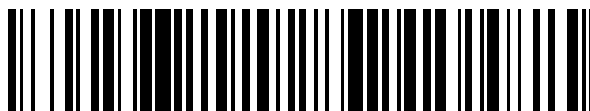


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 093**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2009 E 09701235 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2013 EP 2248826**

54 Título: **Anticuerpo dirigido contra PcrV**

30 Prioridad:

10.01.2008 JP 2008003214

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.10.2013

73 Titular/es:

**SHIONOGI & CO., LTD. (100.0%)
1-8, Doshomachi 3-chome Chuo-ku Osaka-shi
Osaka 541-0045, JP**

72 Inventor/es:

**NUMATA, YOSHITO;
YAMANO, YOSHINORI;
SATO, TAKAFUMI y
TSUJI, TOSHINAGA**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 426 093 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 dirigido contra PcrV

5 Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que reconoce PcrV, o una parte de la misma. Más específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo que tiene mayor actividad neutralizante (en lo sucesivo, también denominada actividad inhibidora de la citotoxicidad) que los anticuerpos anti-PcrV convencionales, o una parte de los mismos, y una composición farmacéutica que contiene los mismos.

Técnica anterior

[0002] *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram-negativo aerobio obligado que existe ampliamente en el mundo natural. Aunque su patogenicidad es normalmente baja, es un patógeno que produce infecciones oportunistas que se producen frecuentemente en pacientes que padecen diversas enfermedades preexistentes tales como cáncer y diabetes, y en pacientes administrados con productos farmacéuticos que tienen acción inmunoinhibidora, y puede frecuentemente producir neumonía, infección de las vías urinarias, septicemia y similares conduciendo a resultados graves. En campos clínicos, la infección por *Pseudomonas aeruginosa* se considera una de las infecciones más difíciles de tratar debido a que no solo *Pseudomonas aeruginosa* tiene sensibilidad inherentemente baja a antibióticos existentes, sino que también tiene alta tendencia a adquirir fácilmente resistencia a diversos antibióticos y se vuelve difícil de curar. Así, para *Pseudomonas aeruginosa*, la medida de desarrollar nuevos antibióticos uno tras otro está limitada, y se desea fuertemente un procedimiento terapéutico que no se base en antibióticos.

[0003] La alta citotoxicidad de *Pseudomonas aeruginosa* se ejerce mediante la inyección de toxina en una célula eucariota mediante un sistema de secreción de exotoxina de tipo III. PcrV es una proteína de 294 residuos (nº de acceso de NCBI AAC45935, SEQ NO: 1) que constituye el sistema de secreción de exotoxina de tipo III, y una secuencia de operón que codifica la misma está abierta al público (Documento de patente 1, Documento de no patente 1). Como el control de PcrV puede conducir posiblemente a medios terapéuticos en infección por *Pseudomonas aeruginosa* (Documento de no patente 2), se informan anticuerpos policlonales (Documentos de no patente 3, 4) y anticuerpos monoclonales (Documento de patente 2, Documentos de no patente 5, 6) contra PcrV que tienen actividad neutralizante. Sin embargo, los anticuerpos policlonales son difíciles de humanizar y de usar como composiciones farmacéuticas debido a la dificultad en mejorar la antigenicidad. Los anticuerpos monoclonales que se han informado hasta la fecha también tienen baja actividad neutralizante y fracasan en satisfacer los requisitos en campos clínicos.

Documento de patente 1: patente de EE.UU. nº 6.551.795

Documento de patente 2: traducción japonesa de la publicación PCT nº. 2005-500250

Documento de no patente 1: Yahr, T.L. y col., J. Bacteriol., 1997, vol. 179, pág. 7165

Documento de no patente 2: T. Sawa y col., Nature Medicina, 1999, vol. 5, pág. 392

Documento de no patente 3: Shime N y col., J. Immunol. 2001, vol. 167, pág. 5880

Documento de no patente 4: Imamura Y y col., Eur. Respir. J., 2007, vol. 29, pág. 965

Documento de no patente 5: Karine Faure y col., J. Immune. Based. Therapies and Vaccines, 2003, vol. 1

Documento de no patente 6: Dara W. Frank y col., J. Infect. Disease, 2002, vol. 186, pág. 64

Divulgación de la invención

Problema a resolver por la invención

50

[0004] Es un objetivo de la presente invención proporcionar una medida que sea eficaz en la terapia de infección, en particular, infección por *Pseudomonas aeruginosa*.

Medios para resolver el problema

55

[0005] Como resultado de laboriosos esfuerzos en la preparación de anticuerpo monoclonal contra PcrV, los presentes inventores han tenido éxito en la preparación de un anticuerpo monoclonal novedoso que se considera que tiene mayor efecto terapéutico sobre la enfermedad, en comparación con un anticuerpo monoclonal anti-PcrV convencionalmente conocido, y han completado la presente invención.

[0006] Para ser más específica, la presente invención se refiere a la materia de las reivindicaciones 1-9. También se desvelan (1) un anticuerpo monoclonal contra PcrV o una parte del mismo, que tiene al menos una característica seleccionada de:

5

(A) inhibir el 50% o más de citotoxicidad para célula de leucocito de *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 1 nM a 200 nM *in vitro*;

10 (B) inhibir el 50% o más de citotoxicidad para célula de mieloma de *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 1 nM a 50 nM *in vitro*; y

(C) tener una constante de disociación (Kd) con PcrV de 2×10^{-9} (M) o menos;

15 (2) un anticuerpo monoclonal o una parte del mismo, que tiene la secuencia de aminoácidos en la que la región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal se produjo por cualquiera del hibridoma depositado como un número de acceso de FERM BP-11085 e hibridoma depositado como un número de acceso de FERM BP-11086;

20 (3) un anticuerpo monoclonal o una parte del mismo, producido por cualquiera del hibridoma depositado como un número de acceso de FERM BP-11085 e hibridoma depositado como un número de acceso de FERM BP-11086;

(4) un anticuerpo monoclonal contra PcrV o una parte del mismo, que tiene su epítipo en las posiciones 136 a 233 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;

25 (5) un anticuerpo monoclonal contra PcrV o una parte del mismo, que tiene 1) en una región determinante de la complementariedad, una región variable de la cadena pesada que incluye la siguiente secuencia de aminoácidos: SFTSYWMH (SEQ ID NO: 15), INPSNGRTNYNEKFNT (SEQ ID NO: 16), YGNYVVYYTMDY (SEQ ID NO: 17) y 2) en una región determinante de la complementariedad, una región variable de la cadena ligera que incluye la siguiente secuencia de aminoácidos: SASTSVSYME (SEQ ID NO: 18), TTSKLAS (SEQ ID NO: 19), HQWRNYPFT
30 (SEQ ID NO: 20);

(6) un anticuerpo monoclonal contra PcrV o una parte del mismo, que tiene 1) en una región determinante de la complementariedad, una región variable de la cadena pesada que incluye la siguiente secuencia de aminoácidos: SITSDYAWN (SEQ ID NO: 21), YITYNGDTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 22), SRNYYGAWFAY (SEQ ID NO: 23) y 2) en
35 una región determinante de la complementariedad, una región variable de la cadena ligera que incluye la siguiente secuencia de aminoácidos: KASQYVGTTVA (SEQ ID NO: 24), RASTRHT (SEQ ID NO: 25), QQYCSSPLT (SEQ ID NO: 26);

40 (7) un anticuerpo monoclonal contra PcrV o una parte del mismo, que tiene 1) una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y 2) una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;

45 (8) un anticuerpo monoclonal contra PcrV o una parte del mismo, que tiene 1) una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y 2) una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;

(9) una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o una parte del mismo según una cualquiera de (1) a (8), como principio activo; y

50 (10) un hibridoma que produce el anticuerpo o una parte del mismo según una cualquiera de (1) a (8).

Efecto de la invención

[0007] Un anticuerpo monoclonal o una parte del mismo de la presente invención es útil como agente terapéutico de infección debido a su muy excelente actividad neutralizante sobre PcrV.

Breve explicación de los dibujos

[0008]

[Fig. 1] La Fig. 1 muestra curvas en las que PcrV marcada con biotina está sustituida con PcrV no marcada en anticuerpos para PcrV (1F3, 2A4, 6F5, 7A7 y Mab166).

5 [Fig. 2] La Fig. 2 muestra afinidades de anticuerpos para PcrV (1F3, 2A4, 6F5, 7A7 y Mab166) determinadas por análisis de resonancia de plasmones superficiales.

[Fig. 3] La Fig. 3 muestra resultados de ensayos de sándwich entre anticuerpos para PcrV (1F3, 2A4, 6F5, 7A7 y Mab166) y Mab166.

10

[Fig. 4] La Fig. 4 muestra efectos inhibidores de anticuerpos para PcrV (1F3, 2A4, 6F5, 7A7 y Mab166) sobre la citotoxicidad para células U937 de la cepa SR24 de *Pseudomonas aeruginosa*.

[Fig. 5] La Fig. 5 muestra efectos inhibidores de anticuerpos para PcrV (1F3, 2A4, 6F5, 7A7 y Mab166) sobre la
15 citotoxicidad para células de mieloma P3U1 de la cepa SR24 de *Pseudomonas aeruginosa*.

[Fig. 6] La Fig. 6 muestra curvas en las que PcrV marcada con biotina está sustituida con PcrV de longitud completa no marcada y PcrV truncada en anticuerpos para PcrV (1F3, 2A4, 9D12, 12H9 y Mab166).

20 [Fig. 7] La Fig. 7 muestra la reactividad con PcrV de longitud completa y PcrV truncada en anticuerpos para PcrV (1F3, 2A4, 9D12, 12H9 y Mab166) en transferencia Western.

[Fig. 8] La Fig. 8 muestra la correlación entre anticuerpo y PcrV de longitud completa por supresión de la actividad inhibidora de la citotoxicidad.

25

[Fig. 9] La Fig. 9 muestra la correlación entre anticuerpo y PcrV truncada por supresión de la actividad inhibidora de la citotoxicidad.

[Fig. 10] La Fig. 10 muestra la secuencia de aminoácidos de una región variable del anticuerpo 1F3. Lo subrayado
30 indica una región CDR.

[Fig. 11] La Fig. 11 muestra secuencia de aminoácidos de una región variable de anticuerpo 2A4. Lo subrayado indica una región CDR.

35 Mejor modo para llevar a cabo la invención

[0009] El "anticuerpo monoclonal" que es un objetivo de la presente divulgación es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la PcrV anteriormente mencionada. Más concretamente, es un anticuerpo monoclonal contra PcrV que tiene al menos una característica seleccionada de (1) inhibir el 50% o más de citotoxicidad para
40 célula de leucocito por *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 1 nM a 200 nM *in vitro*; (2) inhibir el 50% o más de citotoxicidad para célula de mieloma por *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 1 nM a 50 nM *in vitro*; y (3) tener una constante de disociación (Kd) con PcrV de 2×10^{-9} (M) o menos.

[0010] Una característica del anticuerpo monoclonal de la presente divulgación es tener fuerte actividad
45 inhibidora de la citotoxicidad. Por ejemplo, si se usa célula de leucocito, el anticuerpo monoclonal tiene actividad (neutralizante) inhibidora tal que inhibe el 50% o más de la citotoxicidad de *Pseudomonas aeruginosa*, a un intervalo de concentración de 1 a 200 nM, preferentemente de 2 a 100 nM, y más preferentemente de 5 a 25 nM. Si se usa célula de mieloma, el anticuerpo monoclonal tiene actividad (neutralizante) inhibidora tal que inhibe el 50% o más de la citotoxicidad de *Pseudomonas aeruginosa*, a un intervalo de concentración de 1 a 50 nM, preferentemente de 2 a
50 30 nM, y más preferentemente de 4 a 20 nM. Estos valores superan con creces las actividades numéricas para Mb166 informado en Dara W. Frank y col. (J. Infect. Disease, 2002, vol. 186, p. 64).

[0011] Otra característica del anticuerpo monoclonal de la presente divulgación es tener su epítipo en una
región de las posiciones 136 a 233 de secuencia de aminoácidos de longitud completa de PcrV (SEQ NO: 1). Los
55 presentes inventores han encontrado que un anticuerpo que reconoce esta región tiene actividad más fuerte (actividad inhibidora de la citotoxicidad) que un anticuerpo que reconoce otra región.

[0012] El epítipo de reconocimiento del anticuerpo monoclonal puede identificarse del siguiente modo. Primero, se prepara una variedad de estructuras parciales de una molécula a reconocer por el anticuerpo

monoclonal. Para la preparación de estructuras parciales se conoce un procedimiento de preparación de diversos péptidos parciales de la molécula con una técnica de síntesis de oligopéptidos conocida, un procedimiento de producirlos en o fuera del huésped tal como *E. coli* incorporando en un plásmido de expresión adecuado una secuencia de ADN que codifica un péptido parcial objetivo con una técnica de recombinación genética, y similares; 5 sin embargo, es general usar combinación de estos procedimientos para el objetivo anteriormente mencionado. Por ejemplo, después de preparar una serie de polipéptidos acortados en una longitud apropiada del extremo C o extremo N de la proteína de antígeno usando una técnica de recombinación genética muy conocida por un experto en la materia, la reactividad del anticuerpo monoclonal con estos polipéptidos se examina y se determina aproximadamente un sitio de reconocimiento.

10

[0013] Después, una variedad de oligopéptidos de la parte correspondiente, mutantes del péptido, o similares, se sintetizan más finamente usando una técnica de síntesis de oligopéptidos muy conocida por un experto en la materia, y la determinación de epítipo se hace examinando la capacidad de unión de un anticuerpo monoclonal que contiene un agente profiláctico o terapéutico de la presente divulgación como principio activo, con estos péptidos, o 15 examinando la actividad inhibitora competitiva de estos péptidos para unirse entre el anticuerpo monoclonal y el antígeno. Como procedimiento conveniente para obtener una variedad de oligopéptidos también puede usarse un kit comercialmente disponible (por ejemplo, el kit SPOTs (disponible de Genosys Biotechnologies, Inc.), o una serie de kit de síntesis de multipin/péptidos con un procedimiento de síntesis de multipin (disponible de Chiron Corporation).

20 **[0014]** La actividad inhibitora de la citotoxicidad puede medirse del siguiente modo. Primero, un anticuerpo monoclonal para el que la actividad inhibitora de la citotoxicidad va a medirse se diluye en concentraciones apropiadas en series de diluciones dobles.

A continuación, las células que están influenciadas por la toxina de *Pseudomonas aeruginosa* o similares (en lo sucesivo denominadas células diana) se diluyen, por ejemplo, usando un medio de cultivo para cultivo celular, para lograr un 25 número apropiado. Concretamente, se prefiere ajustar a 3×10^6 a 5×10^6 células/ml cuando las células de mieloma se usan, y para ajustar a 1×10^6 a 3×10^6 células/ml cuando se usan células leucocitarias. Asimismo, células de *Pseudomonas aeruginosa* también se ajustan a 1×10^7 a 5×10^8 ufc/ml usando, por ejemplo, un medio de cultivo. En presencia del anticuerpo monoclonal, células de *Pseudomonas aeruginosa* y células diana se cultivan en el 30 mismo tubo de ensayo o pocillo (por ejemplo, condición *in vitro* tal como un pocillo sobre una microplaca) en una condición de cultivo apropiada. La condición de cultivo en este momento puede ser una condición de cultivo comúnmente empleada considerada como apta para el crecimiento de células o bacterias. Al igual que para el tiempo de cultivo, la condición óptica cambia apropiadamente dependiendo del tipo de células diana y, por ejemplo, se prefieren aproximadamente 1 a 3 hora(s) para el caso de uso de células de mieloma, y aproximadamente 1 a 3 35 hora(s) para el caso de uso de célula de leucocitos. Tomando un pocillo no añadido con un anticuerpo como grupo de control se calcula una concentración a la que se observa la inhibición al 50% en comparación con el grupo de control (concentración eficaz). En cuanto a la decisión de células diana vivas y muertas, aunque se han establecido diversos procedimientos es útil, por ejemplo, la medición de absorbancia a una longitud de onda apropiada (por ejemplo, 400 a 500 nm) después de la adición de un reactivo de coloración (véase Nature Medicine 1999, vol. 5, 40 pág. 392-395, para referencia).

[0015] Una característica del anticuerpo monoclonal de la presente divulgación es tener alta afinidad con PcrV. La constante de disociación (Kd) que se usa como índice de afinidad con anticuerpo de anticuerpo monoclonal puede analizarse de diversas formas. Por ejemplo, el análisis pueden realizarse fácilmente según el procedimiento 45 de Scatchard usando un antígeno marcado con diversos agentes de marcado, o un procedimiento usando un kit de medición comercialmente disponible Biacore X (disponible de Amersham Pharmacia) o un kit similar según el manual de instrucciones y el protocolo de experimentación adjunto al kit. La constante de disociación (valor de Kd) determinada usando un procedimiento tal se representa en una unidad de M (moles). Cuanto más pequeña sea la constante de disociación del anticuerpo monoclonal probado, más fuerte será la afinidad que tiene el anticuerpo 50 monoclonal probado. En cuanto al anticuerpo monoclonal de la presente divulgación o una parte del mismo, la constante de disociación (Kd) de PcrV es 2×10^{-9} (M) o menos, preferentemente $1,5 \times 10^{-9}$ (M) o menos, y más preferentemente $1,2 \times 10^{-9}$ (M) o menos.

[0016] En el anticuerpo monoclonal de la presente divulgación, preferentemente, regiones variables de la 55 cadena pesada y cadena ligera se derivan de ser humano, y pueden tener una secuencia de un cuerpo modificado de SEQ ID Nos. 11 a 14 (por ejemplo, que incluyen ilimitadamente aquellas que tiene sustitución, inserción, adición o delección de uno o varios aminoácidos). El dominio de la región constante incluye preferentemente un dominio de la región constante humana apropiada (por ejemplo, aquellos descritos en Kabat E. A. y col., US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health). Mediante la comprobación de la homología

aplicando secuencias de aminoácidos de la región variable a la base de datos de secuencias de aminoácidos de anticuerpos preparadas por Kabat y col. ("Sequences of Proteins of Immunological Interest" US Dept. Health and Human Services, 1983) se encontrará una región CDR. En cuanto a la secuencia de la región CDR, un cuerpo modificado con al menos una adición, inserción, sustitución o delección puede englobarse en la presente divulgación en tanto que se mantenga una bioactividad (por ejemplo, actividad de unión o actividad neutralizante) solicitada en la presente divulgación. Se citan secuencias que tienen homología con cada región CDR del 90 al 100%. Preferentemente, se citan secuencias que tienen homología del 95 al 100%. Más preferentemente, se citan secuencias que tienen homología del 98 al 100%.

10 **[0017]** La región estructural puede relacionarse con cualquier tipo de región estructural, y se deriva preferentemente de ser humano. Pueden seleccionarse regiones estructurales apropiadas con referencia al documento de Kabat E.A. y col. La región estructural de la cadena pesada preferible es una región estructural de la cadena pesada humana y, por ejemplo, una región estructural del anticuerpo anti-PcrV mostrado en la Fig. 10 o Fig. 11. Esto puede determinarse de la secuencia mostrada en la Fig. 10 o la Fig. 11 con referencia al documento anterior. En un modo similar, una región estructural de la cadena ligera anti-PcrV puede determinarse a partir de la secuencia mostrada en la Fig. 10 o la Fig. 11 con referencia al documento anterior.

20 **[0018]** En el anticuerpo monoclonal de la presente invención, como se define en las reivindicaciones, como un modo más preferido, puede incluirse un anticuerpo que contiene al menos a) (i) una región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (V_H) o un fragmento de la misma que contiene CDR1, CDR2 y CDR3 que son regiones determinantes de la complementariedad en su secuencia en las que CDR1 tiene una secuencia de aminoácidos SFTSYWMH (SEQ ID NO: 15), CDR2 tiene una secuencia de aminoácidos INPSNGRTNYNEKFN (SEQ ID NO: 16) y CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos YGNVYVYYTMDY (SEQ ID NO: 17), y (ii) una parte constante de la cadena pesada humana o un fragmento de la misma.

25 Entonces, se prefiere que b) contenga (i) una región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina (V_L) en la que CDR1 tiene una secuencia de aminoácidos SASTSVSYME (SEQ ID NO: 18), CDR2 tiene una secuencia de aminoácidos TTSKLAS (SEQ ID NO: 19) y CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos HQWRNYPFT (SEQ ID NO: 20), y (ii) una parte constante de la cadena ligera humana o un fragmento de la misma.

30 **[0019]** También se desvela un anticuerpo que contiene al menos a) (i) una región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (V_H) o un fragmento de la misma que contiene CDR1, CDR2 y CDR3 que son regiones determinantes de la complementariedad en su secuencia en la que CDR1 tiene una secuencia de aminoácidos SITSDYAWN (SEQ ID NO: 21), CDR2 tiene una secuencia de aminoácidos YITYNGDTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 22) y CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos SRNYGAWFAY (SEQ ID NO: 23), y (ii) una parte constante de la cadena pesada humana o un fragmento de la misma.

35 Entonces, se prefiere que b) contenga (i) una región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina (V_L) en la que CDR1 tiene una secuencia de aminoácidos KASQYVGTTVA (SEQ ID NO: 24), CDR2 tiene una secuencia de aminoácidos RASTRHT (SEQ ID NO: 25) y CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos QQYCSSLT (SEQ ID NO: 26), y (ii) una parte constante de la cadena ligera humana o un fragmento de la misma.

45 **[0020]** El anticuerpo monoclonal de la presente divulgación puede prepararse por un procedimiento de producción comúnmente usado existente usando PcrV (cuerpo natural, cuerpo recombinante, cuerpo sintético, etc.) como inmunogén. Concretamente, primero, un mamífero, preferentemente, ratón, rata, hámster, cobaya, conejo, gato, perro, cerdo, cabra, ovejas, burro, caballo o bovino (incluyendo animales transgénicos creados para producir anticuerpo derivado de otro animal, como ratón transgénico productor de anticuerpos humanos), más preferentemente ratón, rata, hámster, cobaya o conejo, se inmuniza con PcrV que sirve de inmunogén, junto con adyuvante de Freund según sea necesario, por una o varias veces de inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraplantar o intraperitoneal. Normalmente, la inmunización se realiza de una vez a cuatro veces cada aproximadamente 1 a 21 días después de la inmunización primaria, y las células productoras de anticuerpos pueden adquirirse del mamífero inmunizado después de aproximadamente 1 a 10 días desde la inmunización final. El número de veces e intervalo de tiempo de inmunización puede cambiarse apropiadamente dependiendo de la propiedad del inmunogén que se usa.

55 **[0021]** Ejemplos de PcrV usadas como inmunogén o hapteno son los siguientes.

(A) Células que expresan PcrV sobre la superficie celular, o cepas de células establecidas artificialmente para expresar PcrV sobre la superficie celular, o células recombinantes génicas creadas usando una técnica de

recombinación genética para expresar PcrV sobre la superficie celular;

(B) Sobrenadante de cultivo obtenido cultivando células recombinantes génicas creadas por técnica de recombinación genética para expresar PcrV o una parte de la misma como proteína, o PcrV o una parte de la misma purificada del sobrenadante de cultivo; o

(C) PcrV químicamente sintetizada o una parte de la misma.

[0022] El hibridoma que secreta anticuerpo monoclonal puede prepararse según el procedimiento de Kohler y Milstein (Nature, 1975, vol. 256, pág. 495-497) y un procedimiento correspondiente. Es decir, el hibridoma puede prepararse para la fusión de células entre una célula productora de anticuerpos contenida en el bazo, ganglio linfático, médula ósea, amígdalas o similares, preferentemente en bazo adquirido de un mamífero inmunizado como se ha descrito anteriormente, y una célula de mieloma que carece de capacidad productora de autoanticuerpos derivada, preferentemente, de un mamífero tal como ratón, rata, cobaya, hámster, conejo o ser humano, más preferentemente de ratón, rata o ser humano.

[0023] Como célula de mieloma usada en la fusión de células generalmente pueden usarse líneas celulares obtenidas de ratón, por ejemplo, cepa de mieloma de ratón resistente a 8-azaguanidina (derivado de BALB/c) P3X63Ag8U.1 (P3-U1) [Yelton, D.E. y col., Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)], P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1) [Kohler, G. y col. European J. Immunology, 6, 511-519 (1976)], SP2/O-Ag14 (SP-2) [Shulman, M. y col. Nature, 276, 269-270 (1978)], P3X63Ag8, 653(653) [Kearney, J. F. y col. J. Immunology, 123, 1548-1550 (1979)], P3X63Ag8(X63) [Horibata, K. y Harris, A. W. Nature, 256, 495-497 (1975)] y similares.

[0024] El hibridoma que produce anticuerpo monoclonal se criba cultivando un hibridoma, por ejemplo, en una placa de microtitulación, midiendo la reactividad para un inmunogén usado en inmunización de ratón como se ha descrito anteriormente en sobrenadante de cultivo en el pocillo en el que se observa la proliferación, por un procedimiento de medición inmunitaria tal como RIA o ELISA, y seleccionando un clon que produce un anticuerpo monoclonal que presenta afinidad específica con el inmunogén o hapteno. Entonces, normalmente se usa un ELISA no competitivo en el que un inmunogén se transforma en fase sólida, y un anticuerpo en sobrenadante de cultivo que se une al inmunogén en fase sólida se detecta por un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con enzima.

[0025] La producción de anticuerpo monoclonal a partir de hibridoma puede lograrse cultivando hibridoma *in vitro* o en ascitis de ratón, rata, cobaya, hámster o conejo, preferentemente de ratón o rata, o más preferentemente de ratón, seguido de aislamiento del sobrenadante de cultivo obtenido o ascitis de mamífero. En el caso de cultivo *in vitro*, el hibridoma puede cultivarse en un medio nutritivo conocido o en cualquier cultivo nutritivo derivado y preparado de un medio base conocido usado para proliferar, mantener y guardar hibridoma y para producir anticuerpo monoclonal en sobrenadante de cultivo, dependiendo de diversas condiciones tales como la propiedad de las especies de células cultivadas, objetivo de la investigación de prueba y procedimiento de cultivo.

[0026] Como medio base puede citarse, por ejemplo, medio con bajo contenido de calcio tal como medio Ham'F12, medio MCDB153 o cultivo MEM con bajo contenido de calcio, y medio con alto contenido de calcio tal como medio MCDB104, medio MEM, medio D-MEM, medio RPMI1640, medio AF104 o medio RD, y un medio base tal puede contener, por ejemplo, suero, hormona, citocina y/o diversas sustancias inorgánicas u orgánicas dependiendo del objetivo. El aislamiento y purificación de anticuerpo monoclonal puede lograrse sometiendo el sobrenadante de cultivo o ascitis como se ha descrito anteriormente a sulfato de amonio saturado, cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, DEAE o DE52), cromatografía en columna de afinidad tal como columna anti-inmunoglobulina o columna de proteína A o similares.

[0027] Como anticuerpo monoclonal de la presente divulgación puede usarse un anticuerpo recombinante que se produce usando técnica de recombinación genética de tal manera que un gen de anticuerpo se clone de célula productora de anticuerpos, por ejemplo, hibridoma, y se incorpore en un vector apropiado, y el vector se introduzca en un huésped (por ejemplo, Carl y col., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, publicado en 1990).

[0028] Concretamente, ARNm que codifica una región variable (región V) de anticuerpo se aísla de un hibridoma que produce un anticuerpo objetivo, o de una célula inmune que produce un anticuerpo, por ejemplo, de una célula obtenida inmortalizando linfocito sensibilizado o similares por gen de cáncer o similares. En el aislamiento de ARNm, ARN completo se prepara mediante un procedimiento conocido, por ejemplo, por ultracentrifugación con guanidina (Chirgwin, J. M. y col., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299) o similares, y se prepara ARNm usando el kit de purificación de ARNm (disponible de Pharmacia) o similares.

- [0029]** A partir del ARNm obtenido se sintetiza ADNc de la región V del anticuerpo usando una transcriptasa inversa. La síntesis de ADNc puede realizarse usando el kit de síntesis de ADNc monocatenario con transcriptasa inversa AMV o similares. Además, para la síntesis y amplificación de ADNc puede usarse el kit 5'-Ampli FINDER RACE (disponible de Clontech) y el procedimiento 5'-RACE usando PCR (Frohman, M. A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, vol. 85, pág. 8998). Un fragmento de ADN objetivo se purifica del producto de PCR obtenido, y se conecta con ADN de vector. Así se crea un vector recombinante y se introduce en *E. coli* o similares, y se selecciona una colonia y se prepara un vector recombinante deseado. La secuencia de bases de ADN del ADN objetivo se verifica mediante un procedimiento conocido, por ejemplo, por el procedimiento de desoxi.
- [0030]** Si se obtiene ADN que codifica la región V del anticuerpo objetivo, el ADN se conecta con ADN que codifica una región constante del anticuerpo deseado (región C) y se incorpora en un vector de expresión. Alternativamente, el ADN que codifica la región V del anticuerpo puede incorporarse en un vector de expresión que contiene ADN de la región C del anticuerpo. Para la producción de anticuerpo usado en la presente divulgación, el gen de anticuerpo se incorpora en un vector de expresión de una manera tal que se exprese bajo el control de una región de control de la expresión, por ejemplo, potenciador/promotor. A continuación, una célula huésped puede transformarse con este vector de expresión para producir la expresión de anticuerpo.
- [0031]** Para la expresión del gen de anticuerpo, la cadena pesada (cadena H) o cadena ligera (cadena L) del anticuerpo pueden incorporarse por separado en vectores de expresión, o un huésped puede co-transformarse con estos vectores de expresión, o ADN que codifica la cadena H y cadena L puede incorporarse en un único vector de expresión para transformar un huésped con el vector de expresión resultante (véase el documento WO94/11523).
- [0032]** El anticuerpo monoclonal de la presente invención incluye anticuerpos monoclonales de tipo recombinantes de genes que se modifican artificialmente con el fin de reducir la antigenicidad heteróloga contra ser humano, por ejemplo, anticuerpo monoclonal quimérico, anticuerpo monoclonal humanizado y anticuerpo monoclonal humano.
- [0033]** El anticuerpo monoclonal quimérico está compuesto por región V derivada de anticuerpo de un mamífero distinto de ser humano y región C derivada de anticuerpo humano, y el anticuerpo monoclonal humanizado está compuesto por CDR derivada de anticuerpo de un mamífero distinto de ser humano y regiones FR y C derivadas de anticuerpo humano, y estos anticuerpos monoclonales son útiles como anticuerpo usado en la presente invención ya que se reduce la antigenicidad en el cuerpo humano. Estos anticuerpos monoclonales modificados pueden producirse usando procedimiento conocido.
- [0034]** El anticuerpo monoclonal quimérico se obtiene conectando ADN que codifica la región V del anticuerpo obtenida como se ha descrito anteriormente con ADN que codifica la región C del anticuerpo humano, incorporando el ADN resultante en un vector de expresión, e introduciendo el vector de expresión en un huésped para provocar la producción (por ejemplo, documento WO95/14041). Usando este procedimiento conocido puede obtenerse el anticuerpo monoclonal quimérico útil en la presente invención.
- [0035]** El anticuerpo monoclonal humanizado se obtiene trasplantado una región determinante de la complementariedad (CDR) de anticuerpo de un mamífero distinto de ser humano, por ejemplo, de un ratón, en CDR de anticuerpo humano, y también se conoce una técnica recombinante de genes general para esto (por ejemplo, el documento WO95/14041).
- [0036]** Concretamente, se sintetiza una secuencia de ADN diseñada de manera que la CDR de anticuerpo de ratón y la región estructural (FR) de anticuerpo humano estén conectadas por procedimiento de PCR de varios oligonucleótidos preparados para tener partes solapantes en sus extremos. El ADN obtenido está conectado con ADN que codifica la región C del anticuerpo humano y se incorpora en un vector de expresión, y el vector de expresión resultante se introduce en un huésped para provocar la producción (por ejemplo, documento WO95/14041).
- [0037]** Como FR de anticuerpo humano conectado por CDR se selecciona aquella en la que la CDR forma un buen sitio de unión a antígeno. Según sea necesario, el aminoácido de FR en la región V del anticuerpo puede estar sustituida de manera que la CDR reconstruida de anticuerpo humano forme un sitio de unión a antígeno apropiado (Sato, K. y col., Cancer Res. 1993, vol. 53, pág. 851). En un anticuerpo monoclonal quimérico y un anticuerpo monoclonal humanizado se usa la región C del anticuerpo humano. Como región C del anticuerpo humano preferida puede citarse C γ y, por ejemplo, pueden usarse C γ 1, C γ 2, C γ 3 y C γ 4. Además, para mejorar la estabilidad del

anticuerpo o su producción, puede modificarse la región C del anticuerpo humano.

[0038] El anticuerpo monoclonal humano está compuesto por la región V y la región C derivadas de anticuerpo humano, y puede producirse inmunizando un mamífero no humano transgénico que produce anticuerpos humanos tales como ratón transgénico productor de anticuerpos humanos (por ejemplo, documento WO94/25585) con un inmunogén, según un procedimiento de producción general existente de anticuerpo monoclonal.

[0039] En la presente invención, el término "parte de anticuerpo monoclonal" significa una región que es una parte del anticuerpo monoclonal anteriormente mencionado de la presente invención y tiene capacidad de unión específica por PcrV, al igual que el anticuerpo monoclonal (en lo sucesivo, también denominado simplemente "fragmento de anticuerpo").

[0040] Concretamente, pueden citarse Fab (fragmento de unión a antígeno), F(ab')₂, Fab', anticuerpo monocatenario (Fv monocatenario; en lo sucesivo indicado por scFv), anticuerpo estabilizado por disulfuro (Fv estabilizado por disulfuro; en lo sucesivo indicado por dsFv), fragmento de la región V dimerizado (en lo sucesivo, indicado por diacuerpo), péptido que contiene CDR, que tiene capacidad de unión específica a PcrV (Expert Opinion on Therapeutic Patents, vol. 6, nº 5, pág. 441-456, 1996).

[0041] Fab es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 con actividad de unión a antígeno, constituido por aproximadamente una mitad del lado del extremo N de la cadena H y la cadena L completa, obtenido degradando con una enzima papaína una parte de péptido sobre dos enlaces disulfuro (enlace S-S) reticulando dos cadenas H en la región bisagra de IgG. El Fab usado en la presente invención puede obtenerse tratando el anticuerpo monoclonal de la presente invención con papaína. Alternativamente, el Fab puede producirse insertando ADN que codifica Fab de anticuerpo monoclonal de la presente invención en un vector de expresión para célula e introduciendo el vector en una célula para producir expresión.

[0042] F(ab')₂ es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 con actividad de unión a antígeno, formado uniendo dos regiones Fab' en una parte de bisagra. Estas regiones de Fab' se obtienen por degradación con pepsina debajo de dos enlaces S-S de la región bisagra de IgG. El F(ab')₂ usado en la presente invención puede obtenerse tratando el anticuerpo monoclonal de la presente invención con pepsina. Alternativamente, el F(ab')₂ puede producirse insertando ADN que codifica F(ab')₂ del anticuerpo monoclonal en un vector de expresión para célula e introduciendo el vector en célula de *E. coli*, levadura o de animal para provocar la expresión.

[0043] Fab' es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 con actividad de unión a antígeno, obtenido cortando el enlace S-S entre las bisagras de F(ab')₂ anteriormente mencionado. El Fab' usado en la presente invención puede obtenerse tratando el F(ab')₂ del anticuerpo monoclonal de la presente invención con un agente reductor, ditiotreitól. Alternativamente, el Fab' puede producirse insertando ADN que codifica Fab' del anticuerpo monoclonal en un vector de expresión para célula e introduciendo el vector en célula de *E. coli*, levadura o de animal para provocar la expresión.

[0044] scFv es el péptido VH-P-VL o VL-P-VH en el que una cadena VH y una cadena VL se conectan usando un ligador de péptidos apropiado (en lo sucesivo, indicado por P), y es un fragmento de anticuerpo que tiene actividad de antígeno. VH y VL contenidas en scFv usado en la presente invención pueden derivarse del anticuerpo monoclonal de la presente invención. scFv usado en la presente invención puede producirse adquiriendo ADNc que codifica VH y VL de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de la presente invención, construyendo un vector de expresión de scFv y provocando la expresión introduciendo el vector de expresión en célula de *E. coli*, levadura o de animal.

[0045] dsFv se refiere a uno obtenido uniendo polipéptidos, en el que cada residuo de aminoácido está sustituido con un residuo de cisteína en VH y VL, mediante enlace S-S. El aminoácido que va a sustituirse con el residuo de cisteína puede seleccionarse basándose en la predicción de la estructura terciaria de anticuerpo según el procedimiento indicado por Reiter y col. (Protein Engineering, 7, 697 (1994)). VH o VL contenidas en dsFv usado en la presente invención pueden derivarse del anticuerpo monoclonal de la presente invención. dsFv usado en la presente invención puede producirse adquiriendo ADNc que codifica VH y VL de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de la presente invención, construyendo un vector de expresión de dsFv insertándolo en un vector de expresión apropiado y provocando la expresión introduciendo el vector de expresión en célula de *E. coli*, levadura o de animal.

[0046] El diacuerpo es un fragmento de anticuerpo en el que se forma un dímero de scFv que tienen la misma especificidad de unión a antígeno o diferente, y es un fragmento de anticuerpo que tiene actividad de unión a antígeno bivalente para el mismo antígeno o dos actividades de unión a antígeno específicas para diferentes antígenos. Por ejemplo, el diacuerpo bivalente que reacciona específicamente con el anticuerpo monoclonal de la presente invención puede producirse adquiriendo ADNc que codifica VH y VL de un anticuerpo monoclonal de la presente invención, construyendo ADN que codifica scFv que tiene un péptido ligador de 3 a 10 residuos, insertando el ADN en un vector de expresión para célula y provocando la expresión de diacuerpo introduciendo el vector de expresión resultante en la célula de *E. coli*, levadura o de animal.

10 **[0047]** El péptido que contiene CDR incluye al menos una región de CDR de VH o VL. Pueden combinarse múltiples CDR directamente o mediante un ligador de péptido apropiado. El péptido que contiene la CDR usada en la presente invención puede producirse adquiriendo ADNc que codifica VH y VL de un anticuerpo monoclonal de la presente invención, construyendo ADN que codifica CDR, insertando el ADN en un vector de expresión para célula de animal y provocando la expresión introduciendo el vector de expresión resultante en célula de *E. coli*, levadura o de animal. El péptido que contiene CDR también puede producirse por procedimiento de síntesis química tal como procedimiento de Fmoc (procedimiento de fluorenilmetiloxycarbonilo) o procedimiento de tBoc (procedimiento de t-butiloxycarbonilo).

[0048] Un anticuerpo monoclonal de la presente invención o una parte del mismo puede modificarse en tanto que se use adecuadamente en la presente invención. Como sustancia modificada pueden usarse anticuerpos unidos a diversas moléculas que incluyen polietilenglicol (PEG) y similares. La modificación hecha en el anticuerpo puede ser modificación por introducción de enlace químico, o puede ser modificación hecha en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Un anticuerpo monoclonal de la presente invención o una parte del mismo también engloba estas sustancias modificadas de anticuerpo. Para obtener tales sustancias modificadas de anticuerpo, el anticuerpo obtenido puede modificarse. Estas técnicas ya se han establecido en la materia.

[0049] Un anticuerpo monoclonal de la presente invención y una parte del mismo es útil como composición farmacéutica. Por tanto, una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo monoclonal de la presente invención y una parte del mismo puede administrarse sistémicamente o tópicamente por vía oral o parenteral. Para administración parenteral puede seleccionarse, por ejemplo, inyección intravenosa tal como infusión por goteo, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, administración intranasal, inhalación y similares. Sin embargo, como se sabe que *Pseudomonas aeruginosa* provocará lesión, particularmente en células epiteliales de pulmón y macrófago de alveolo pulmonar por infección del tracto respiratorio (T. Sawa y col., Nature Medicine, 1999, vol. 5, pág. 392), se desean administración intranasal e inhalación.

[0050] Una composición farmacéutica de la presente invención se administra para terapia de un paciente que padece fibrosis quística o infección por *Pseudomonas aeruginosa*. Por ejemplo, la dosis eficaz se selecciona en el intervalo de 0,01 mg a 100 mg por 1 kg de peso corporal por vez. Alternativamente puede seleccionarse una dosis de 1 a 1000 mg, preferentemente una dosis de 5 a 50 mg por paciente. Sin embargo, una dosis de la composición farmacéutica que contiene el anticuerpo monoclonal de la presente invención o una parte del mismo no se limita a estas dosis. La duración de la administración puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de la edad, síntoma y similares del paciente. La composición farmacéutica de la presente invención también puede incluir un vehículo o aditivo farmacéuticamente aceptable, además de depender de la vía de administración.

45 Ejemplos de tal vehículo y aditivo incluyen agua, disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable, colágeno, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, alginato de sodio, dextrano soluble en agua, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, caseína, diglicerina, propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, albúmina de suero humano (HSA), manitol, sorbitol, lactosa y tensioactivos permitidos como aditivo farmacéutico. Un aditivo para su uso se selecciona apropiadamente o se combina de los anteriores dependiendo de la forma de dosis, pero no se limita al mismo.

50 Ejemplo de referencia

Preparación de Mab166 recombinante

55 **[0051]** Para ejecutar un experimento comparativo, Mab166 (solicitud de patente japonesa nº 2005-500250 o similares) se preparó como anticuerpo recombinante.

Primero, se extrae ARNm de hibridoma que produce un anticuerpo clasificado en una subclase IgG2a, y regiones constantes de cadena H y cadena L se clonaron por procedimiento de RT-PCR. Cada fragmento amplificado por

PCR se insertó en el sitio NheI-NotI del vector pcDNA3.1 (+) (disponible de Invitrogen Corporation), y adicionalmente se incorporó un sitio de clonación múltiple para permitir que se insertara un fragmento de ADN de parte de la región variable.

- 5 A continuación, después de fraccionar la secuencia de genes de la cadena H y la cadena L de la parte de la región variable de Mab166 en cuatro, se sintetizaron ADN sentido y ADN anti-sentido de éstos y se hibridaron. Los fragmentos después de la hibridación se provocaron para unirse por ADN ligasa, y se hizo clonación en la región MfeI-BIPI para la cadena H y en la región EcoRV-BsiWI para la cadena L.
- 10 Los vectores de la cadena H y la cadena L que tienen secuencias de bases identificadas se introdujeron en células HEK 293T usando Lipofectamine 2000 (disponible de Invitrogen Corporation), y después de 48 horas se recogió un sobrenadante de cultivo celular. Del sobrenadante de células recogido, Mab166 recombinante se purificó por columna de proteína-G (disponible de PIERCE).
- 15 La presente invención se explicará concretamente a modo de los siguientes ejemplos no limitantes. Como técnica de preparación de anticuerpo se usaron los procedimientos descritos en *Immunochemistry in Practice* (Blackwell Scientific Publications), a menos que se especifique de otro modo. Como técnica de manipulación de genes se usaron procedimientos descritos en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory), a menos que se especifique de otro modo.

20

Ejemplo 1

Preparación de antígeno

- 25 **[0052]** Se extrajo ADN de cromosoma de la cepa convencional de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 proporcionada por la Universidad de Tokai, Japón, y el gen que codifica la proteína PcrV (SEQ ID NO: 2) se amplificó por PCR usando el ADN como molde. Un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SphI se proporcionó en el cebador del lado 5' y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII se proporcionó en el cebador del lado de 3' (SEQ ID NOs: 3, 4), y en la inserción en un vector de expresión se hizo un diseño de manera que la cisteína se insertara entre la marca de histidina y el codón de iniciación para el marcado de biotina. El fragmento de PCR amplificado se clonó en el vector pWE30 (disponible de GE Healthcare) en los sitios SphI y HindIII. Después de la secuenciación, el vector se introdujo en JM109 de *E. coli* para obtener *E. coli* recombinante (PcrV-JM109). La PcrV-JM109 se cultivó en 500 ml de medio de cultivo líquido de LB/ampicilina a 37 °C, y cuando la DO600 alcanzó 0,5, se añadió IPTG a 0,75 mM final. Después de cultivar a 37 °C durante 1,5 horas adicionales, las células bacterianas se centrifugaron y se añadieron con 15 ml de tampón A (Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), NaCl 0,5 M, MgCl₂ 2 mM) que contiene 0,5% de lisozima (disponible de Sigma). Después de la incubación a 0 °C durante 30 minutos, las células se sonicaron. Tras la centrifugación se obtuvo una fracción soluble, se sometió a columnas His-Bind (disponibles de Novagen) y luego se eluyó con tampón B (tampón fosfato 20 mM (pH 7,4), NaCl 500 mM) que contiene imidazol 200 mM. La fracción de elución final se dializó contra tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) para sustituir el tampón.

40

Marcado con biotina de antígeno

- 45 **[0053]** La proteína PcrV expresada y purificada como se ha descrito anteriormente se dejó reaccionar en una disolución de mercaptoetilamina de una concentración final de 10 mM a 37 °C durante 150 minutos para reducir el residuo de cisteína. Se añadió biotina activada con PEO-maleimida (disponible de PIERCE) en una cantidad de 20 veces por relación molar con respecto a grupos SH reducidos, y se dejó reaccionar durante la noche a 4 °C, y luego se realizó diálisis para eliminar la biotina sin reaccionar.

50 Inmunización con antígeno

- [0054]** Cada 20 µg de antígeno de PcrV purificado se inmunizaron intraperitonealmente con adyuvante completo de Freund para siete ratones hembra Balb/c de 4 semanas de edad. La inmunización de refuerzo se realizó administrando 20 µg de PcrV con adyuvante incompleto de Freund después de 14 días y 35 días. Además, la inmunización final se realizó después de 77 días por administración intraperitoneal de 20 µg de PcrV y administración en la vena de la cola de 10 µg de PcrV.

55

Preparación de hibridoma

[0055] El bazo se extirpó después de 3 días de la inmunización final, y se recogieron células del bazo. Una célula del bazo y una célula de mieloma de ratón (p3 x 63-Ag8.U1, Tokyo mass research laboratory) se fusionaron usando 50% de polietilenglicol 4000, y se seleccionaron en un medio de cultivo que contenía hipoxantina, aminopterina y timidina.

5

Selección de anticuerpo para PcrV

[0056] Después de 8 días de la fusión de células, las células productoras específicas para anticuerpo se cribaron. El inmunoensayo usado en el cribado fue el siguiente. A cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos (disponible de Nunc) se añadieron 200 µl de tampón Tris (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) que contenía 2 µg de anticuerpo dirigido contra IgG de ratón (disponible de Shibayagi) y se inmovilizaron durante 16 horas a 4 °C. Estos pocillos se lavaron dos veces con 300 µl de disolución de lavado (solución salina que contiene 0,1% de Tween 20), luego se añadieron 300 µl de disolución de bloqueo (Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, 2% de Block Ace (disponible de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.), 10% de sacarosa) y se dejó durante dos horas a temperatura ambiente. Después de lavar cada pocillo dos veces con 300 µl de disolución de lavado, 50 µl de sobrenadante de cultivo de hibridomas se diluyeron con 150 µl de tampón C (tampón Tris 50 mM, pH 7,6 que contiene 0,9% de cloruro sódico, 0,05% de azida de sodio, 0,5% de albúmina de suero bovino, 0,01% de Tween80 y ácido dietilentriamina-N,N,N',N'',N''-pentaacético 25 µM) y se añadieron a cada pocillo, y se dejó reaccionar durante la noche a 4 °C. Después de lavar tres veces con 300 µl de disolución de lavado se añadieron 200 µl de tampón C que contiene 10 ng de estreptavidina marcada con Eu (disponible de PERKIN ELMER) y 25 ng de PcrV marcada con biotina, y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la reacción, lavar tres veces con 300 µl de disolución de lavado y se añadieron 200 µl de reactivo de refuerzo (1,39 g/l de ftalato de potasio, 19,3 mg/l de óxido de tri-n-octilfosfina, 4,59 mg/l de 2-naftoiltrifluoroacetona, 1,0 g/l de Triton-X100, 6,0 g/l de ácido acético) y se midió por fluorescencia resuelta en el tiempo.

25

[0057] Del resultado del cribado se seleccionaron 20 clones de hibridoma que presentaron fuerte afinidad por PcrV recombinante, y la actividad de inhibición de la citotoxicidad por *Pseudomonas aeruginosa* se examinó según el Ejemplo 4. Como resultado, la actividad inhibidora de la citotoxicidad se observó en 10 clones, y estos clones se clonaron entonces dos veces por procedimiento de dilución limitante, y así se seleccionaron células de hibridoma. De los 10 clones obtenidos se seleccionaron 4 clones que presentaron alta actividad de inhibición de la citotoxicidad, y se llamaron 1F3, 2A4, 6F5 y 7A7, respectivamente. Para estos anticuerpos, la subclase de anticuerpo se determinó usando el kit de ELISA de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón (disponible de BD Biosciences), y se encontró que 1F3 era IgG2a, 2A4 era IgG2b, 6F5 era IgG2a, 7A7 era IgG2a.

[0058] Las células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales 1F3 y 2A4 se depositaron en el Instituto nacional de Ciencia y Tecnología avanzada, Depósito del Organismo Internacional de Patentes (Centro nº 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, IBARAGI, JAPÓN) el 18 de octubre de 2007, bajo los números de acceso de FERM BP-11085 y FERM BP-11086, respectivamente.

40 **Ejemplo 2**

Actividad de unión de anticuerpo

[0059] Para medir la actividad de unión de anticuerpos (1F3, 2A4, 6F5, 7A7) se realizó inmunoensayo competitivo. A cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos (disponible de Nunc) se añadieron 100 µl de tampón Tris (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) que contiene 1,5 µg de anticuerpo dirigido contra Fc de ratón (disponible de Jackson ImmunoResearch) y se inmovilizaron durante 16 horas a 4 °C. Estos pocillos se lavaron dos veces con 300 µl de disolución de lavado, luego se añadieron 300 µl de disolución de bloqueo y se dejaron durante dos horas a temperatura ambiente para lograr el bloqueo (placa de fase sólida de anticuerpo dirigido contra IgG de ratón). Después de lavar dos veces con 300 µl de disolución de lavado se añadieron 2 ng/pocillo de cada anticuerpo y PcrV no marcada a cinco concentraciones en series de diluciones de 10 de 500 ng/pocillo. Entonces se añadieron 5 ng/pocillo de PcrV biotinilada y se dejó reaccionar durante la noche. Después de lavar cuatro veces con 300 µl de líquido de lavado y añadir 100 µl/pocillo de reactivo de potenciación (disponible de PerkinElmer), la fluorescencia resuelta en el tiempo se midió después de agitar durante 1 minuto. Como resultado, 1F3, 2A4, 6F5 y 7A7 mostraron actividad de unión más fuerte contra PcrV que Mab166 (Fig. 1).

[0060] A continuación, la afinidad de 1F3, 2A4, 6F5, 7A7 y Mab166 con PcrV se determinó por análisis de resonancia de plasmones superficiales. Se inmovilizó anticuerpo dirigido contra Fc de IgG de ratón sobre un chip de sensor CM5 usando el kit de captura de anticuerpos de ratón (disponible de BIACORE) en el instrumento BIACore

T100. Secuencialmente, cada anticuerpo para PcrV se capturó, y la PcrV recombinante se cargó para determinar el valor de Kd.

[0061] Como resultado, cada clon mostró mayor afinidad que Mab166 como se demuestra de la afinidad de $3,7 \times 10^{-10}$ (M) para 1F3, la afinidad de $3,5 \times 10^{-10}$ (M) para 2A4, la afinidad de $1,1 \times 10^{-10}$ (M) para 6F5 y la afinidad de $1,1 \times 10^{-9}$ (M) para 7A7, a diferencia de la afinidad de $3,0 \times 10^{-9}$ (M) para Mab166 (Fig. 2).

Ejemplo 3

10 Inmunoensayo de sándwich con Mab166

[0062] Con el fin de demostrar que 1F3, 2A4, 6F5 y 7A7 tienen un epítipo diferente del de Mab166, se examinó el inmunoensayo de sándwich entre cada anticuerpo y Mab166.

15 Primero, Mab166 se marcó con biotina. Cien μg de Mab166 y 7,853 μg de NHS-PEO₄-biotina (disponible de PIERCE) se mezclaron en PBS 0,1 M (pH 7,4) y se dejaron reaccionar durante 2 horas sobre hielo. Después, el mAb biotinilado se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño (columna G2000SW (disponible de TOSOH)) para eliminar la biotina sin reaccionar de la disolución de reacción.

20 **[0063]** El inmunoensayo de sándwich se realizó del siguiente modo. A cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos (disponible de Nunc) se añadieron 100 μl de disolución PBS (-), conteniendo cada uno 500 ng de anticuerpo para PcrV (1F3, 2A4, 6F5, 7A7), y se inmovilizaron durante 16 horas a 4 °C. Estos pocillos se lavaron una vez con 300 μl de una disolución de lavado, luego se añadieron 300 μl de disolución de bloqueo y se dejaron durante dos horas a temperatura ambiente para lograr el bloqueo. Después de lavar cada pocillo dos veces
25 con 300 μl de disolución de lavado se añadieron 100 μl de tampón de ensayo (disponible de Wallac) que contiene 50 ng de PcrV y 50 ng de Mab166 marcado con biotina y se dejaron reaccionar durante la noche a 4 °C. Después de lavar tres veces con disolución de lavado se añadieron 100 μl de tampón de ensayo que contiene 50 ng de estreptavidina marcada con Eu (disponible de Wallac) y se dejaron reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con disolución de lavado y añadir 100 μl de reactivo de potenciamiento,
30 agitación durante 1 minuto, y luego se midió la fluorescencia resuelta en el tiempo.

[0064] Como resultado, el inmunoensayo de sándwich fue posible entre cualquiera de 1F3, 2A4, 6F5 y 7A7 y Mab166, de manera que se reveló que los presentes anticuerpos tenían epítopos diferentes de los de Mab166 (Fig. 3).

35 Ejemplo 4

Medición de la actividad de inhibición de la citotoxicidad de anticuerpos para PcrV

40 **[0065]** Se midió la actividad inhibidora de la citotoxicidad para 1F3, 2A4, 6F5 y 7A7. El procedimiento es el siguiente.

Primero, 1F3, 2A4, 6F5, 7A7 se diluyeron en series de diluciones dobles de 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y se dispensaron 10 μl a cada pocillo de microplaca de 96 pocillos. A continuación, la célula de mieloma de ratón P3U1 (de ATCC) se ajustó a 5×10^5 células/ml o célula U937 de la línea de células de leucocitos humanos (de ATCC) se ajustó a 1×10^5 células/ml en un medio de cultivo celular (RPMI1640 que contiene hidrogenocarbonato de sodio, y que no contiene L-glutamina y rojo de fenol (disponible de Sigma)), y cada 100 μl de suspensión de células se añadieron a la microplaca de 96 pocillos. Además, la cepa SR24 de *Pseudomonas aeruginosa* cultivada durante la noche en caldo Mueller Hinton ajustado con cationes (Difco) se ajustó a 1×10^8 ufc/ml en un medio de cultivo celular, y se añadió en una cantidad
50 de 10 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$, y se cultivó durante 3 horas a 37 °C en presencia de 5% de CO₂. Después de agitar durante 3 horas se añadieron cada 10 μl de WST-8 (disponible de Kishida Chemical Co., Ltd.), y se cultivaron a 37 °C en presencia de 5% de CO₂ durante 3 horas para el caso de célula de mieloma P3U1, o durante 1 hora para el caso de célula U937. Después de completarse el cultivo se midió la absorbancia a 450 nm.

55 **[0066]** Como resultado, cuando se usó célula U937 de leucocitos, la actividad inhibidora de la citotoxicidad (CI50) fue 5,3 nM para 1F3, 20,7 nM para 2A4, 12,7 nM para 6F5, y 14,7 nM para 7A7, a diferencia de más de 213 nM para Mab166, y cuando se usó célula de mieloma U3P1, la actividad inhibidora de la citotoxicidad (CI50) fue 4,0 nM para 1F3, 16 nM para 2A4, 7,3 nM para 6F5 y 6,0 nM para 7A7, a diferencia de 54 nM para Mab166. Es decir, 1F3, 2A4, 6F5 y 7A7 tuvieron mayor actividad de inhibición de la citotoxicidad para ambas células que Mab166 que

se había descrito previamente (Frank y col., The Journal of Infectious Diseases, 2002, vol. 186, pág. 66) (Fig. 4 y Fig. 5).

Ejemplo 5

5

Preparación de PcrV truncada

[0067] Se preparó PcrV truncada (136-233) del siguiente modo.

- 10 Un fragmento amplificado por PCR con cebador del lado de 5' GCTCGAGGATCCCAAGGCGCTGACCGC (SEQ ID NO: 5) y cebador del lado de 3' GTTAAGCTTCTCGAAGGGGTACTC (SEQ ID NO: 6) usando pQE30-PcrV que es un plásmido de expresión de la proteína antigénica PcrV como molde se trató con enzimas de restricción BamHI y HindIII, y se insertó en pET32b (disponible de Novagen). Después de la secuenciación, el vector se introdujo en la cepa BL21-DE3 de *E. coli* para obtener *E. coli* recombinante (PcrV truncada-BL21). Esta cepa de expresión se pre-
- 15 cultivó durante un día y noche completo a 37 °C en 2 ml de medio de cultivo líquido de LB/ampicilina. Se añadieron dos ml de líquido de pre-cultivo a 500 ml de medio de cultivo líquido de LB/ampicilina y se cultivó a 37 °C, y cuando la DO600 alcanzó 0,5, el cultivo líquido se mantuvo todavía durante 30 minutos sobre hielo. La IPTG se añadió a una concentración final de 0,75 mM, y se cultivó a 15 °C durante la noche. Las células bacterianas se centrifugaron a 4 °C, x5000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se sacó a otro tubo, y 10 ml de Tampón X (Tris-HCl 25 mM (pH
- 20 7,5), NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM) que contiene 0,1% de lisozima (disponible de Sigma) se añadieron al sedimento y se suspendieron, se dejó todavía sobre hielo durante 1 hora y luego se sonicó bajo enfriamiento sobre hielo. Entonces, una fracción soluble se aplicó a una columna Ni-NTA (Qiagen) y se eluyó con tampón Y (Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, imidazol 200 mM). La fracción eluida se dializó con tampón fosfato 10 mM (pH 7,4).

25 Determinación de la región de epítipo

- [0068]** A cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos (disponible de Nunc) se añadieron 150 µl de tampón Tris (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) que contiene 1,5 µg de anticuerpo dirigido contra Fc de IgG de ratón (disponible de Jackson ImmunoResearch) y se inmovilizaron durante 16 horas a 4 °C. Estos pocillos se lavaron dos
- 30 veces con 300 µl de una disolución de lavado, luego se añadieron 300 µl de disolución de bloqueo y se dejaron durante dos horas a temperatura ambiente para bloquear cada pocillo. Después de lavar cada pocillo una vez con 300 µl de líquido de lavado, a cada pocillo se añadieron 50 µl de disolución de anticuerpo para PcrV diluida a una concentración de 80 ng/ml con tampón C (tampón Tris 50 mM que contiene 0,9% de cloruro sódico, 0,05% de azida de sodio, 0,5% de albúmina de suero bovino, 0,01% de Tween 80 y ácido dietilentiamina-N,N,N',N',N'-pentaacético
- 35 25 µM, pH 7,6), seguido de 50 µl de disolución de estreptavidina marcada con Eu (disponible de PERKIN ELMER) diluida en una concentración de 200 ng/ml con tampón C, 50 µl de proteína PcrV truncada diluida en una concentración dada con tampón de ensayo DELFIA y 50 µl de disolución de PcrV biotinilada diluida a una concentración de 1,0 µg/ml con tampón C y se dejó reaccionar a 4 °C durante la noche. Después de lavar tres veces con 300 µl de disolución de lavado se añadieron 200 µl de un reactivo de potenciación (disponible de PERKIN
- 40 ELMER), y se midió la fluorescencia resuelta en el tiempo (Fig. 6).

- [0069]** Como resultado, los anticuerpos para PcrV 1F3, 2A4, 9D12, 12H9, y Mab166 recombinante, que es un ejemplo de modelo de anticuerpo neutralizante para PcrV como se describe previamente, presentaron reactividad con PcrV de longitud completa (1-294). Por otra parte, mientras que 1F3 y 2A4 mostraron reactividad con PcrV (136-
- 45 233), Mab166, además de 9D12 y 12H9 que carecen de actividad neutralizante, no mostraron reactividad.

- También se realizó análisis de unión por transferencia Western. Proteína PcrV recombinante purificada se aplicó a SDS-PAGE, y luego se transfirió a una membrana de PVDF. La membrana transferida se bloqueó con PBS que contiene 2% de Block Ace (disponible de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) a temperatura ambiente durante 2
- 50 horas bajo agitación. La disolución de anticuerpo para PcrV diluida a 1 µg/ml se añadió a la membrana, se dejó reaccionar durante la noche a 4 °C y luego se lavó con tampón de lavado B (tampón fosfato 10 mM (pH 7,4), 0,05% de Tween 20). Como anticuerpo secundario, disolución de anticuerpo dirigido contra IgG de ratón marcada con HRP (disponible de GE Healthcare) se añadió a la membrana y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después, la membrana se lavó con tampón de lavado B, y la señal se detectó por CCF más sistema de
- 55 detección de transferencia Western (disponible de GE Healthcare) (Fig. 7). Mientras que los anticuerpos de neutralización de PcrV 1F3 y 2A4 reaccionaron con tanto PcrV de longitud completa como PcrV truncada (136-233), Mab166, además de 9D12 y 12H9, solo reaccionaron con PcrV de longitud completa, y no reaccionaron con PcrV truncada (136-233).

[0070] Esto demostró que la región de epítipo de anticuerpos de neutralización para PcrV 1F3 y 2A4 era una región correspondiente a los residuos de aminoácidos 136-233, y Mab166, 9D12 y 12H9 no tuvieron exclusivamente una región de epítipo correspondiente a los residuos de aminoácidos 136-233.

5 Ejemplo 6

Correlación entre región específica de proteína PcrV y concentración de citotoxicidad

[0071] Usando proteína PcrV de longitud completa (SEQ ID NO: 1) y proteína PcrV truncada (que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 136 a 233 en SEQ ID NO: 1), la prueba de supresión de la actividad inhibitoria de la citotoxicidad en 1F3, 2A4 y Mab166 se realizó del siguiente modo.

Primero, 1F3, 2A4 y Mab166 se ajustaron a 1,56-6,25 nM, 6,25-25 nM y 50-200 nM, respectivamente, y 10 µl de estos anticuerpos se añadieron a la placa de 96 pocillos. Para cada intervalo de concentración de prueba, cada 10 µl de proteína PcrV de longitud completa o proteína PcrV truncada en relaciones molares de 30, 10, 3, 1 y 0,3 veces se añadieron a una placa de 96 pocillos, y se mantuvieron todavía durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la célula de mieloma P3U1 se preparó en 5×10^6 células/ml en medio de cultivo celular (RPMI1640 que contiene hidrogenocarbonato de sodio, y que no contiene L-glutamina y rojo de fenol (disponible de Sigma)), y cada 70 µl se añadieron a la microplaca de 96 pocillos. Además, un líquido bacteriano de la cepa SR24 de *Pseudomonas aeruginosa* cultivado durante la noche en caldo Mueller Hinton (Difco) ajustado para tener 1×10^8 ufc/ml se añadió en una cantidad de 10 µl/pocillo, y se cultivó durante 3 horas a 37 °C en presencia de 5% de CO₂. Después de un lapso de 3 horas se añadieron cada 10 µl de WST-8 (disponible de Kishida Chemical Co., Ltd.) y se cultivaron a 37 °C en presencia de 5% de CO₂ durante 3 horas. Después de completarse el cultivo, la absorbancia se midió a una longitud de onda de 450 nm.

[0072] Como resultado, 1F3 y 2A4 presentaron mayor actividad de inhibición de la citotoxicidad que Mab166. Cuando se añadió proteína PcrV de longitud completa, los efectos de la inhibición de anticuerpos anti-PcrV se suprimieron de un modo dependiente de la dosis de PcrV (Fig. 8). Cuando se añadió proteína PcrV truncada (136-233), las actividades de inhibición de 1F3 y 2A4 también se suprimieron de un modo dependiente de la dosis. Por otra parte, la actividad de inhibición de Mab166 no cambió por la adición de PcrV truncada (136-233) (Fig. 9).

[0073] De estos resultados puede considerarse que los anticuerpos que reconocen un epítipo en los residuos de aminoácidos 136-233 (1F3 y 2A4) tienen mayor actividad de inhibición de la citotoxicidad que los anticuerpos que reconocen los diferentes epítopes (por ejemplo, Mab166). En otras palabras, puede llegarse a la conclusión de que la actividad inhibitoria de la citotoxicidad depende de la región del epítipo reconocida por el anticuerpo para PcrV, y el anticuerpo que reacciona con la región 136-233 de proteína PcrV tiene una fuerte actividad neutralizante.

Ejemplo 7

Análisis de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo para PcrV (1F3 y 2A4)

[0074] De las células de hibridoma establecidas se extrajo ARN usando el kit RNeasy Mini (disponible de QIAGEN). De 1 µg de ARN extraído, el fragmento de ADN se amplificó usando 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Versión 2.0 (disponible de Invitrogen). En este momento, los cebadores usados para la síntesis de ADNc fueron TAGAGTCACCGAGGAGCCAGTTGT (SEQ ID NO: 7) para 1F3 y TCCAGAGTTCCAAGTCACAGTCAC (SEQ ID NO: 8) para 2A4. Los cebadores usados en el procedimiento 5'RACE fueron AGGGGCCAGTGGATAGACCGATGGGGCTGT (SEQ ID NO: 9) para 1F3 y AGGGGCCAGTGGATAGACTGATGGGGGTGT (SEQ ID NO: 10) para 2A4. Los fragmentos amplificados se clonaron por el kit de clonación TOPO TA (disponible de Invitrogen) y se secuenciaron por el analizador genético 3130 de Applied Biosystems (disponible de Applied Biosystems). El resultado analítico se muestra en la Fig. 10 para 1F3 y en Fig. 11 para 2A4.

Aplicabilidad industrial

[0075] El anticuerpo monoclonal de la presente invención o una parte del mismo no solo tenía alta afinidad por PcrV, sino que también presentó una fuerte actividad inhibitoria de la citotoxicidad para célula eucariota de *Pseudomonas aeruginosa*. Por tanto, la composición farmacéutica que contiene el anticuerpo monoclonal o una parte del mismo es útil como fármaco terapéutico para infección relacionada con *Pseudomonas aeruginosa* que actualmente se considera que es difícil de tratar en el campo médico.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0076]

- 5
<110> SHIONOGI&CO., LTD.
<120> Anticuerpos para PcrV
- 10 <130> 08P00114
<160> 26
<170> PatentIn versión 3.1
- 15
<210> 1
<211> 294
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa
- 20
<400> 1

ES 2 426 093 T3

Met Glu Val Arg Asn Leu Asn Ala Ala Arg Glu Leu Phe Leu Asp Glu
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ser Ala Glu Gln Glu Glu Leu
 20 25 30

Leu Ala Leu Leu Arg Ser Glu Arg Ile Val Leu Ala His Ala Gly Gln
 35 40 45

Pro Leu Ser Glu Ala Gln Val Leu Lys Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ala
 50 55 60

Ala Asn Pro Ser Ala Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Val Leu Arg Glu
 65 70 75 80

Val Leu Gln Ala Arg Arg Gln Pro Gly Ala Gln Trp Asp Leu Arg Glu
 85 90 95

Phe Leu Val Ser Ala Tyr Phe Ser Leu His Gly Arg Leu Asp Glu Asp
 100 105 110

Val Ile Gly Val Tyr Lys Asp Val Leu Gln Thr Gln Asp Gly Lys Arg
 115 120 125

Lys Ala Leu Leu Asp Glu Leu Lys Ala Leu Thr Ala Glu Leu Lys Val
 130 135 140

Tyr Ser Val Ile Gln Ser Gln Ile Asn Ala Ala Leu Ser Ala Lys Gln
 145 150 155 160

Gly Ile Arg Ile Asp Ala Gly Gly Ile Asp Leu Val Asp Pro Thr Leu
 165 170 175

Tyr Gly Tyr Ala Val Gly Asp Pro Arg Trp Lys Asp Ser Pro Glu Tyr
 180 185 190

Ala Leu Leu Ser Asn Leu Asp Thr Phe Ser Gly Lys Leu Ser Ile Lys
 195 200 205

Asp Phe Leu Ser Gly Ser Pro Lys Gln Ser Gly Glu Leu Lys Gly Leu
 210 215 220

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

Ala Thr Thr Val Ser Asp Arg Ser Arg Pro Leu Asn Asp Lys Val Asn
 245 250 255

Glu Lys Thr Thr Leu Leu Asn Asp Thr Ser Ser Arg Tyr Asn Ser Ala
 260 265 270

Val Glu Ala Leu Asn Arg Phe Ile Gln Lys Tyr Asp Ser Val Leu Arg
 275 280 285

Asp Ile Leu Ser Ala Ile
 290

- <210> 2
- <211> 885
- 5 <212> ADN
- <213> Pseudomonas aeruginosa
- <400> 2

ES 2 426 093 T3

atggaagtca gaaaccttaa tgccgctcgc gagctgttcc tggacgagct cctggccgcg 60
 tcggcggcgc ctgccagtgc cgagcaggag gaactgctgg ccctggtgcg cagcgagcgg 120
 atcgtgctgg cccacgccgg ccagccgctg agcgaggcgc aagtgctcaa ggcgctcgcc 180
 tggttgctcg cggccaatcc gtccgcgctt cgggggcagg gcctcgaggt actccgcgaa 240
 gtctctgcagg cacgtcggca gcccggtgcg cagtgggata tgcgcgagtt cctggtgctg 300
 gcctatttca gcctgcacgg gcgtctcgac gaggatgtca tcgggtgctta caaggatgtc 360
 ctgcagacc caggacggcaa gcgcaaggcg ctgctcgacg agctcaaggc gctgaccgcg 420
 gaggttgaagg tctacagcgt gatccagtcg cagatcaacg ccgcgctgct gcccaagcag 480
 ggcacagga tcgacgctgg cggtatcgat ctggtcgacc ccacgctata tggctatgcc 540
 gtcggcgatc ccaggtggaa ggacagcccc gagtatgcgc tgcctgagcaa tctggatacc 600
 ttcagcggca agctgctgat caaggatttt ctacagcggct cggcgaagca gagcggggag 660

 ctcaagggcc tcagcgtgga gtacccttc gagaaggaca acaaccggg cggcaatttc 720
 gccaccagc tgagcgaccg ctgcgctccg ctgaacgaca aggtcaacga gaagaccacc 780
 ctgctcaacg acaccagctc ccgctacaac tcggcggctg aggcgctcaa ccgcttcac 840
 cagaaatag acagcgtcct gcgcgacatt ctacagcgcga tctag 885

5 <210> 3
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> cebador

10 <400> 3

attgcatgca tggagtcag aaacctaat gcc 33

<210> 4

15 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

20 <223> cebador

<400> 4

tatttgaag atctagcgcg actcttacag cgc 33

25

<210> 5
 <211> 27

<212> ADN
<213> Artificial

<220>

5 <223> cebador

<400> 5

gctcgaggat cccaaggcgc tgaccgc 27

10

<210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

15

<220>
<223> cebador

<400> 6

20

gttaagcttc tcgaaggga ctc 23

<210> 7
<211> 24

25

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

30

<400> 7

tagagtcacc gaggagccag ttgt 24

35

<210> 8
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

40

<220>
<223> cebador

<400> 8

45

tccagagttc caagtcacag tcac 24

<210> 9
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

50

<220>
<223> cebador

55

<400> 9

aggggccagt ggatagaccg atggggctgt 30

<210> 10

<211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> cebador
 <400> 10

10 aggggccagt ggatagactg atgggggtgt 30

<210> 11
 <211> 121
 <212> PRT
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> VH del anticuerpo 1F3

20 <400> 11

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

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

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Asn Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Leu Tyr Gly Asn Tyr Val Val Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

25 <210> 12
 <211> 109
 <212> PRT

ES 2 426 093 T3

<213> Artificial

<220>

<223> VL del anticuerpo 1F3

5

<400> 12

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Thr Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Ile Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Arg Asn Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

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

10 <210> 13

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> VH del anticuerpo 2A4

<400> 13

ES 2 426 093 T3

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ala Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Ser Cys
 85 90 95

Ala Gly Ser Arg Asn Tyr Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 14
 <211> 110
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VL del anticuerpo 2A4
 10
 <400> 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Asn Tyr Lys Ala Ser Gln Tyr Val Gly Thr Thr
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly His Ser Pro Lys Leu Leu Ile

ES 2 426 093 T3

Tyr Arg Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Cys Ser Ser Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 15

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena pesada de 1F3

10

<400> 15

Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
 1 5

15 <210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> CDR2 de la cadena pesada de 1F3

<400> 16

Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Asn Thr
 25 1 5 10 15

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena pesada de 1F3

35 <400> 17

ES 2 426 093 T3

Tyr Gly Asn Tyr Val Val Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 18
<211> 10
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR1 de la cadena ligera de 1F3
10 <400> 18

Ser Ala Ser Thr Ser Val Ser Tyr Met Glu
1 5 10

<210> 19
15 <211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> CDR2 de la cadena ligera de 1F3

<400> 19

Thr Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

25
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
30
<220>
<223> CDR3 de la cadena ligera de 1F3

<400> 20
35

His Gln Trp Arg Asn Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 21
<211> 9
40 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR1 de la cadena pesada de 2A4
45
<400> 21

Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

- <210> 22
- <211> 16
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> CDR2 de la cadena pesada de 2A4
- 10
- <400> 22

Tyr Ile Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

- 15 <210> 23
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 20 <220>
- <223> CDR3 de la cadena pesada de 2A4

- <400> 23

Ser Arg Asn Tyr Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

- 25
- <210> 24
- <211> 11
- <212> PRT
- 30 <213> Artificial

- <220>
- <223> CDR1 de la cadena ligera de 2A4

- 35 <400> 24

Lys Ala Ser Gln Tyr Val Gly Thr Thr Val Ala
1 5 10

- <210> 25
- 40 <211> 7
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 45 <223> CDR2 de la cadena ligera de 2A4

- <400> 25

Arg Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 26
5 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> CDR3 de la cadena ligera de 2A4

<400> 26

Gln Gln Tyr Cys Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal, o una parte de un anticuerpo monoclonal, contra PcrV que tiene
- 5 1) en la región variable de la cadena pesada, regiones determinantes de la complementariedad que incluyen las siguientes secuencias de aminoácidos: SETSYWMH (SEQ ID NO: 15) para CDR1, INPSNGRTNYNEKFNT (SEQ ID NO: 16) para CDR2 y YGNYVVYYTMDY (SEQ ID NO: 17) para CDR3 y
- 2) en la región variable de la cadena ligera, regiones determinantes de la complementariedad que incluyen las
- 10 siguientes secuencias de aminoácidos: SASTSVSYME (SEQ ID NO: 18) para CDR1; TTSKLA (SEQ ID NO: 19) para CDR2 y HQWRNYPFT (SEQ ID NO: 20) para CDR3.
2. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o la parte del anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, como principio activo.
- 15 3. El anticuerpo monoclonal o la parte del anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, para su uso en un procedimiento de tratamiento médico.
4. El anticuerpo monoclonal o la parte del anticuerpo monoclonal para su uso en un procedimiento de
- 20 tratamiento médico según la reivindicación 3, en el que el tratamiento médico es tratar infección.
5. El anticuerpo monoclonal o la parte del anticuerpo monoclonal para su uso según la reivindicación 4, en el que la infección es infección de las vías respiratorias.
- 25 6. El anticuerpo monoclonal o la parte del anticuerpo monoclonal para su uso según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la infección está asociada a fibrosis quística.
7. Uso del anticuerpo monoclonal o la parte del anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para tratar infección.
- 30 8. Uso según la reivindicación 7, en el que la infección es infección de las vías respiratorias.
9. Uso según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que la infección está asociada a fibrosis quística.
- 35

Figura 1

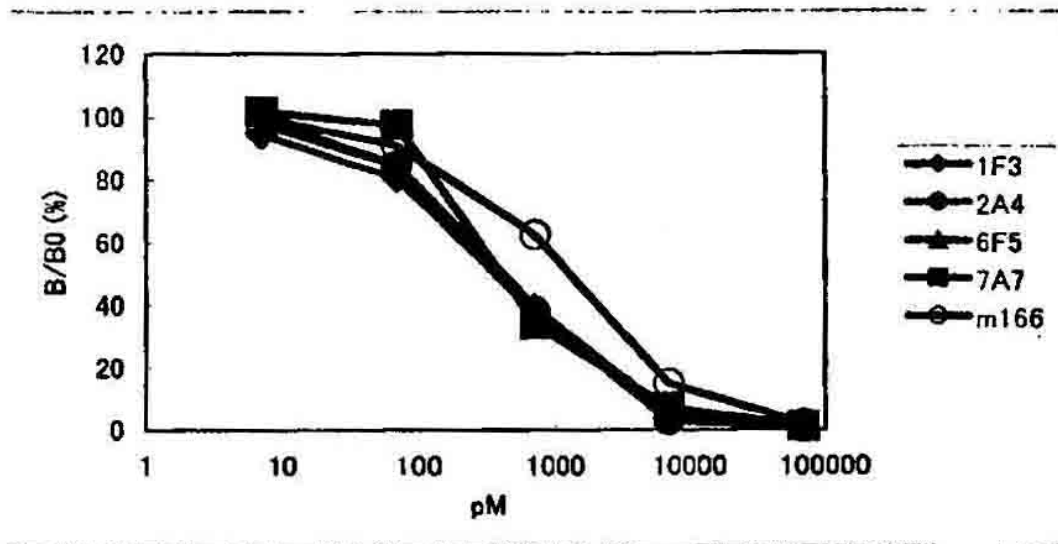


Figura 2

Clon	K d (M)
m 1 6 6	3.0×10^{-9}
1 F 3	3.7×10^{-10}
2 A 4	3.5×10^{-10}
6 F 5	1.1×10^{-10}
7 A 7	1.1×10^{-9}

Figura 3

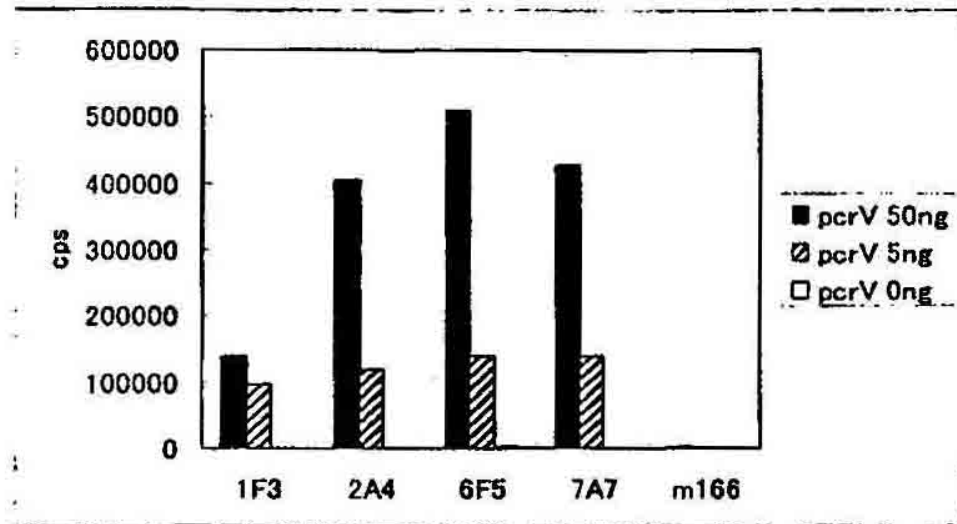


Figura 4

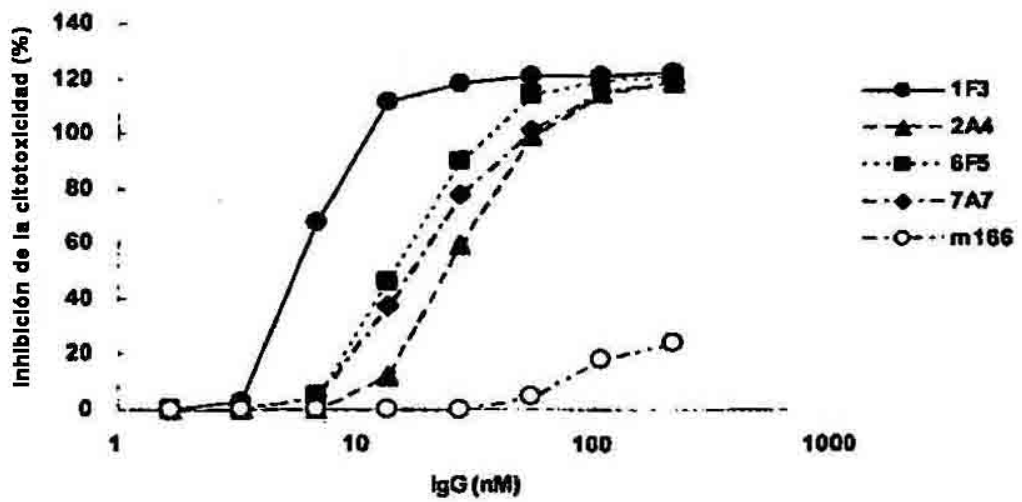


Figura 5

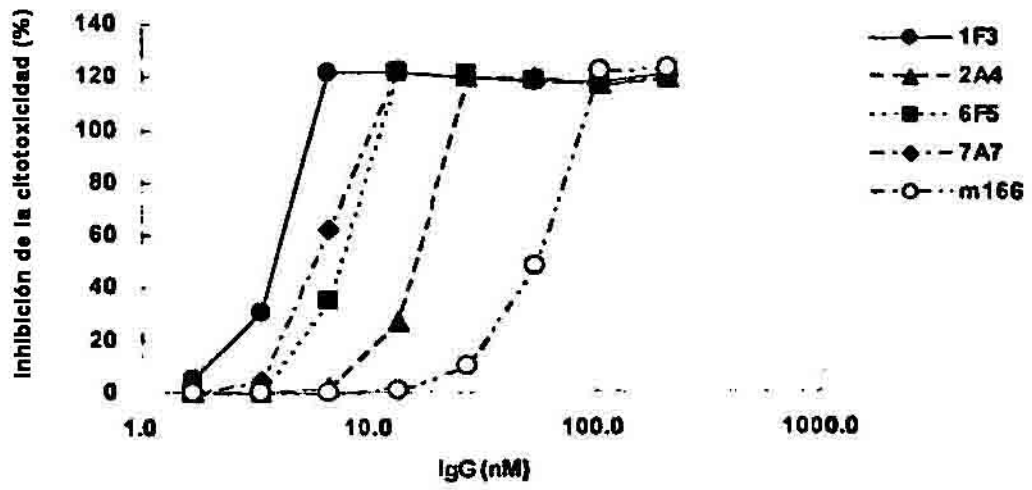


Figura 6

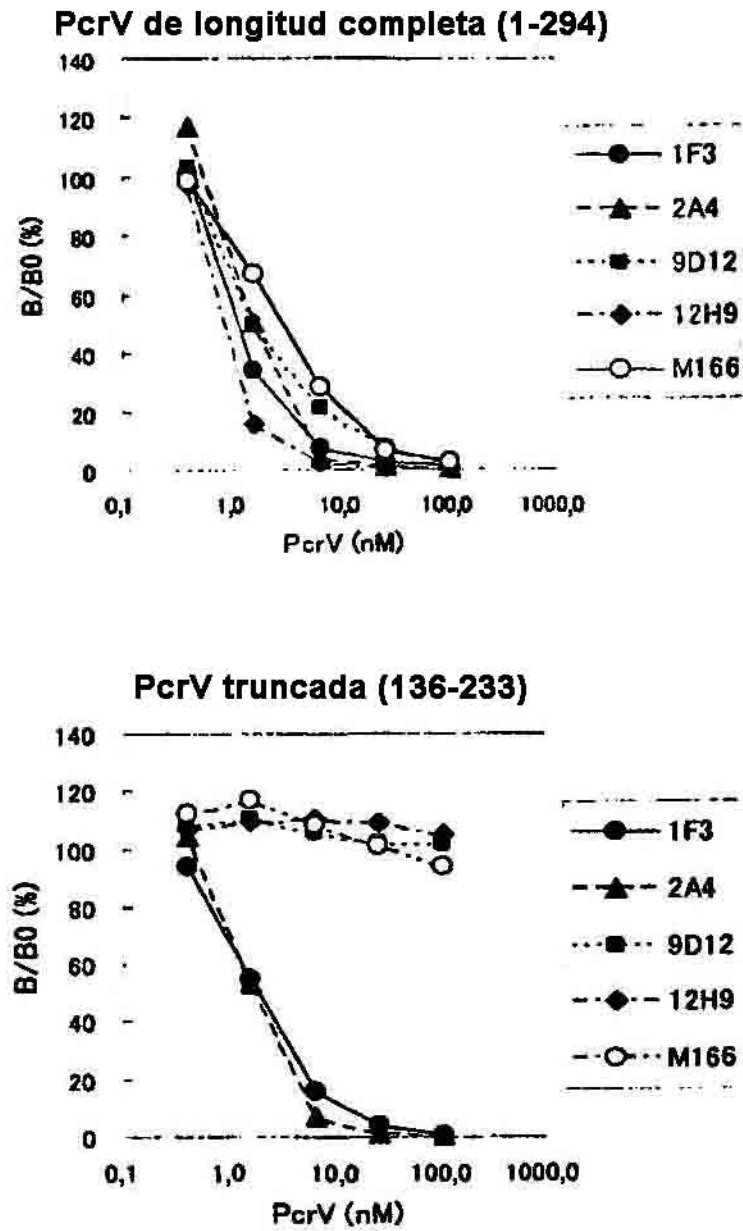
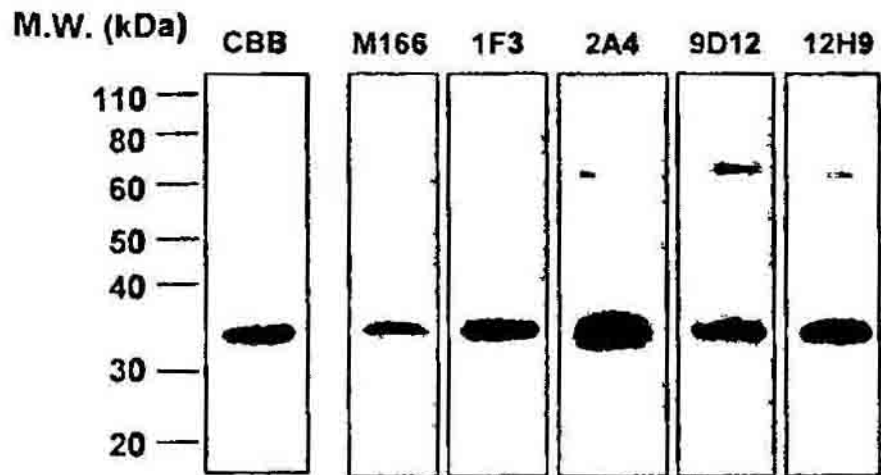


Figura 7

PcrV de longitud completa (1-294)



PcrV truncada (136-233)

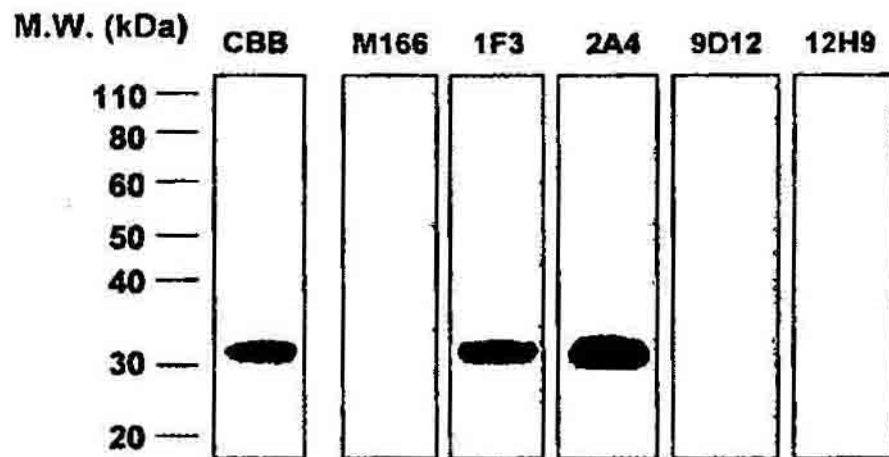
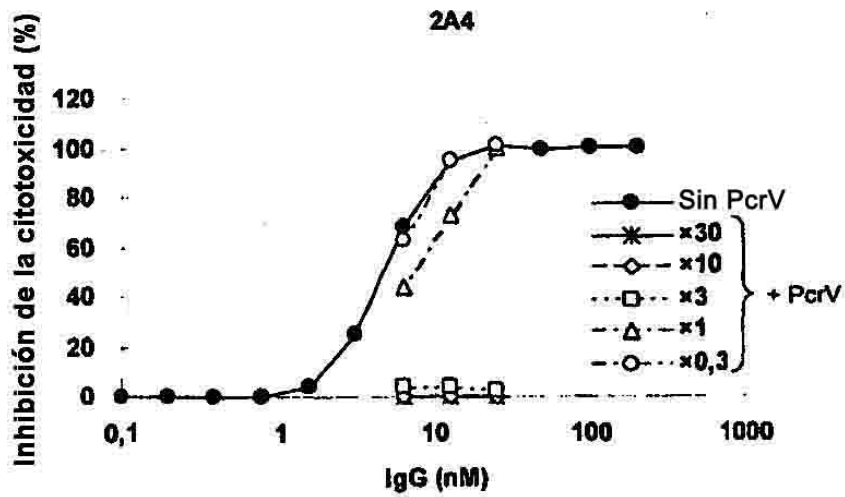
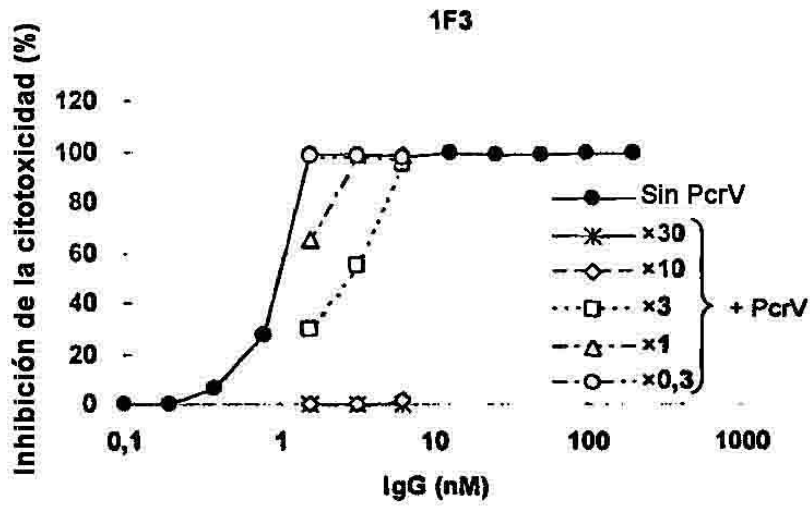


Figura 8

Supresión de la actividad neutralizante con PcrV de longitud completa



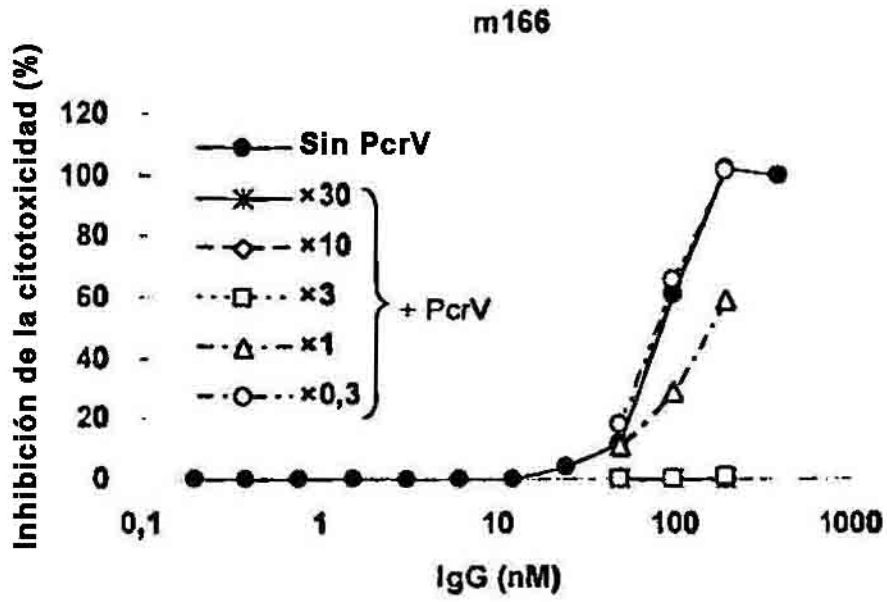
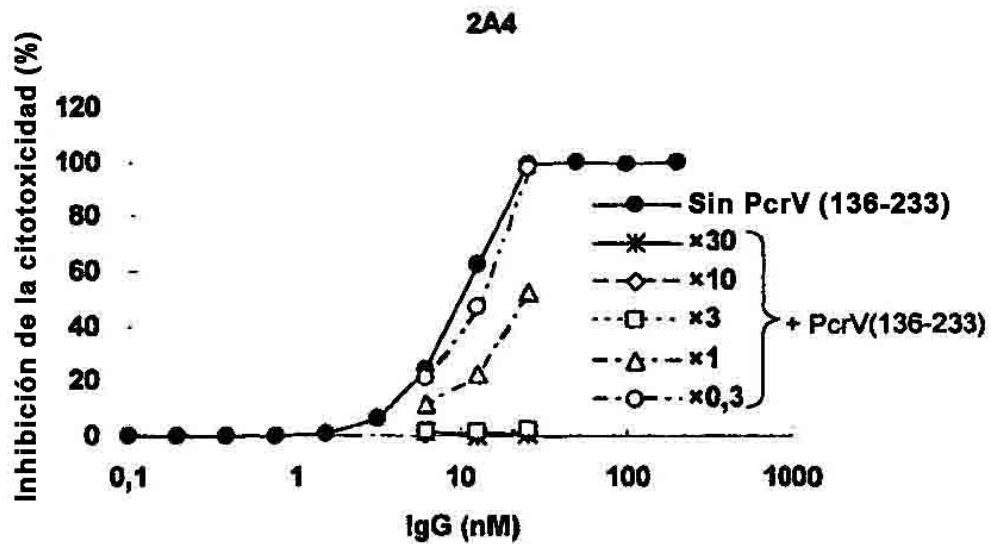
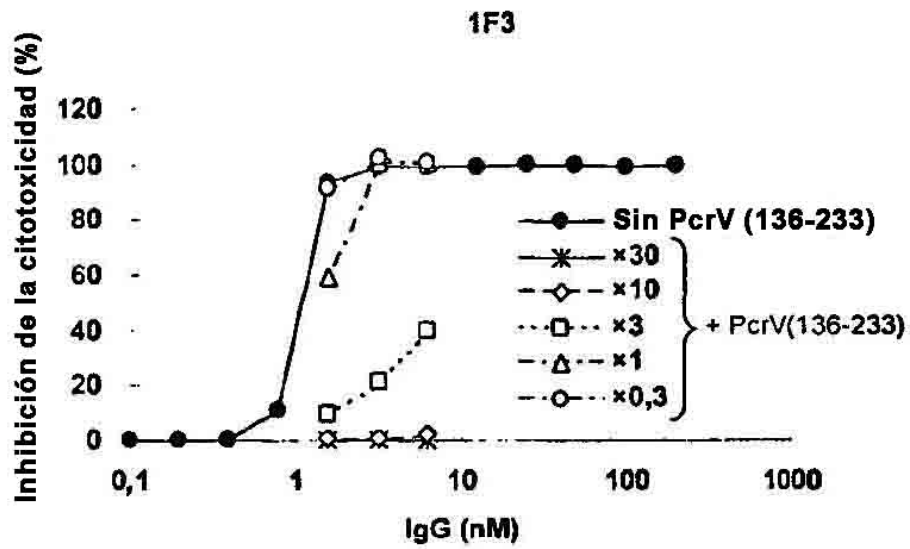


Figura 9

Supresión de la actividad neutralizante con PcrV truncada



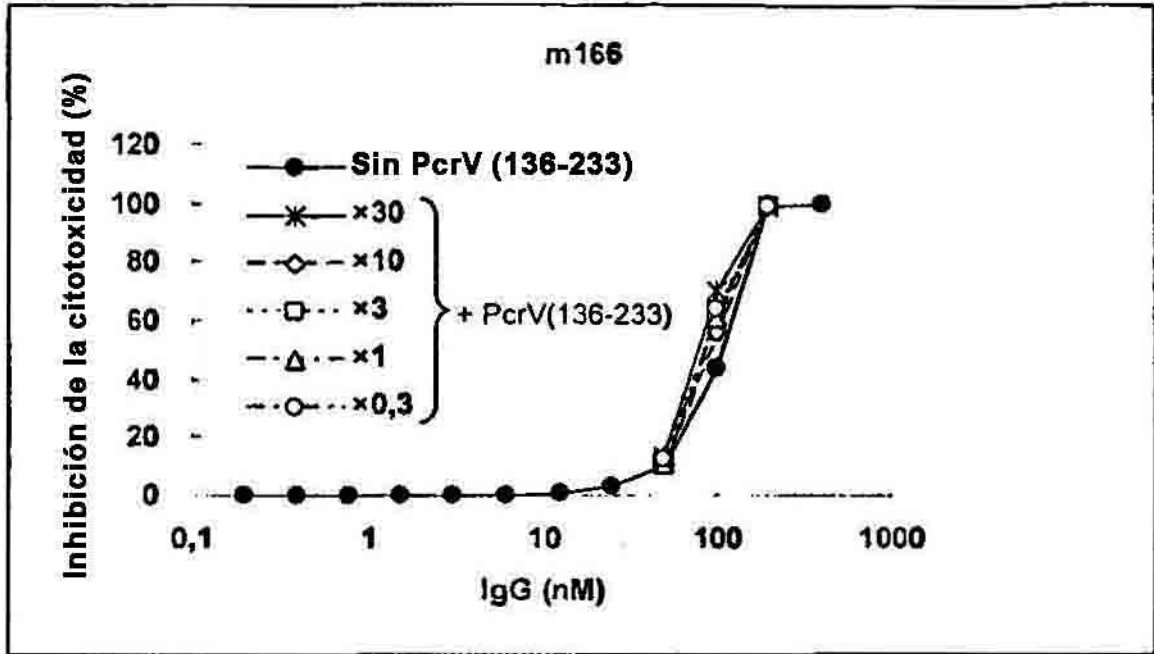


Figura 10

(SEQ ID NO: 11, 12)

Cadena pesada

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYSFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPSN
GRTNYNEKFNKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCVLYGNYVYYTMDYW
GQGTSVTVSS

Cadena ligera

QIVLTQSPTIMSASLGEEITLTCSASTSVSYMEWYQQKSGTSPKILYTTSKLASGVPS
RFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYCHQWRNYPFTFGSGTKLEIKRAD

Figura 11

(SEQ ID NO: 13, 14)

Cadena pesada

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWIMGYTTYNG
DTSYNPSLKSRIARDTSKNQFFLQLNSVTFEDTATYSCAGSRNYYGAWFAYWGQG
TLVTVSA

Cadena ligera

DIVMTQSHKFMSTSIGDRVSINYKASQYVGTVAWYQQKSGHSPKLLIYRASTRHTG
VPDRFTGSGSGTDFTLNISNVQSEDLADYFCQQYCSSPLTFGAGTYLEVKRAD