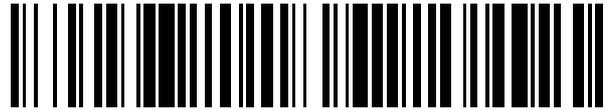


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 738**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 31/18** (2006.01)

**C12N 15/49** (2006.01)

**C07K 16/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2004 E 04712210 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 1595959**

54 Título: **Método para potenciar la eficacia de una preparación de un anticuerpo monoclonal**

30 Prioridad:

**20.02.2003 JP 2003042819**

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

**12.02.2015**

73 Titular/es:

**THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH  
INSTITUTE (100.0%)  
1-6-1 Okubo, Kita-ku, Kumamoto-shi  
Kumamoto 860-8568, JP**

72 Inventor/es:

**MURAKAMI, TOSHIO;  
HIGUCHI, HIROFUMI;  
MAKIZUMI, KEIICHI;  
MAEDA, TOSHIHIRO y  
MIZOKAMI, HIROSHI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 528 738 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

Método para potenciar la eficacia de una preparación de un anticuerpo monoclonal

### 5 Campo técnico

La presente invención pertenece al campo técnico de los medicamentos. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para potenciar la eficacia de una preparación de un anticuerpo monoclonal tal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas, llevándose a cabo dicho método para seleccionar pacientes que posean un antígeno reconocido por dicho anticuerpo monoclonal.

### Técnica anterior

En los últimos años, para la aplicación clínica de un anticuerpo monoclonal se ha desarrollado una terapia con administración de una preparación de un anticuerpo monoclonal. Una preparación de un anticuerpo monoclonal puede usarse con eficacia a través de la interacción entre un anticuerpo monoclonal y un antígeno que se produce en el cuerpo vivo. Por tanto, la eficacia de una preparación de anticuerpo monoclonal se puede potenciar si anteriormente se ha analizado un nivel de expresión de dicho antígeno para seleccionar sujetos a los que se va a aplicar dicha preparación. Un anticuerpo monoclonal puede ser ventajoso desde el punto de vista de la seguridad y la eficacia debido a su especificidad extremadamente alta. No obstante, en caso de que se produzca diversidad en una secuencia de aminoácidos de una región de epítipo antigénico, un anticuerpo monoclonal será menos reactiva con un antígeno y, por tanto, su eficacia se puede deteriorar. Por tanto, para el uso de una preparación de anticuerpo monoclonal como medicamento, será un medio útil para potenciar la eficacia de dicha preparación de anticuerpo monoclonal no solo para analizar previamente un nivel de expresión de un antígeno dentro del cuerpo humano sino también para confirmar la diversidad de un antígeno y seleccionar sujetos para la administración.

Entre las preparaciones de anticuerpo monoclonal donde los sujetos a los que se van a administrar se analizan y seleccionan está el anticuerpo monoclonal antiHER2 (trastuzumab) ahora disponible comercialmente. El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal contra la proteína HER2 que se sobreexpresa en aproximadamente el 20 al 30 % de los pacientes de cáncer de mama. Para el análisis clínico para seleccionar los sujetos a los que se va a administrar el anticuerpo monoclonal anti-HER2 se han intentado las técnicas de transferencia de tipo Southern o hibridación fluorescente *in vitro* (FISH) para la amplificación del ADN del gen HER2/neu; las técnicas de transferencia de tipo Northern o reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para detectar sobreexpresión del ARNm de HER2, o las técnicas de transferencia de tipo Western, ELISA o inmunohistoquímica para detectar sobreexpresión de la proteína HER2. Con estas pruebas, la eficacia de trastuzumab se ha potenciado en los casos de sobreexpresión de HER2, lo que sugiere que en la terapia con una preparación de anticuerpo monoclonal seleccionando sujetos previamente a los que se va a administrar dicha preparación es útil para potenciar la eficacia de la preparación del anticuerpo monoclonal (p. ej., Nippon Rinsho, Vol. 60, No. 3 (2002)).

### Divulgación de la invención

#### (Problemas técnicos que ha de resolver la invención)

Por otro lado, en el caso donde se produce diversidad en una secuencia de aminoácidos de una región de epítipo para alterar de este modo la afinidad de la reacción antígeno-anticuerpo, se estima que la eficacia de una preparación de anticuerpo disminuye como consecuencia de la diversidad antigénica, cuya predicción es de gran importancia desde el punto de vista clínico. Para este fin, el análisis de un nivel de expresión de una proteína antigénica sola como en trastuzumab es insuficiente y será necesario un método de prueba recién establecido. Esto es porque, incluso cuando un determinado antígeno se expresa mucho como una proteína y es detectable cuantitativamente, dicho antígeno se puede evaluar como inadecuado si exhibe diversidad en una secuencia de aminoácidos de un epítipo de tipo salvaje reconocido por un anticuerpo monoclonal y hay multiplicidad de variantes antigénicas con menor reactividad con dicho anticuerpo monoclonal. De acuerdo con lo anterior, cuando existe diversidad en una secuencia de aminoácidos de un epítipo de un antígeno determinado, una extensión de reactividad de un anticuerpo a cada uno de los epítopos con diferentes secuencias de aminoácidos tiene que confirmarse directamente a través de una reacción de antígeno-anticuerpo. No obstante, con el fin de distinguir moléculas antigénicas con diferentes secuencias de aminoácidos de una región de epítipo entre sí entre antígenos que pueden producirse en cantidades extremadamente pequeñas y capturar y detectar dichas moléculas con un anticuerpo, será necesaria una sensibilidad más alta. También es difícil detectar de forma distinguible un nivel de expresión de un antígeno por un lado y la reactividad de un anticuerpo por otro lado.

Desde los puntos de vista mencionados anteriormente, para una preparación de anticuerpo monoclonal donde un antígeno al cual está dirigido un anticuerpo monoclonal es una proteína con diversidad en la secuencia de aminoácidos de un epítipo reconocido por dicho anticuerpo monoclonal, se desea desarrollar un método de prueba con una elevada sensibilidad y rapidez para la selección de sujetos a los que se va a administrar dicha preparación.

**(Medios para resolver los problemas)**

La presente invención se refiere a un método para potenciar la eficacia de una preparación de anticuerpo monoclonal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con la presente invención dicho método comprende las etapas: (1) deducir una secuencia de aminoácidos de una proteína expresada en pacientes de una secuencia de nucleótidos de un gen de una molécula diana determinada mediante aislamiento y análisis de dicho gen en la biopsia de pacientes; (2) evaluar la idoneidad de los pacientes para la administración de dicha preparación de anticuerpo monoclonal comparando la secuencia de aminoácidos deducida en la etapa (1) con una secuencia de aminoácidos que es reconocible por dicho anticuerpo monoclonal como ya se ha determinado anteriormente (en lo sucesivo denominado "secuencia de referencia"); y (3) seleccionar pacientes a los que administrar dicha preparación de anticuerpo monoclonal con su eficacia prevista basada en la idoneidad evaluada en la etapa (2).

La diversidad en una secuencia de aminoácidos de un epítipo antigénico reconocido por una preparación de anticuerpo monoclonal puede alterar la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno. En el caso de un antígeno que exhibe un polimorfismo genético en una región epítipo, los presentes inventores tenían la visión de que, en lugar de una medición directa de la unión de un anticuerpo monoclonal a través de detección inmunoquímica, la diversidad de un antígeno expresado en pacientes se puede analizar en base al análisis de su secuencia de nucleótidos para predecir de este modo la unión entre dicho antígeno y dicho anticuerpo. Por tanto, para un anticuerpo monoclonal donde se encontró una correlación entre una secuencia de aminoácidos de un epítipo y la reactividad de antígeno/anticuerpo se recogieron datos de dicha correlación. Los datos obtenidos de este modo se compararon después con una secuencia de nucleótidos de una región epítipo de un antígeno de pacientes para permitir una selección eficiente de pacientes a los que se va a administrar una preparación de anticuerpo monoclonal para completar un método de acuerdo con la presente invención.

Con el progreso de la PCR y las técnicas de análisis de la secuencia de nucleótidos, el método de acuerdo con la presente invención se puede realizar con una sensibilidad elevada en un uso amplio y permite el análisis directo sin clonar los ADN entre los cuales están presentes sus variantes. Por tanto, de acuerdo con la presente invención, la predicción de la eficacia de una preparación de anticuerpo monoclonal se hace ahora posible simplemente determinando una secuencia de nucleótidos que codifica una región de epítipo de un antígeno de una proteína expresada sin la necesidad de medir realmente la afinidad de unión entre dicho antígeno y dicho anticuerpo monoclonal.

**(Efectos más eficaces que la técnica anterior)**

De acuerdo con la presente invención se proporciona un método para potenciar la eficacia global de una preparación de anticuerpo monoclonal como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas sin medir realmente la afinidad de unión entre un antígeno de una proteína diana expresada y dicho anticuerpo monoclonal mediante aislamiento y purificación de dicho antígeno, seleccionando pacientes a los que administrar dicha preparación de anticuerpo monoclonal analizando previamente una secuencia de nucleótidos que codifica una región epítipo de dicho antígeno y comparando dicha secuencia con una secuencia de aminoácidos reconocible por dicho anticuerpo monoclonal como se ha determinado previamente ("secuencia de referencia") para evaluar de este modo la idoneidad de los pacientes para la administración de dicha preparación de anticuerpo monoclonal.

**Breve descripción de las figuras**

La Fig. 1 es un gráfico que muestra la unión de KD-247 y cada uno de los péptidos sintéticos, donde los residuos de aminoácidos se eliminan secuencialmente uno a uno del péptido sintético "IHIGPGRAFY", que es la región PND de la cepa de laboratorio del VIH-1 (cepa MN) que se ha demostrado que es neutralizada por KD-247, para la investigación de un sitio reconocido por el anticuerpo monoclonal.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra la unión de KD-247 y cada uno de los péptidos sintéticos, donde cada uno de los residuos de aminoácidos del "I" en N-terminal al "Y" en C-terminal en el péptido sintético "IHIGPGRAFY", que es la región PND de la cepa de laboratorio del VIH-1 (cepa MN) que se ha demostrado que es neutralizada por KD-247, se sustituyó por los otros 19 residuos de aminoácidos de origen natural como se muestra en la Fig. 2a a Fig. 2j, respectivamente, para la investigación de la versatilidad de la secuencia de aminoácidos reconocida por el anticuerpo monoclonal. En la Fig. 2a a Fig. 2j, la barra con una línea inclinada indica ausencia de alteración del residuo de aminoácidos original.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la unión de KD-427 a una secuencia de aminoácidos en la porción media de la región V3 de una proteína expresada a partir de una región V3 del gen del VIH-1 amplificada de los pacientes, para investigación de la secuencia de aminoácidos reconocida por el anticuerpo monoclonal con la proteína expresada, donde la unión se presenta como la actividad de unión relativa a la unión de una proteína expresada del gen de la cepa MN (100 %). Las líneas horizontales indican los valores medios para cada una de las secuencias de aminoácidos. En la Fig. 3, "1" a "33" son proteínas expresadas que tienen las siguientes secuencias en la porción central de la región V3: 1: IAPGRAF; 2: IAPGRAL; 3: IAPGSAF; 4: IGLGRAF; 5: IGPAPAF; 6: IGPAGAF; 7: IGPAGAF; 8: IGPAGAF; 9: IGPAGRAI; 10: IGPAGRAL; 11: IGPAGRAS; 12: IGPAGRAV;

13: IGPGRAW; 14: IGPGRAY; 15: IGPGRPF; 16: IGPGRRF; 17: IGPGRSF; 18: IGPGRSV; 19: IGPGRTF; 20: IGPGRTL; 21: IGPGRTV; 22: IGPGRVF; 23: IGPGRVY; 24: IGPGSAF; 25: IGSGRAF; 26: LGPGGAF; 27: LGPGRAF; 28: MGPGGAF; 29: MGPGKAF; 30: MGPGRAF; 31: MGPGRVY; 32: VGPGRAL; 33: VGPGRAV.

## 5 Mejor modo para realizar la invención

De acuerdo con el método de la presente invención como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas, para evaluar la idoneidad de los pacientes para la administración de una preparación de anticuerpo monoclonal y seleccionar a los pacientes a los que administrar dicha preparación de anticuerpo monoclonal con su eficacia prevista, es indispensable comparar una secuencia de aminoácidos de una molécula diana de pacientes con una "secuencia de referencia" determinada previamente. La expresión "secuencia de referencia" como se usa en el presente documento hace referencia a una secuencia de aminoácidos de una región epítipo de un antígeno cuya secuencia de aminoácidos puede reconocer y unirse a ella un anticuerpo monoclonal como ingrediente activo de una preparación de anticuerpo monoclonal a administrar. Después de determinar dicha secuencia de aminoácidos de una región epítipo como "secuencia de referencia", se puede investigar la correlación entre eficacia (p. ej., actividad neutralizante) de dicho anticuerpo monoclonal y "secuencia de referencia" En el caso de que se vea la diversidad en una secuencia de aminoácidos de una región epítipo, por ejemplo el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1), una secuencia universal compartida habitualmente entre diversas secuencias de aminoácidos de dicha región de epítipo se determina como "secuencia de referencia".

Como tal, determinando previamente una secuencia de aminoácidos de una región de epítipo reconocida y unida por un anticuerpo monoclonal como ingrediente activo de una preparación de anticuerpo monoclonal y determinando una secuencia de aminoácidos a la que dicho anticuerpo monoclonal puede manifestar su eficacia como "secuencia de referencia", la evaluación de la idoneidad de los pacientes para la administración de dicha preparación de anticuerpo monoclonal se hace posible a través de la comparación con dicha "secuencia de referencia".

Para la finalidad de la presente invención tienen que realizarse anteriormente (1) el análisis de una secuencia de aminoácidos ("secuencia de referencia") de una región epítipo reconocida por un anticuerpo monoclonal; (2) el análisis de una secuencia de nucleótidos que codifica una región que abarca una región no epítipo de una molécula diana presente en una biopsia de pacientes; y (3) la adquisición de datos concernientes a la correlación entre diversidad en una secuencia de aminoácidos de una proteína antigénica y una potencia de un anticuerpo monoclonal.

Específicamente, la presente invención se puede realizar en los procesos siguientes. Para un antígeno típico reconocido por un anticuerpo monoclonal de interés, se investiga la unión de dicho anticuerpo monoclonal a fragmentos peptídicos de una proteína para identificar una región epítipo de dicho antígeno. Los fragmentos peptídicos se pueden preparar mediante digestión de una proteína antigénica con una enzima proteolítica o síntesis química de los fragmentos peptídicos en base a la información de la secuencia de aminoácidos conocida. El análisis de la reactividad de dichos fragmentos peptídicos y un anticuerpo monoclonal incluye un método inmunoquímico tal como ELISA y transferencia puntual, así como un método que usa biosensor de resonancia de plasmón superficial. Los antígenos presentes en el cuerpo vivo incluyen los de origen exógeno, tales como virus, bacterias y toxinas, y de origen endógeno, tales como antígenos específicos de cáncer y moléculas relacionadas con la enfermedad.

Para determinar una secuencia de nucleótidos de dicha región epítipo en una proteína antigénica presente dentro del cuerpo vivo de los pacientes, se diseñan una región que flanquea a dicha región epítipo y que tiene apenas ninguna variación en una secuencia de aminoácidos se selecciona y en base a una secuencia de nucleótidos de dicha región se diseñan cebadores para la amplificación de un ácido nucleico. Para el análisis de una secuencia de nucleótidos de la región epítipo de dicho antígeno, usando una muestra biológica, tal como sangre o tejido, mediante PCR se amplifica un ADN que codifica la región epítipo usando como molde un ADNc obtenido de ARN con una transcriptasa inversa o un ADN así como dichos cebadores. Los ADN amplificados se secuencian directamente o después de clonar con un secuenciador de ADN.

La reactividad de un anticuerpo monoclonal a un antígeno que tiene diversas secuencias de aminoácidos en una región epítipo puede determinarse clonando un ADN obtenido como se ha descrito anteriormente que contiene una región epítipo y midiendo después la unión de dicho anticuerpo monoclonal a una proteína que se expresa en *E. coli* a partir del ADN clonado. Adicionalmente, la correlación entre una secuencia de aminoácidos de dicha región epítipo y la eficacia de dicho anticuerpo monoclonal se puede confirmar no solo por una actividad de unión a antígeno sino también mediante pruebas *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* usando como índice una actividad antiviral o una actividad antitumoral. Por ejemplo, el virus derivado de pacientes se clona de un modo tal que se puede determinar una secuencia de aminoácidos de dicha región epítipo a partir de su secuencia de nucleótidos y simultáneamente se mide una actividad neutralizante viral para proporcionar de este modo datos de la correlación entre la secuencia de aminoácidos de dicha región epítipo y la eficacia de dicho anticuerpo monoclonal.

Un ejemplo típico de virus donde la diversidad de un antígeno se puede ver es el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1). El dominio neutralizante principal (PND) del VIH-1 se localiza en la porción central de la 3ª región variable (región V3) de la glicoproteína gp120 de la cubierta. Los presentes inventores han preparado un

anticuerpo monoclonal humanizado frente a PND y formulado dicho anticuerpo para aplicación clínica. Dicho anticuerpo monoclonal se vio afectado por su actividad neutralizante del VIH-1, es decir la unión a un antígeno del VIH-1, debido a la variación en una secuencia de aminoácidos de la región PND. Por tanto, para la aplicación clínica de dicho anticuerpo se estimó que el análisis de una secuencia de aminoácidos de la región epítipo y la posterior selección de sujetos a los que administrar dicho anticuerpo conducirá a la potenciación de la eficacia de dicho anticuerpo.

Como tal, con el fin de confirmar primero la presencia de un antígeno al cual se puede unir dicho anticuerpo monoclonal, se investigó la correlación entre una secuencia de aminoácidos de una región epítipo y la unión de dicho anticuerpo monoclonal a la región epítipo para determinar la secuencia de aminoácidos reconocida por dicho anticuerpo monoclonal, esperándose su eficacia mediante los procesos siguientes:

(1) Usando fragmentos peptídicos sintéticos consistentes en la secuencia de la región PND se confirmó una secuencia de la región epítipo reconocida por dicho anticuerpo monoclonal.

(2) Un gen de la región V3 se amplificó y clonó a partir de un virus aislado de paciente y expresado como una proteína de fusión con  $\beta$ -galactosidasa. Se determinó una unión de dicho anticuerpo monoclonal a la proteína expresada de dicha región V3 y se investigó la correlación entre la secuencia de aminoácidos de la región epítipo y la unión de dicho anticuerpo monoclonal.

(3) En base a los resultados obtenidos de este modo se seleccionó la "secuencia de referencia" candidata de dicho anticuerpo monoclonal.

(4) Se determinó una actividad neutralizante de dicho anticuerpo monoclonal al VIH-1 para confirmar que existe correlación entre la "secuencia de referencia" descrita anteriormente y la actividad neutralizante.

(5) Los genes de la región V3 del VIH-1 se amplificaron a partir de plasma o de células mononucleares de sangre periférica de los pacientes y se determinaron sus secuencias de nucleótidos. Las secuencias de aminoácidos se dedujeron de las secuencias de nucleótidos obtenidas y se compararon con la "secuencia de referencia" descrita anteriormente con el fin de predecir la idoneidad de los pacientes de interés para dicho anticuerpo.

En base a los hallazgos como se describen anteriormente, se descubrió que la diversidad de un antígeno expresado en los pacientes se puede analizar en base a una secuencia de nucleótidos para predecir la unión de dicho antígeno y un anticuerpo a dicho antígeno. Para usar en las escenas clínicas, cuando el VIH-1 es la molécula diana se proporciona un método para seleccionar los sujetos a los que administrar una preparación de anticuerpo monoclonal usando plasma de pacientes como muestra mediante los procesos como se describen más adelante.

Los ARN del VIH-1 en plasma se convierten en ADN con una transcriptasa inversa y se realiza la amplificación del ácido nucleico de una región V3. Los fragmentos de ADN amplificados, directamente o tras la clonación, se analizan para determinar sus secuencias de nucleótidos. Después, las secuencias de aminoácidos se deducen de las secuencias de nucleótidos obtenidas y se comparan con la "secuencia de referencia" seleccionada previamente de la secuencia de aminoácidos que es reconocible mediante el anticuerpo monoclonal en dicha preparación de anticuerpo monoclonal. La "secuencia de referencia" se puede determinar midiendo la unión a los péptidos o proteínas expresadas o la actividad neutralizante del VIH-1 de dicho anticuerpo monoclonal, como se ha descrito anteriormente. Además, analizando la correlación entre la secuencia de aminoácidos de la región PND del VIH-1 de los pacientes y la eficacia de dicha preparación de anticuerpo monoclonal mediante pruebas clínicas se pueden obtener datos más concretos de la "secuencia de referencia".

La presente invención se explica con más detalle por medio de los ejemplos siguientes, pero no deben interpretarse como limitantes de la misma.

#### Ejemplo 1

##### Análisis de la secuencia de aminoácidos reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-VIH usando péptidos sintéticos

Una secuencia de aminoácidos reconocida por KD-247, un anticuerpo monoclonal humanizado frente a la región PND, se analizó usando péptidos sintéticos derivados de la porción central de la región V3 de la gp120 del VIH-1. Los péptidos se sintetizaron mediante la técnica Pepscan (Geysen, H.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3998-4002, (1984)) y la actividad de unión de KD-247 a estos péptidos se determinó mediante ELISA. Con el fin de determinar la secuencia de aminoácidos más corta reconocible mediante KD-247, un péptido de los diez residuos de aminoácidos "IHIGPGRAFY", que es la secuencia de aminoácidos de la porción central de la región V3 de una cepa del VIH-1 de laboratorio (Cepa MN) que es neutralizada por KD-247 y los péptidos donde los residuos de aminoácidos se eliminaron secuencialmente uno a uno del péptido anterior "IHIGPGRAFY" a la extensión de los péptidos con cuatro residuos de aminoácidos de longitud se sintetizaron del siguiente modo: "IHIGPGRAF", "HIGPGRAFY", "IHIGPGRA", "HIGPGRAF", "IGPGRAFY", "IHIGPGR", "HIGPGRA", "IGPGRAF", "GPGRAFY", "IHIGPG", "HIGPGR", "IGPGRA", "GPGRAF", "PGRAFY", "IHIGP", "HIGPG", "IGPGR", "GPGRA", "PGRAF", "GRAFY", "IHIG", "HIGP", "IGPG", "GPGR", "PGRA", "GRAF" y "RAFY".

Barras de polietileno a las que se unieron los péptidos sintéticos se recubrieron previamente con una solución salina tamponada con fosfato que contenía 2 % de seroalbúmina bovina y 0,1 % de Tween 20 y se hicieron reaccionar con 2 µg/ml de KD-247. KD-247 con los péptidos unidos se midió con anticuerpo κ antihumano marcado con peroxidasa y el sustrato. Como se muestra en la Fig. 1, se descubrió que la secuencia de aminoácidos más corta era "IGPGR".

Con el fin de investigar si la reactividad de KD-247 se puede alterar cuando cada uno de los residuos de aminoácidos del péptido reconocidos por KD-247 se sustituye por otros residuos de aminoácidos, se sintetizaron péptidos donde cada uno de los residuos de aminoácidos en la secuencia "IHIGPGRIFY" derivada del VIH-1 (cepa MN) se sustituyeron por los otros 19 residuos de aminoácidos de origen natural y la reactividad de estos péptidos con KD-247 se midió como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la Fig. 2, se confirmó que solo unos pocos de otros residuos de aminoácidos se pueden sustituir por la secuencia de la porción central "PGR", especialmente el residuo de arginina (R) es un residuo de aminoácido esencial. Para los residuos de aminoácidos distintos a "PGR", podían sustituirse por muchos otros residuos de aminoácidos.

A partir de los resultados como se han descrito anteriormente, se encontró que KD-247 básicamente reconocía la secuencia "IGPGR" y podía seguir reconociendo las secuencias de aminoácidos con sustitución de un residuo de aminoácido dentro de la secuencia "IGPGR" y/ sus proximidades.

### Ejemplo 2

#### Análisis de la secuencia de aminoácidos reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-VIH usando proteínas expresadas

El sitio de reconocimiento de KD-247 como se confirma en el ejemplo 1 estaba basado en la observación de la reacción entre los péptidos cortos y dicho anticuerpo. No obstante, para evaluar una unión del anticuerpo a una proteína antigénica se tiene que considerar la influencia estérica además de la secuencia de aminoácidos de la porción de unión del antígeno. Por tanto, se determinó la unión de KD-247 a una proteína expresada que contiene la región V3.

Un gen que contiene la región V3 del VIH-1 se amplificó primero mediante la técnica de PCR anidada usando como molde los ADNc obtenidos a partir de genes del ARN del VIH-1 a partir de plasma de pacientes infectados por el VIH-1 con una transcriptasa inversa o ADN provirales del VIH-1 de células mononucleares de sangre periférica. Los cebadores usados para la primera PCR fueron: 5'-ACACATGGAATTAGGCCAGT-3' (OA-4) (SEC ID N° 1) y 5'-AAATCCCCTCCACAATTAA-3' (OD-4) (SEC ID N° 2), y los cebadores usados para la segunda PCR fueron: 5'-GCCGGATCCTCAACTCAACTGCTGTTAAAT-3' (EB-2) (SEC ID N° 3) y 5'-GCTCTGCAGTCAAATTTCTGGGTCCCCTCCTGAGG-3' (EC-2) (SEC ID N° 4). Los fragmentos de ADN amplificados se purificaron, se escindieron con las enzimas de restricción BamHI y PstI y se clonaron en los vectores plasmídicos (pUEXI) que contienen un gen de β-galactosidasa (β-Gal). Los vectores resultantes se introdujeron en células competentes para clonar. La PCR se realizó usando los ADN clonados como molde y los cebadores EB-2 y EC-2 y una secuencia de nucleótidos de la región V3 se analizó usando los ADN amplificados como molde y un secuenciador de ADN. En base a la secuencia de nucleótidos obtenida se determinó una secuencia de aminoácidos de la región V3.

Por otro lado, cada una de las células de *E. coli* clonadas donde se analizó la secuencia genética se cultivaron y se obtuvo una proteína de fusión de la región V3 y una beta-galactosidasa (V3/β-Gal) como se describe más adelante. En primer lugar, las células de *E. coli* cultivadas se rompieron con un dispositivo de rotura de células, las células alteradas se centrifugaron y los precipitados se disolvieron en tampón Tris (pH 7,5) que contiene 0,5 % de Triton X-100, seguido de centrifugación adicional. Los precipitados que contienen cuerpos de inclusión se disolvieron en tampón Tris (pH 7,5) que contiene urea 8M para purificar V3/β-Gals. Los V3/β-Gals obtenidos se sometieron a SDS-PAGE para confirmar que las proteínas de fusión se expresaban sin anomalías. Después se realizó un ELISA con el fin de ajustar una concentración de V3/β-Gals. Usando una placa con un anticuerpo anti-β-Gal inmovilizado, se añadieron V3/β-Gals expresada o β-Gal disponible comercialmente. El anticuerpo anti-β-Gal marcado con peroxidasa se usó como anticuerpo detector. Se preparó una curva de calibración con los resultados obtenidos del patrón y una concentración de V3/β-Gals expresados se determinó en términos de una concentración de β-Gal.

Después, para evaluar la reactividad entre V3/β-Gals y KD-247 se realizó un ELISA adicional. Las placas se inmovilizaron con el anticuerpo anti-β-Gal y se hicieron reaccionar con 200 ng/ml de cada uno de V3/β-Gals. Las V3/β-Gals se hicieron reaccionar con 1 µg/ml de KD-247 y la reacción se detectó con un anticuerpo IgG anti-humano marcado con peroxidasa. La unión de KD-247 a cada una de las V3/β-Gals se presentó con respecto a la absorbancia (100 %) de un control positivo como conjunto en cada una de las placas, es decir V3/β-Gal de la cepa MN del VIH-1.

La Fig. 3 muestra una actividad de unión relativa de KD-247 a las secuencias de aminoácidos de la porción central de V3 de cada una de las V3/β-Gals donde se analizaron aproximadamente 120 clases de clones del VIH-1 de los pacientes. Los clones que exhibieron un 100 % o más de la unión relativa tenían las secuencias de aminoácidos de la porción central de la región V3: "IGPARAF" (SEC ID N° 5), "IGPGRSF" (SEC ID N° 6), "IGPGRAL" (SEC ID N° 7),

"IGPGRTF" (SEC ID N° 8), "IGPGRAI" (SEC ID N° 9), "VGPGRAL" (SEC ID N° 10), y "IGPGRAF" (SEC ID N° 11). Estas secuencias se pueden denominar "secuencias de referencia" de ejemplo para evaluar la idoneidad para KD-247.

5 Ejemplo 3

Análisis de la secuencia de aminoácidos de la región V3 del VIH-1 y una actividad neutralizante viral

10 La correlación entre las secuencias de aminoácidos de la región V3 y la actividad neutralizante se determinó usando cepas de laboratorio y cepas clínicamente aisladas del VIH-1.

15 Las secuencias de nucleótidos de la región V3 del VIH-1 se determinaron como se describe en el ejemplo 2. Los virus se hicieron reaccionar con concentraciones variadas de KD-247 a 37 °C durante 1 hora y después se inocularon en células mononucleares de sangre periférica de adultos sanos activados con fitohemaglutinina. Después de cultivar durante 7 días, las células se lavaron y se continuó más un cultivo en presencia de IL-2 durante 7 días. Una cantidad del antígeno p24 del VIH-1 en el sobrenadante del cultivo se midió mediante ELISA. La cantidad de antígeno p24 obtenida en ausencia del anticuerpo se tomó como un 100 % y cada concentración de KD-247 añadida que redujo un 50 % (CI<sub>50</sub>) o 90 % (CI<sub>90</sub>) del antígeno p24 se presentaron como la actividad neutralizante.

20 Como se muestra en la Tabla 1, la actividad neutralizante de KD-247 dependía de las secuencias de aminoácidos en la porción central de la región V3. Es decir, todos los virus de VIH-1 que tenían la secuencia "IGPGRAF" en la porción central de la región V3, la unión de cuya secuencia a KD-247 se confirmó en los ejemplos 1 y 2, se neutralizaron mediante KD-247. Esto indica que las secuencias de aminoácidos en la porción central de la región V3  
25 tiene una correlación con la actividad de unión y la actividad neutralizante de KD-247 a dicho virus.

Tabla 1

Cepa de VIH-1	Secuencia de aminoácidos de la región V3		Actividad neutralizante (µg/ml)	
			CI <sub>90</sub>	CI <sub>50</sub>
Cepa de laboratorio				
MN	CTRPNYNKRKRIHI	GPGRAFYTTKNIIGTIRQAHC	1	0,1
IIIB	N-T--KS-QR	----V-IGK- -NM----	>50	>50
SF2	N-T-G--	-----A-EK-V-D-----	5	1
AD8	N-T-S--	-----GD--D-----	10	5
89.6	N-T-R-LS-	-----ARR--D-----	2,5	0,2
Cepa clínicamente aislada				
1	---- N-R-T----	-----	5	
2	---SN-K-S---	-----GE--D----	5	
3	----N-T-S---	-----GE--D----	8	
4	----N-7--S--M	--K----GD--N---Y-	>50	
5	--I-N-T-S---	-----A-GE--N-K---	10	
6	----N-T--S-R-QR	-----V-IGK -MM----	>50	
7	-I--N-T-G---	-L-WK-A-G-H----	>50	
8	----N-T-S-R-QR	-----V-IGK--NM----	>50	
9	--G--N-T--S-R-QR	-----V-IGK-NM----	>50	
10	-I--N-T-G---	-----A-D--N-----	8	
11	----HKTI-----	-----Q-E-N----	5	
12	---SN-T-R---	-----RQ-R-D---	4	
13	----N-1--H---	-----RG-RD--K---	10	
14	-----T-G---	-----V--G-RD--K---	4	
15	----N-T--S-L-	--Q-W---GQ--D-----	>50	
16	----N-T--S-PL	--Q-W---GQ-L-D-----	>50	
17	---SN-T-TS-T-	--QV--R-GD--D-----	>50	
18	---SN-T-TS-T-	--QV--R-GD--D-----	>50	

-: el mismo residuo de aminoácido que la cepa MN

30 Ejemplo 4

Análisis de la secuencia de aminoácidos de la región V3 en la muestra clínica y prueba de la idoneidad de los pacientes a KD-247

35 Se analizó un gen del VIH-1 de plasma o células mononucleares de sangre periférica de pacientes como se ha descrito en el ejemplo 2. En base a este análisis se dedujo una secuencia de aminoácidos de la región V3 del VIH-1 y se comparó con la "secuencia de referencia", es decir las secuencias de aminoácidos que se confirmó que eran

fuertemente reactivas con KD-247 en el ejemplo 2, para analizar la idoneidad de cada paciente al KD-247.

La Tabla 2 muestra las secuencias de aminoácidos deducidas del gen del VIH-1 en plasma o células mononucleares de sangre periférica de los pacientes y la idoneidad de cada uno de los pacientes a KD-247. Las secuencias de aminoácidos encerradas por la línea discontinua se compararon con las "secuencias de referencia" (SEC ID N° 5 a la SEC ID N° 11) obtenidas en el ejemplo 2. Cuando el aminoácido de interés era consistente con uno de las "secuencias de referencia", se evaluó como "idóneo", mientras que cuando el aminoácido de interés no era consistente con una cualquiera de las "secuencias de referencia" se evaluó como "no idóneo".

10 Tabla 2

Nº de paciente	Secuencia de aminoácidos de la región V3	A evaluar
1	CTRPSNNTRKSIHIGPGRAFYTTGDIIGDIRQAHC	Idóneo
2	CTRPNNHTRKSIHMGARRAWHTTGEIIGNLRQAHC	No idóneo
3	CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYATGEIVGDIRQAHC	Idóneo
4	CTRPGNNTRKSIHIGPGRALYATGDIVGNIRQAYC	Idóneo
5	CTRPHNNTRKSIHIGPGRAFYATGEITGDIRRAHC	Idóneo
6	CTRPNNNTRKRISMGPGRVYTTGQIIGDIRQAHC	No idóneo
7	CTRPHNNVRSRIHIGPGRAFYTTKRINGNIRQAYC	Idóneo
8	CTRPSNNTSKSISIGPGRAIYATGRIIGDIRQAHC	Idóneo
9	CSRPSNNTKGIHIGPGRAFFTTGEITGDIRQAHC	Idóneo
10	CTRPNNNTRKSIHMGPGKTFYTTGGIIGNIRQAHC	No idóneo
11	CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTGEIIGDIRQAHC	Idóneo
12	CTRPNNNTRKSIHMGPGSVLYATGAI VGNIRQAHC	No idóneo
13	CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYATGQIIGNIRQAHC	Idóneo
14	CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYATGSIMGNIRQAHC	Idóneo
15	CTRPNNNTRKGIHVGPGRALYTT*EIIGNIRQAHC	Idóneo
16	CTRPNNNTMKSIIHIGPGRAFYATGQVIGDIRKAYC	Idóneo
17	CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTGCIIGDIRQAYC	Idóneo
18	CTRPSNNTRTSITIGPGQVYFRTGDIIGDIRKAYC	No idóneo
19	CTRPNNNTRKGIHIGPGRAFYATGEIIGDIRQAHC	Idóneo
20	CERPNNNTRKSIHIGPGRAFYAAGEIIGNIRQAHC	Idóneo
21	CTRPNNNTRKSIHVGPGRALY*TTDIIGDIRQAHC	Idóneo
22	CTRPNNNTRKSIHIGPARAFYTTGDIIGDIRQAHC	Idóneo
23	CTRPNNNTRKGINIGPGRAFYATGAIIGDVRKAHC	Idóneo
24	CTRPSNNTGRGIRIGPGRAFYATQYITGDIRQAHC	Idóneo
25	CTRPNNHNRKPIHIGPGRSFYTTGQIIGNIRQAHC	Idóneo
26	CTRPNNNTRKRITLGPGRVYTTGQIIGNIRQAHC	No idóneo
27	CTRPNNNTRKSIHIGPGRALYTT*DIIGDIRHAHC	Idóneo
28	CTRPNNNTRKSIITIGPGRAFFTTGDTIGDIRKAYC	Idóneo
29	CIRPHNNTRKSIHIGPGRAFFATDKITGDIRQAHC	Idóneo
30	CARPNNNTRKSIHIGPGRAFYATEKIIGDIRQAHC	Idóneo
31	CTRPNNNTRKGIHIGPGRAFYATGQIIGNIRQAHC	Idóneo
32	CTRPNNNTRKSIHIGPGRTFYTTGDIIGDIRQAHY	Idóneo
33	CTRPNNNTRKSIHIGPGSAFYTTGEIIGDIRQAHC	No idóneo
34	CTRPHNNNTMKSIIHIGPGRAFYATGQVIGDIRKAYC	Idóneo
35	CARPNNNTRKSIITIGPGRAFYTTGEIIGDIRQAHC	Idóneo

\* : Delección de residuos de aminoácidos

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE

<120> Método para mejorar la eficacia en la prescripción de medicamentos de anticuerpos monoclonales para pacientes

20

ES 2 528 738 T3

<130> 663728  
 <150> JP 2003-42819  
 <151> 2003-02-20  
 5  
 <160> 11  
 <210> 1  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 15  
 <400> 1  
 acacatggaa ttaggccagt 20  
 <210> 2  
 <211> 20  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 25  
 <400> 2  
 aaattcccct ccacaattaa 20  
 <210> 3  
 <211> 30  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 35  
 <400> 3  
 gccggatcct caactcaact gctgttaaat 30  
 <210> 4  
 <211> 35  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 45  
 <400> 4  
 gctctgcagt caaattctg ggtcccctcc tgagg 35  
 <210> 5  
 <211> 7  
 55 <212> PRT  
 <213> VIH-1  
 <400> 5  
 Ile Gly Pro Ala Arg Ala Phe  
 60 <210> 6  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> VIH-1  
 1 5

ES 2 528 738 T3

	<400> 6		Ile Gly Pro Gly Arg Ser Phe
		1	5
5	<210> 7 <211> 7 <212> PRT <213> VIH-1		
	<400> 7		Ile Gly Pro Gly Arg Ala Leu
10		1	5
15	<210> 8 <211> 7 <212> PRT <213> VIH-1		
	<400> 8		Ile Gly Pro Gly Arg Thr Phe
20		1	5
	<210> 9 <211> 7 <212> PRT <213> VIH-1		
	<400> 9		Ile Gly Pro Gly Arg Ala Ile
25		1	5
	<210> 10 <211> 7 <212> PRT <213> VIH-1		
30	<400> 10		Val Gly Pro Gly Arg Ala Leu
		1	5
35	<210> 11 <211> 7 <212> PRT <213> VIH-1		
	<400> 11		Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe
		1	5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para potenciar la eficacia de una preparación de anticuerpo monoclonal, donde dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo que reconoce como antígeno el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1), que comprende seleccionar pacientes idóneos para la administración de dicha preparación de anticuerpo monoclonal analizando previamente una secuencia de aminoácidos de una proteína antigénica de una molécula diana presente en una muestra de pacientes, donde dicho método comprende las etapas: (1) deducir una secuencia de aminoácidos de una proteína expresada en pacientes de una secuencia de nucleótidos de un gen de una molécula diana determinada mediante aislamiento y análisis de dicho gen en la biopsia de pacientes; (2) evaluar la idoneidad de los pacientes para la administración de dicha preparación de anticuerpo monoclonal comparando la secuencia de aminoácidos deducida en la etapa (1) con una secuencia de aminoácidos que es reconocible por dicho anticuerpo monoclonal como ya se ha determinado anteriormente; y (3) seleccionar pacientes a los que administrar dicha preparación de anticuerpo monoclonal con su eficacia prevista basada en la idoneidad evaluada en la etapa (2).
- 10 2. El método para potenciar la eficacia de una preparación de anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, donde la comparación entre una secuencia de aminoácido deducida de una proteína diana y una o más secuencias de aminoácidos que es/son reconocibles por dicho anticuerpo monoclonal como se ha determinado anteriormente usando como índice la unión de un anticuerpo monoclonal a un péptido o una proteína expresada que tiene dicha secuencia de aminoácidos deducida.
- 15 3. El método para potenciar la eficacia de una preparación de anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o 2, donde dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo frente a la región V3 de la glicoproteína gp20 de la cubierta del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1(VIH-1).
- 20 4. El método para potenciar la eficacia de una preparación de anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia, o secuencias, de aminoácidos que es/son reconocibles por dicho anticuerpo monoclonal como se ha determinado previamente para el VIH-1 se selecciona del grupo que consiste en "IGPARAF" (SEC ID N° 5), "IGPGRSF" (SEC ID N° 6), "IGPGRAL" (SEC ID N° 7), "IGPGRTF" (SEC ID N° 8), "IGPGRAI" (SEC ID N° 9), "VGPGRAL" (SEC ID N° 10), y "IGPGRAF" (SEC ID N° 11).
- 25 30

Fig. 1

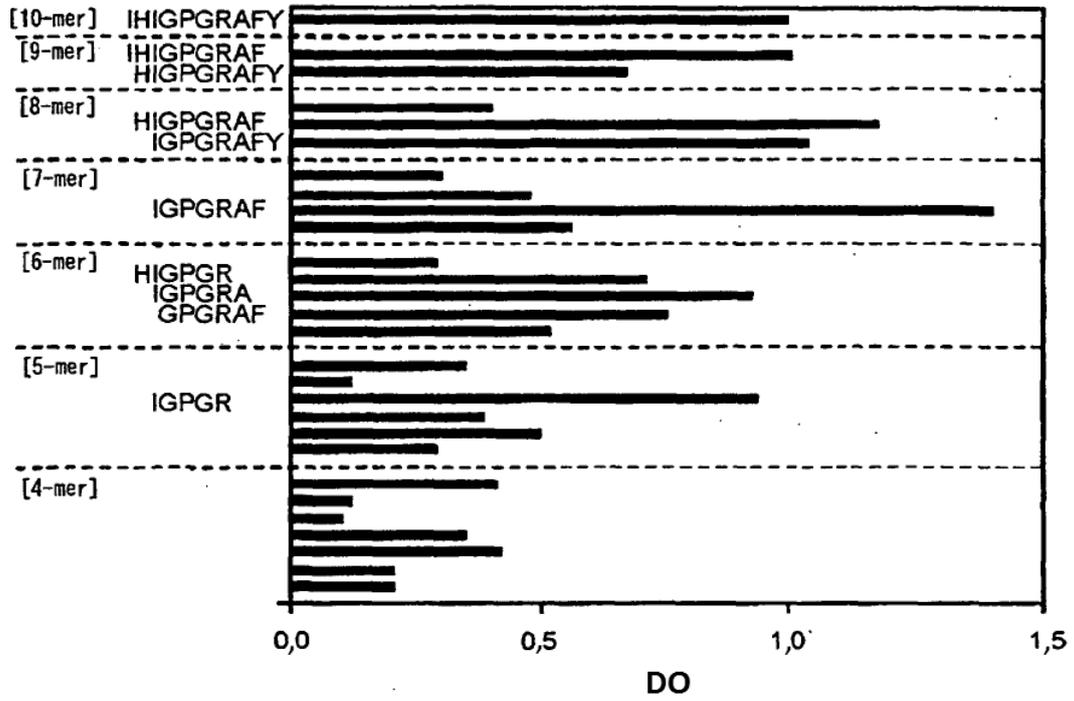


Fig. 2a

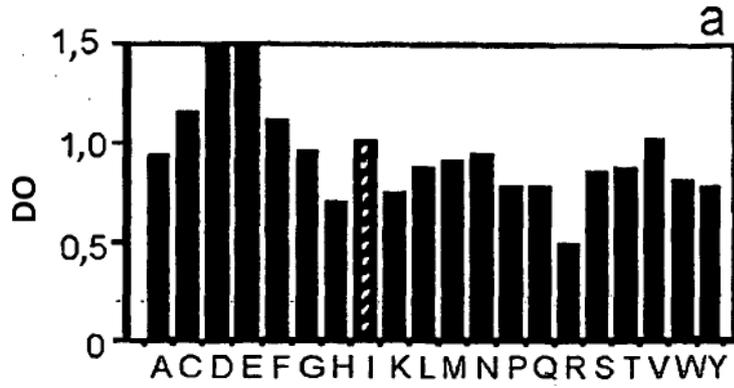


Fig. 2b

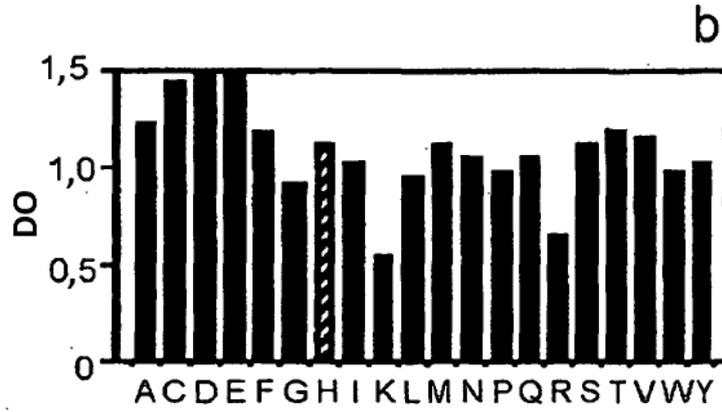


Fig. 2c

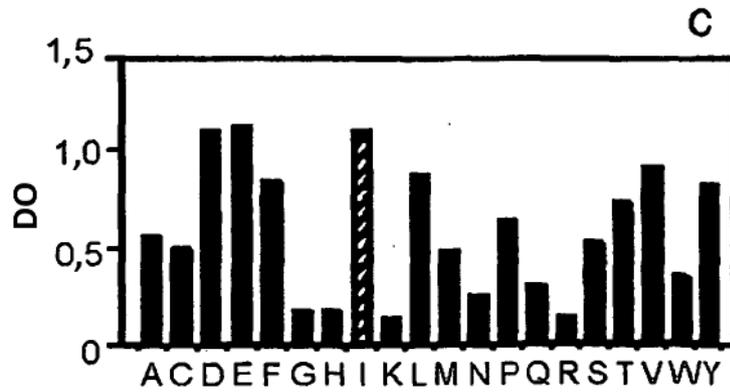


Fig. 2d

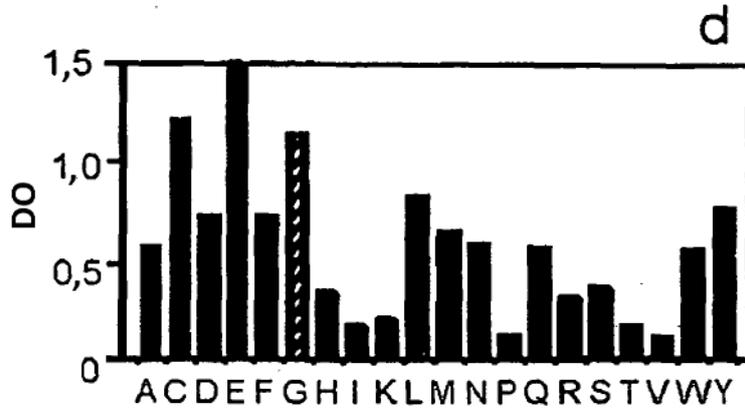


Fig. 2e

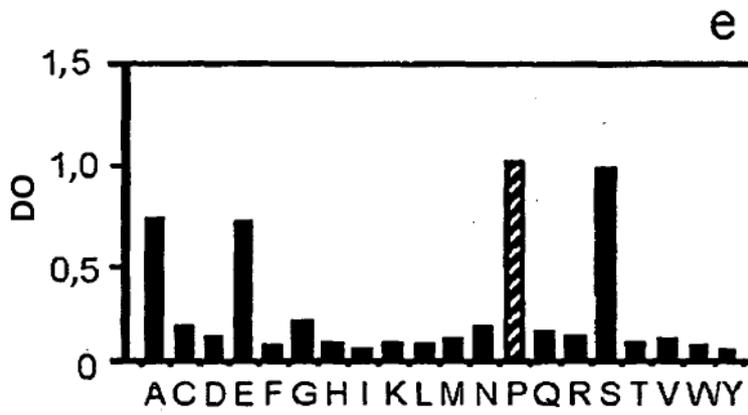


Fig. 2f

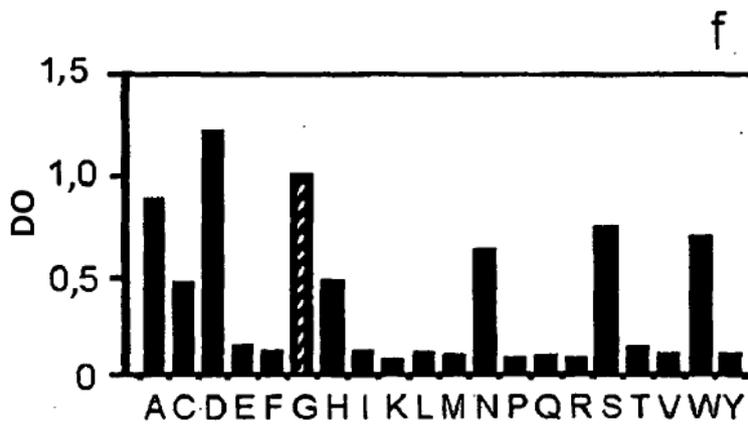


Fig. 2g

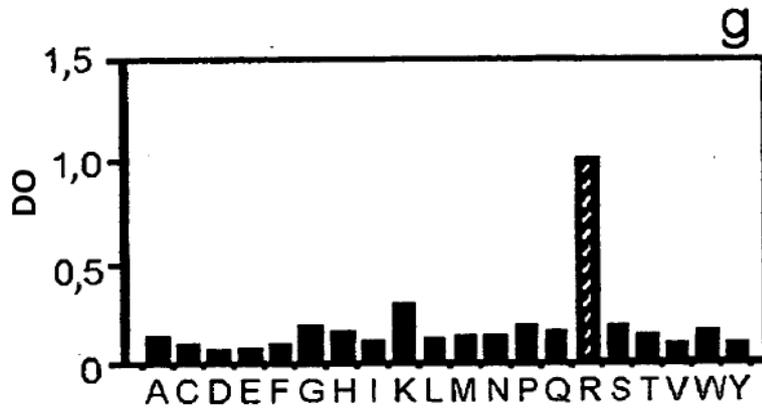


Fig. 2h

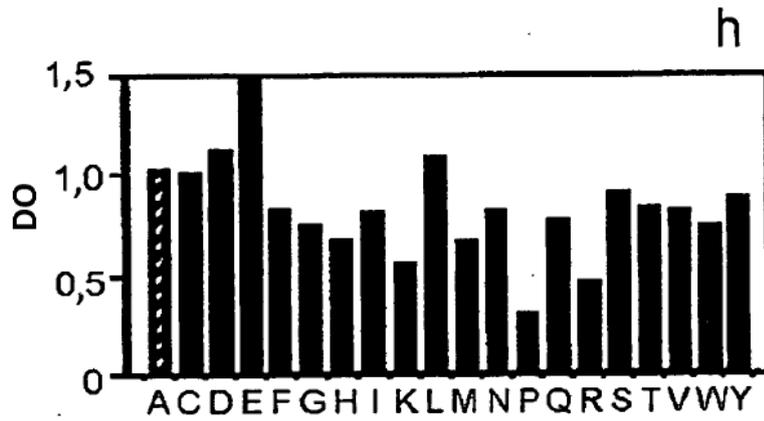


Fig. 2i

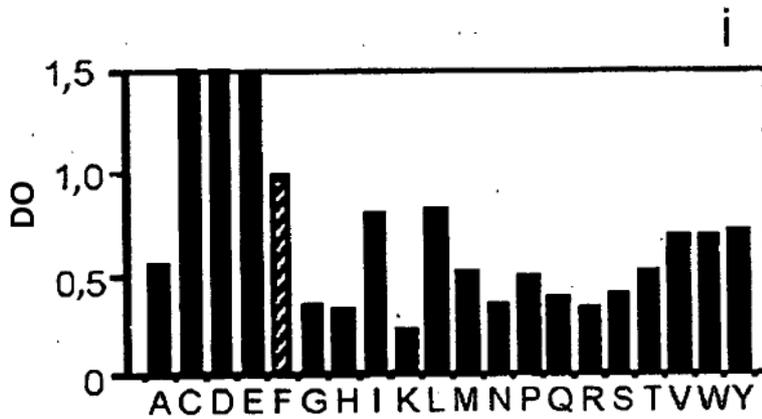


Fig. 2j

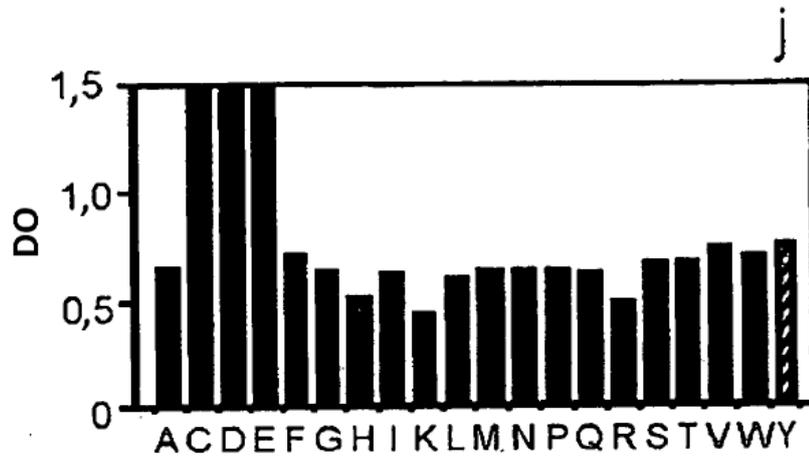
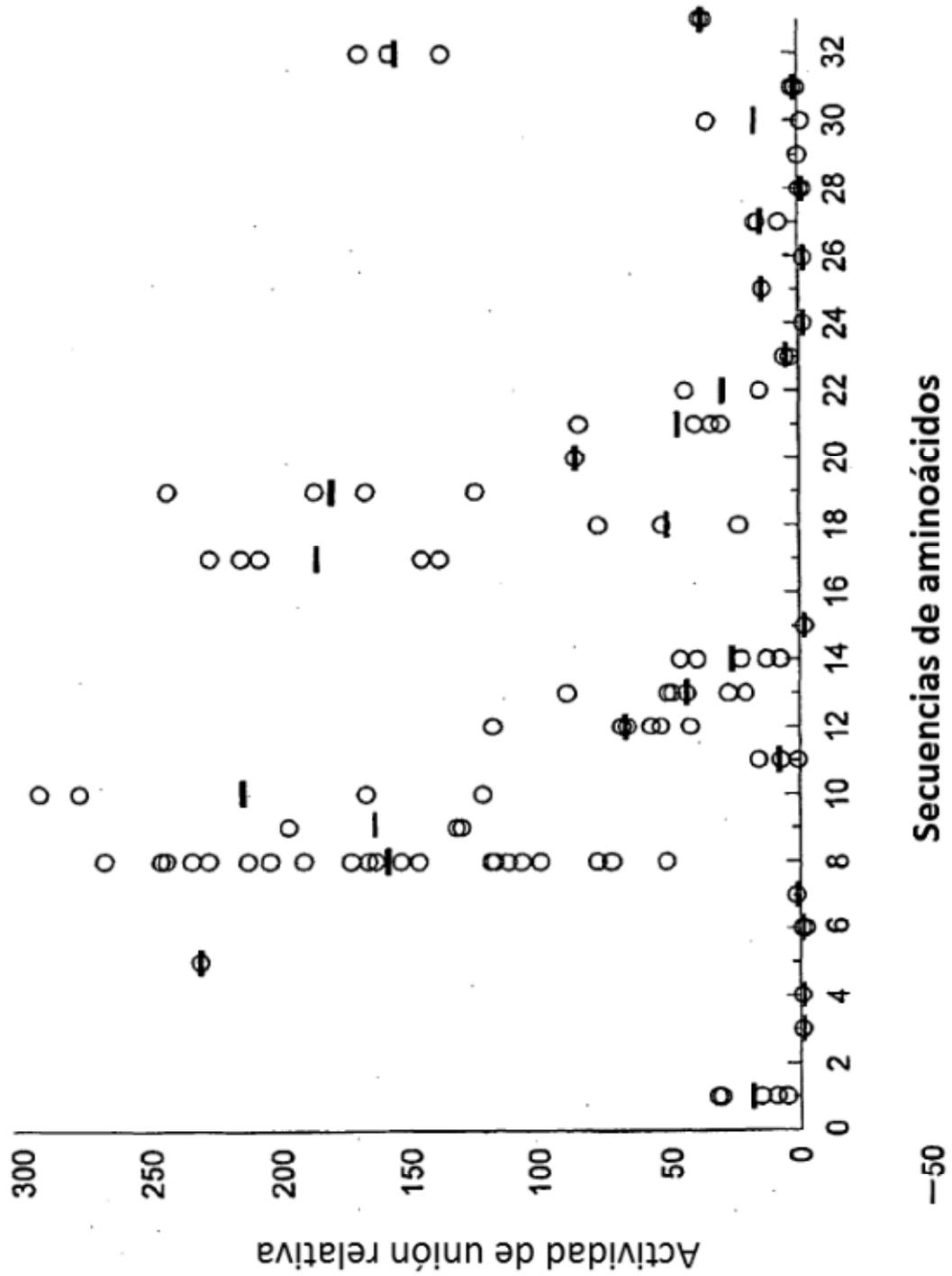


Fig. 3



Secuencias de aminoácidos