores del factor VIII.

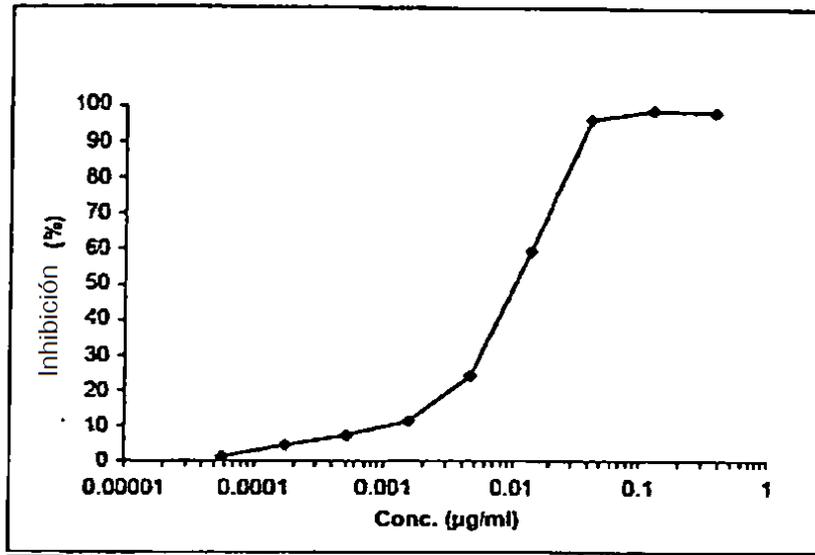


Fig. 1

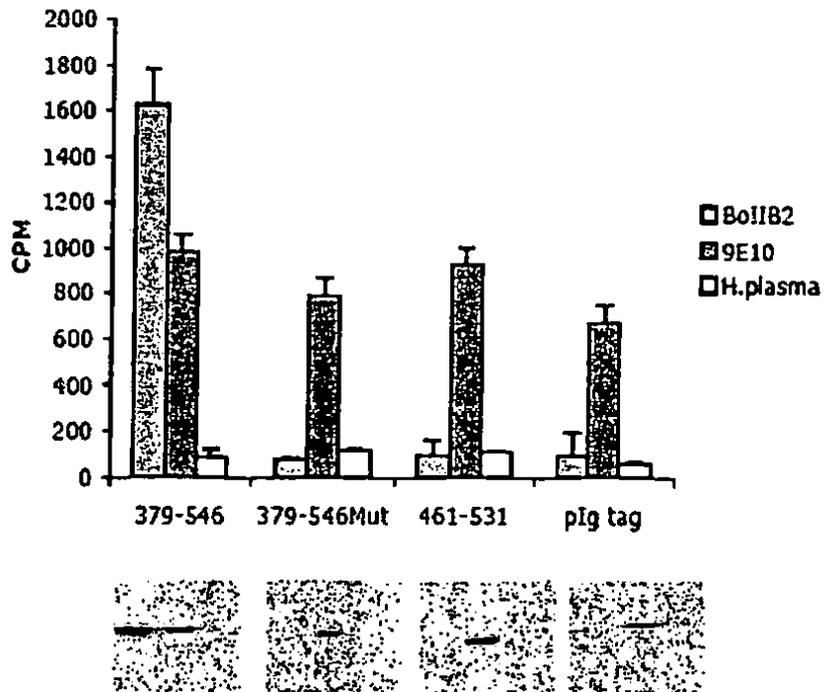


Fig. 2

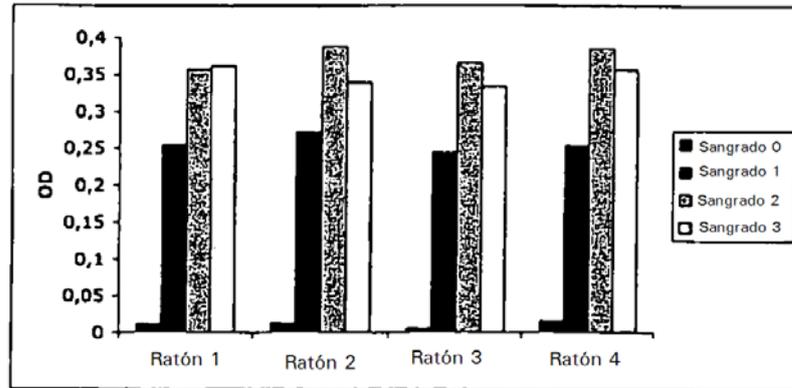


Fig. 3

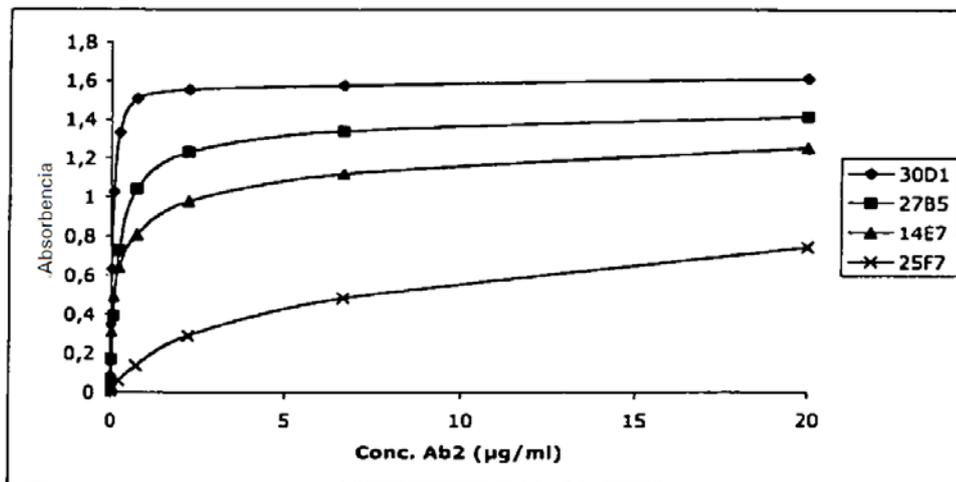


Fig. 4

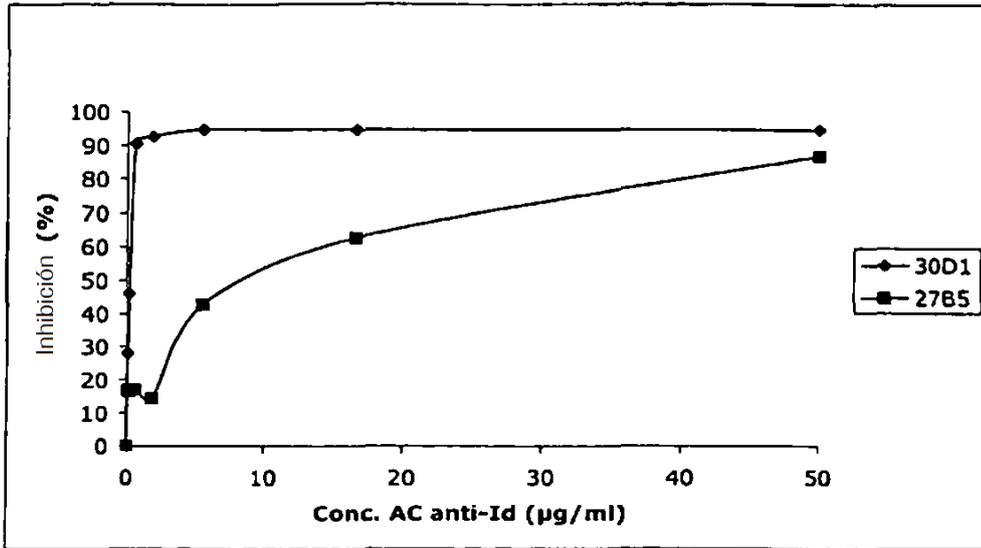


Fig. 5

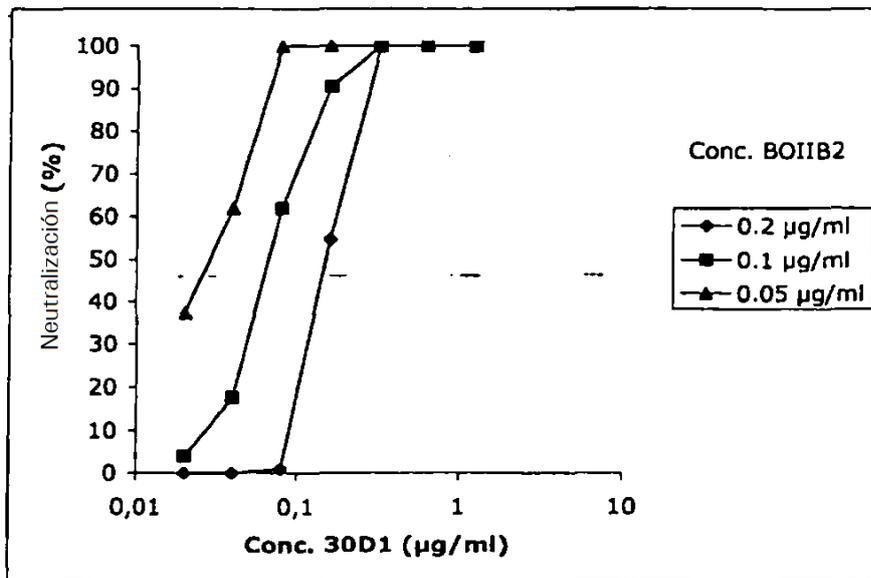


Fig. 6

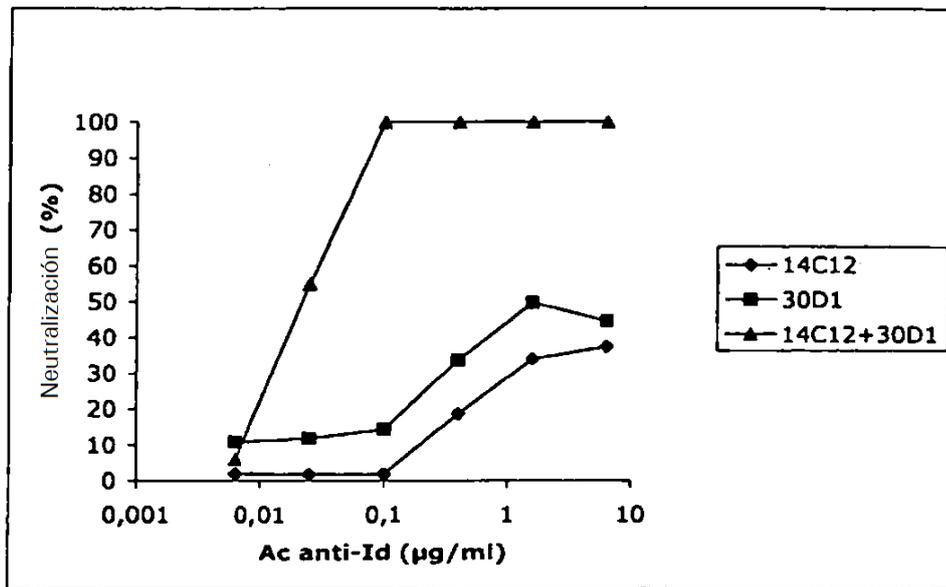


Fig. 7