

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 528**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/34** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2010 E 10715299 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2403529**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal anti-Rhesus D**

30 Prioridad:

**06.03.2009 FR 0951412**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.04.2015**

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU  
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES  
(100.0%)  
3, Avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf  
91940 Les Ulis , FR**

72 Inventor/es:

**GAUCHER, CHRISTINE;  
JORIEUX, SYLVIE y  
DE ROMEUF, CHRISTOPHE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 533 528 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 monoclonal anti-Rhesus D

La invención se refiere a un anticuerpo dirigido frente a Rhesus D (o anticuerpo anti-RhD)

**Antecedentes tecnológicos**

- 5 Se designa comúnmente con el término "Rhesus positivo" o "Rh-positivo" a los sujetos cuyos hematíes se aglutinan con aloanticuerpos dirigidos frente al antígeno D (que es uno de los antígenos del sistema RH), y con el término "Rhesus negativo" o "Rh-negativo" a los sujetos cuyos hematíes no se aglutinan con estos aloanticuerpos.

10 La enfermedad hemolítica de los recién nacidos se debe en la mayoría de los casos, a la presencia, en una madre Rh-negativa, de aloanticuerpos anti-RhD (la alo-inmunización frente a otros antígenos del sistema RH es mucho más rara), lo que provoca en un feto Rhesus positivo una anemia hemolítica que va a necesitar, bien transfusiones *in utero*, bien una exsanguinotransfusión en el nacimiento en los casos graves.

La alo-inmunización de la madre ocurre generalmente durante un parto precedente; los hematíes fetales pasan a la circulación materna, e inducen una inmunización si el niño es Rh-positivo.

15 La prevención de la enfermedad hemolítica de los recién nacidos consiste en la inyección de anticuerpos anti-Rh D, a las mujeres Rhesus negativas, inmediatamente después de un parto o una interrupción del embarazo.

Actualmente, los anticuerpos anti-Rhesus utilizados para este objetivo son inmunoglobulinas policlonales que provienen de donantes voluntarios Rhesus negativos, inmunizados varias veces frente a hematíes Rh-positivos.

20 Esto plantea problemas, por una parte debido a la necesidad de disponer de voluntarios en número suficiente para responder a las necesidades, y por otra parte debido a los riesgos de contaminación por virus u otros patógenos que podrían estar presentes en las preparaciones de inmunoglobulinas obtenidas a partir de la sangre de los voluntarios.

Aunque se han generado varios anticuerpos monoclonales anti-RhD para reemplazar los anticuerpos policlonales, hasta la fecha ninguno está disponible en clínica (Sibéril et al, Clinical Immunology, 2006, 118: 170-179).

25 El clon T125 producido por las células YB2/0 de mieloma de rata (clon designado T125 YB2/0), reportado por Sibéril et al, *supra* (y la solicitud WO2001/77181), era un candidato prometedor, pero con el riesgo de ser relativamente inestable debido a reorganizaciones intramoleculares.

**Resumen de la invención**

Los inventores han puesto a punto ahora un nuevo anticuerpo monoclonal anti-RhD, que presenta una estabilidad mejorada.

30 Este anticuerpo, que es una inmunoglobulina IgG1, contiene una cadena pesada codificada por la secuencia nucleotídica SEQ ID N°1. Más particularmente, el anticuerpo es una inmunoglobulina IgG1 tetramérica compuesta por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, comprendiendo la cadena pesada la secuencia de aminoácidos SEQ IN N°2, y comprendiendo la cadena ligera la secuencia de aminoácidos SEQ IN N°4.

Este anticuerpo se designa anticuerpo R593 en la presente descripción.

35 El anticuerpo R593 se ha obtenido por mutación del anticuerpo designado R297, resultante del clon T125 A2 producido por linfocitos B transformados con EBV. Como el anticuerpo R297, el anticuerpo R593 de la invención es una IgG1 tetramérica compuesta por 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras que poseen 32 residuos de cisteínas implicados en 16 puentes disulfuro intra-cadena pesada (4 por cadena), intra-cadena ligera (2 por cadena) e inter-cadena (4 por cadena). El anticuerpo R593 de la invención se distingue del anticuerpo R297 por un residuo fenilalanina en lugar de un residuo cisteína en la posición 68 de la cadena pesada. Su especificidad antigénica es  
40 también buena, y su estabilidad está mejorada, porque ya no es posible ninguna reorganización intramolecular indeseable.

Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo, en asociación con excipientes farmacéuticamente aceptables.

Preferentemente, la composición comprende un tampón citrato.

45 Ventajosamente, la composición comprende igualmente un excipiente poliol tal como manitol.

Preferentemente también, comprende un tensioactivo no iónico.

Una composición particularmente preferida comprende el anticuerpo asociado con un tampón citrato 30 mM, pH 6,5, polisorbato 80 o un poloxámero, manitol y NaCl. Un ejemplo de composición comprende un tampón citrato 30 mM, pH 6,5, 400 ppm de polisorbato 80, 17 g/L de manitol y 3,25 g/L de NaCl. Otro ejemplo de composición comprende

un tampón citrato 30 mM, pH 6,5, 400 ppm de polisorbato 80 ó 301 ppm de poloxámero 188, 17 g/L de manitol y 3,25 g/L de NaCl.

#### **Descripción detallada de la invención:**

##### *Producción del anticuerpo*

5 El anticuerpo monoclonal de la invención puede producirse por cualquier técnica conocida por el experto en la técnica, por ejemplo por recombinación en una célula huésped, transformada con uno o más vector(es) que permiten la expresión y/o la secreción de las secuencias nucleotídicas que codifican la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo. El vector contiene generalmente un promotor, señales de inicio y de terminación de la traducción, así como regiones apropiadas de regulación de la transcripción. Se mantiene de forma estable en la célula huésped y puede poseer opcionalmente señales particulares que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos diferentes elementos se eligen y optimizan por el experto en la técnica en función del huésped celular utilizado.

Por lo tanto, también se describe un ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo, comprendiendo dicha cadena pesada la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°2.

15 Se suministra igualmente un vector de expresión, por ejemplo un vector viral o plasmídico, que comprende un ácido nucleico tal como se define aquí. El vector puede replicarse autónomamente en el huésped elegido, o puede tratarse de vectores integrativos el huésped elegido. Igualmente, es útil un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo. Otro objeto de la invención es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo, tales como se definen aquí.

20 Dichos vectores se preparan por métodos utilizados habitualmente por el experto en la técnica, y los clones resultantes pueden introducirse en un huésped apropiado por métodos estándar, tales como lipofección, electroporación, utilización de agentes policatiónicos, choque térmico, o métodos químicos.

25 Igualmente, se describe una célula huésped transfectada con dicho o dichos vectores. El huésped celular puede elegirse entre los sistemas procariotas o eucariotas, por ejemplo células bacterianas pero igualmente células de levadura o células animales, en particular células de mamíferos. Se pueden utilizar igualmente células de insectos o células de plantas.

30 En otro aspecto, la invención tiene por objeto un procedimiento de producción de un anticuerpo de la invención, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes: a) el cultivo en un medio y condiciones de cultivo apropiadas de una célula huésped que expresa una cadena pesada y una cadena ligera tales como se definen aquí; y b) la recuperación de dichos anticuerpos así producidos a partir del medio de cultivo o de dichas células cultivadas.

35 Un ejemplo particular de procedimiento de producción es una producción en una célula de insecto, como se describe por ejemplo en la solicitud internacional WO96/07740. Para esto, un casete de expresión que comprende una secuencia que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal, o una secuencia que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal, secuencia que se pone bajo control transcripcional de un promotor apropiado, por ejemplo, un promotor de baculovirus.

A título de ejemplo de promotores de baculovirus, se citarán los promotores de la poliedrina y de P10 de los baculovirus AcMNPV o SIMNPV, o los derivados de promotores de baculovirus, constituidos por promotores sintéticos o recombinantes, obtenidos a partir de un promotor de baculovirus, y funcionales en células de insectos.

40 La presente invención suministra igualmente vectores recombinantes, que portan al menos un casete de expresión tal como se ha definido anteriormente; en este marco, la presente invención engloba en particular baculovirus recombinantes que permiten la expresión del anticuerpo R593, así como plásmidos de transferencia que permiten la construcción de dichos baculovirus recombinantes.

45 Para permitir la expresión simultánea de la cadena pesada (cadena H) y de la cadena ligera (cadena L) y su reasociación para formar la molécula de anticuerpo recombinante, se pueden utilizar dos casetes en un mismo vector de expresión. Se puede preparar así, por ejemplo, un baculovirus doble recombinante en el que la secuencia que codifica cada una de las cadenas H y L está bajo el control de un promotor fuerte. Para esto, se pueden seguir las etapas siguientes:

- se preparan separadamente dos plásmidos de transferencia, uno para la cadena H, y uno para la cadena L;

50 - se cotransfectan las células de insecto con el ADN de los vectores de transferencia así realizados y el ADN de baculovirus. Esta cotransfección se efectúa en dos etapas: Se utiliza el plásmido de transferencia que contiene el casete de expresión para el gen de la cadena ligera flanqueado por regiones que rodean el gen de la poliedrina en el baculovirus salvaje, con el ADN del baculovirus salvaje AcMNPV, para cotransfectar las células de insecto en cultivo. Por recombinación homóloga entre el ADN viral y el plásmido, las secuencias que codifican la cadena ligera de la inmunoglobulina recombinante se transfieren al genoma viral.

- Después de la replicación del ADN viral en las células transfectadas, se procede a la selección de los baculovirus recombinantes que han integrado la secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina recombinante.

5 - en una etapa siguiente, las células se cotransfectan con el ADN del baculovirus recombinante obtenido anteriormente, y con el del plásmido de transferencia que contiene el casete de expresión que porta el gen que codifica la cadena pesada del anticuerpo recombinante flanqueada por regiones que rodean al gen P10 del baculovirus. Por recombinación homóloga, como anteriormente, el gen de la cadena pesada se transfiere al ADN viral.

- se seleccionan los virus doble-recombinantes que son capaces de producir simultáneamente una cadena pesada y una cadena ligera de inmunoglobulina.

10 Otro ejemplo de procedimiento de producción es la utilización de un vector de expresión de tipo viral o plasmídico, para la expresión del anticuerpo monoclonal en una célula de mamífero.

Las células de mamífero preferidas para la expresión del anticuerpo monoclonal son la línea de rata YB2/0, la línea de hámster CHO, en particular las líneas CHO dhfr- y CHO Lec13, PER.C6TM (Crucell), 293, K562, NS0, SP2/0, BHK o COS.

15 Otro modo de producción es la expresión del anticuerpo recombinante en organismos transgénicos, por ejemplo en plantas (Ayala M, Gavilondo J Rodríguez M, Fuentes A, Enríquez G, Pérez L, Cremata J, Pujol M. Production of plantibodies in Nicotiana plants. Methods Mol Biol. 2009; 483: 103-34.) o bien en la leche de animales transgénicos tales como el conejo, la cabra o el cerdo (Pollock, D.P., J.P. Kutzko, E. Birck-Wilson, J.L. Williams, Y. Echelard y H.M. Meade. (1999). Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. Journal of Immunological Methods. 231: 147-157).

20

#### *Aplicaciones terapéuticas*

25 El anticuerpo monoclonal anti-RhD de la invención es útil a título de medicamento, en particular para la prevención de la alo-inmunización Rhesus de individuos Rh negativos. El modo de acción de las inmunoglobulinas anti-D *in vivo* es una fijación específica de los anticuerpos sobre el antígeno D de los glóbulos rojos Rh (D) positivos, seguido de una eliminación de estos glóbulos rojos de la circulación esencialmente a nivel del bazo. Este aclaramiento está asociado con un mecanismo dinámico de supresión de la respuesta inmune primaria en los individuos y por lo tanto previene la inmunización.

Así, el anticuerpo de la invención es particularmente útil para la prevención de una enfermedad hemolítica en el recién nacido, por administración a una mujer RhD negativa.

30 En efecto, se puede utilizar un anticuerpo de la invención de manera profiláctica para la prevención de la aloinmunización de mujeres Rhesus negativas, inmediatamente después del nacimiento de un niño Rhesus positivo, y para prevenir, durante embarazos posteriores, la enfermedad hemolítica del recién nacido (MHNN); durante los abortos, embarazos extra-uterinos en situación de incompatibilidad Rhesus D o también durante hemorragias transplacentarias que resultan de amniocentesis, de biopsias crónicas, o de manipulaciones obstétricas traumatizantes en situación de incompatibilidad Rhesus D.

35

Además, se puede utilizar un anticuerpo de la invención en el caso de transfusiones Rh incompatibles con sangre o derivados sanguíneos lábiles.

Un anticuerpo de la invención es igualmente útil para la prevención o el tratamiento de una Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI).

#### 40 *Formulaciones*

Otro objeto de la invención se refiere por lo tanto a una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo a título de principio activo, en asociación con uno o más excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s).

45 En la presente descripción, se pretende designar por excipiente farmacéuticamente aceptable, un compuesto o una combinación de compuestos que forman parte de una composición farmacéutica que no provocan reacciones secundarias y que permiten por ejemplo la facilitación de la administración del o de los compuestos activos, el aumento de la duración de su vida y/o de su eficacia en el organismo, el aumento de su solubilidad en disolución o también la mejora de su conservación.

Estos excipientes farmacéuticamente aceptables son muy conocidos y se adaptarán por el experto en la técnica en función de la naturaleza y del modo de administración del o de los compuestos activos elegidos.

50 Preferentemente, la formulación se conserva en forma líquida, o en forma liofilizada.

Pueden utilizarse sustancias tamponadoras, por ejemplo, en forma de carbonato, fosfato, citrato, acetato, borato, trimetamina [(2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol), TRIS], glicina y lisina (PDA Journal of Pharmaceutical

Science and Technology, Vol. 51(4), 1997: Excipients and their use in injectable products (SANDEEP NEMA, R.J. WASHKUHN, R.J. BRENDEL, p 166-171).

5 Las composiciones del anticuerpo en tampón citrato (por ejemplo, a aproximadamente 30 mM) se ha mostrado que son particularmente estables. Se prefieren las formulaciones que presentan un pH de aproximadamente 5,5 a menos de 7, preferentemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 6,5.

Los inventores han mostrado que la adición de manitol y de NaCl aumentaba la solubilidad del anticuerpo. La cantidad de manitol y NaCl se elige generalmente de manera que se obtiene una tonicidad del orden de 300 mOsm/kg.

10 La adición de un tensioactivo de tipo polímero no-iónico, como el polisorbato 80 (Tween® 80) o un poloxámero de tipo poloxámero 188 (Pluronic F68® o Lutrol F 68®) también es ventajosa, por ejemplo en una cantidad de aproximadamente 200 a aproximadamente 600 ppm, preferentemente de aproximadamente 300 a aproximadamente 500 ppm, preferentemente de aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 400 ppm.

15 La invención suministra más particularmente una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención, en presencia de un tampón citrato 30 mM, pH 6,5, manitol, NaCl, y polisorbato 80 o un poloxámero, tal como poloxámero 188.

Una composición farmacéutica preferida comprende el anticuerpo de la invención, en presencia de un tampón citrato 30 mM, pH 6,5, y polisorbato 80 400 ppm o poloxámero 188 301 ppm, con una concentración de manitol y de NaCl suficiente para obtener una tonicidad de 300 mOsm/kg.

20 De manera preferida, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 5 g/L del anticuerpo, preferentemente aproximadamente 0,3 g/L del anticuerpo.

Preferentemente, el anticuerpo se administra por vía sistémica, en particular por vía intravenosa, por vía intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea, o por vía oral. De manera más preferida, la composición que comprende los anticuerpos según la invención, se administra en varias veces, de manera escalonada en el tiempo.

25 Sus modos de administración, posologías y formas galénicas óptimas pueden ser determinadas según los criterios que se tienen generalmente en cuenta en el establecimiento de un tratamiento adaptado a un paciente como, por ejemplo, la edad o el peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios constatados.

Los ejemplos y figuras siguientes ilustran la invención sin limitar el alcance.

### 30 Leyenda de las figuras

La Figura 1 muestra el mapa de restricción del vector T125-H26.

La Figura 2 muestra el mapa de restricción del vector T125-DHFR.

La Figura 3 muestra el mapa de restricción del vector H416-24.

La Figura 4 muestra el mapa de restricción del vector T125-Phe68.

35 La Figura 5 muestra el mapa de restricción del vector H416-30.

La Figura 6 muestra el mapa de restricción del vector K416-23.

La Figura 7 muestra el mapa de restricción del vector HK463-18.

La Figura 8 es un esquema que muestra la construcción del vector T125-Phe68.

### Ejemplos

#### 40 Ejemplo 1: Identificación de una inestabilidad del anticuerpo R297

El anticuerpo R297 es una IgG1 tetramérica compuesta por 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras que poseen 32 residuos cisteínas implicados en 16 puentes disulfuro intra-cadena pesada (4 por cadena), intra-cadena ligera (2 por cadena) e inter-cadena (4). El anticuerpo R297 posee igualmente a nivel N-terminal de su cadena pesada una cisteína no emparejada en la posición Cys 68. La presencia de este SH libre muy reactivo cerca del puente disulfuro intra-cadena Cys22-Cys96 puede conllevar una competición y reorganizaciones moleculares con la formación de nuevos puentes disulfuros.

Los inventores han identificado los puentes disulfuro de R297 y las reorganizaciones moleculares eventuales.

Este estudio se ha realizado por cartografía peptídica en condiciones no reductoras, de forma que se conserva su integridad, y la identificación de los péptidos generados por espectrometría de masa MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry).

5 Los resultados obtenidos han permitido identificar los puentes disulfuro siguientes: Cys23-Cys88, Cys134-Cys194 para la cadena ligera y Cys22-Cys96, Cys153-Cys209 Cys270-Cys330 y Cys376-Cys434 para la cadena pesada.

10 Los espectros de masas MALDI revelan la presencia de un péptido de masa 1.771,79 Da correspondiente al dipéptido [20LSCTASGFTFK30]-[68CTFSR72] (SEQ ID N°5) que contiene el puente disulfuro Cys22-Cys68 (masa teórica 1.771,81 Da). El análisis MS-MS del ión parental a 1.771,797 Da permite confirmar las secuencias LSCTASGFTFK (SEQ ID N°6) y CTFSR (SEQ ID N°7) de este dipéptido. Finalmente, por reducción in situ, este pico disminuye en beneficio de dos iones a 613,28 y 1.161,56 Da correspondientes a las masas teóricas de los péptidos [68CTFSR72 (SEQ ID N°7) y [20LSCTASGFTFK30] (SEQ ID N°6) respectivamente (masas te: 613,28 y 1.161,57 Da). El péptido que contiene la Cys96 no emparejada se ha identificado igualmente. El conjunto de estos resultados muestra la presencia de un puente disulfuro Cys22-Cys68.

15 De la misma forma, los espectros MALDI revelan la presencia de un péptido de masa 3.658,54 Da correspondiente al dipéptido [73DNSQDTLYLQLNSLRPEDITAVYYCAR99]-[68CTFSR72] (SEQ ID N°8) que contiene el puente disulfuro Cys22-Cys96 (masa teórica 3.658,58 Da). El análisis MS-MS del ión parental permite confirmar la secuencia del dipéptido. Este pico disminuye después de reducción sobre diana en beneficio de dos iones de masas correspondientes a los péptidos [68CTFSR72] (SEQ ID N°7) y [73DNSQDTLYLQLNSLRPEDITAVYYCAR99] (SEQ ID N°9). Por otra parte, se ha identificado el péptido que contiene la Cys22 libre. El conjunto de estos resultados revela la presencia de un puente disulfuro Cys68-Cys96.

20 El análisis estructural por MALDI-MS ha permitido identificar todos los puentes disulfuro intra-cadena de R297. Se indica que la Cys68 no emparejada interacciona con el puente disulfuro vecino Cys22-Cys96 para formar los puentes Cys22-Cys68 y Cys68-Cys96. Estas reorganizaciones intramoleculares pueden inducir cambios en la estructura tridimensional de la región N-terminal de Fab y tener un impacto sobre la afinidad para el antígeno y la inmunogenicidad de la proteína. La presencia de estas diferentes formas implicaría, por lo tanto, una cuantificación con un control sistemático de la reproducibilidad y de la estabilidad de éstas en el producto final a lo largo del desarrollo.

## Ejemplo 2: Producción de un anticuerpo mutado

### Materiales y métodos

30 Se han aplicado técnicas clásicas de biología molecular. La mutagénesis se ha realizado por PCR, la región portadora de la mutación se ha amplificado por PCR y clonado en un vector intermedio. El vector final se ha construido por clonación del vector de cadena pesada en el vector de cadena ligera. Los plásmidos recombinantes así obtenidos se han introducido en bacterias (transformación de las bacterias), y se han cribado para obtener secuencias conformes con la secuencia esperada antes de la amplificación (cultivo de las bacterias) del clon  
35 seleccionado con el fin de obtener las cantidades de vector suficientes para la etapa de transfección. Los vectores producidos durante el cultivo bacteriano se han purificado y linearizado en previsión de la transfección en la línea YB2/0.

Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

Cebador A2VH11

5'-CTATATCATATGATGGAAGGAATATAACAATATGCAGACTCCGTGAAGGGCC

40 GATTCACCTTCTC-3' (SEQ ID N°10)

nucleótidos subrayados: sitio de restricción Ndel

nucleótido encuadrado: basa mutada, mutación del codón TGC (que codifica el aminoácido Cisteína) a codón TTC (que codifica el aminoácido fenilalanina).

Este cebador 5' localizado en la región VH de T125 A2 introduce la mutación G a T.

45 Cebador GSP2ANP

5'- GGAAGTAGTCCTTGACCAGGCAG -3' (SEQ ID N°11)

Este cebador 3' (antisentido) está localizado en la parte 5' de la región constante G1 de T125 A2.

Los vectores utilizados fueron los siguientes:

- Vector T125-H26

Este vector contiene la UT H del clon T125 A2 (véase el mapa del vector en la figura 1).

- Vector T125-DHFR

Este vector contiene las UT H y Kappa del clon T125 A2 así como DHFR (véase el mapa del vector en la figura 2).

5 - vector H416-24

Este vector intermedio de cadena pesada contiene la UT H del clon T125 A2 (véase el mapa del vector en la figura 3).

- H416-30

10 Este vector de expresión de cadena pesada presenta la mutación C68F en la región variables VH del anticuerpo. Se construyó a partir del plásmido T125-Phe68 (mapa en la figura 4) portador de la mutación C68F y de un vector intermedio desprovisto de intrón (véase el mapa en la figura 5).

- vector K416-23

Este vector de expresión de cadena ligera contiene las UT Kappa del clon T125 A2 y DHFR (véase el mapa en la figura 6).

15 Resultados:

La secuenciación del anticuerpo anti-D de origen R297, obtenido del clon T125 A2 (linfocito B obtenido de un donante inmunizado transformado con EBV), ha permitido mostrar que posee en la región variable de su cadena pesada (VH) una cisteína en posición 68 (posición 67 según la nomenclatura de Kabat (Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Publicación NIH, 91-3242 (1991) localizada en la región de soporte 3 ("marco" FWR3, según Kabat). Este anticuerpo presenta, por lo tanto, un residuo de cisteína adicional además de las dos cisteínas en posición 22 y 96 (posición 22 y 92 según la nomenclatura de Kabat) implicadas en un puente disulfuro.

20 La mutagénesis se ha realizado por la técnica de amplificación por PCR de un fragmento a nivel de la región 3' de la secuencia VH sobre el vector de cadena pesada T125-H26 mediante los cebadores descritos anteriormente. El codón TGC que codifica el aminoácido cisteína se ha sustituido por el codón TTC que codifica el aminoácido fenilalanina.

25 Este fragmento 3' de VH obtenido se ligó con el fragmento 5' de VH en un vector comercial intermedio (que contiene el fragmento 5' de VH obtenido de T125-H26). El fragmento VH Phe68 obtenido, correspondiente al fragmento VH mutado, se introdujo en el vector T125 DHFR para formar el vector de expresión final T125-Phe68 (véase el esquema de la figura 8).

30 El vector T125-Phe68 contiene, por lo tanto, la unidad de transcripción (UT) kappa de T125 A2 y la UT H mutada (F68). El control de la presencia de la mutación se ha realizado por secuenciación sobre cuatro clones.

35 El vector de expresión final HK463-18 (véase el mapa de la figura 7), que contiene las dos unidades de transcripción (UT) H mutada (F68) y Kappa del anticuerpo anti-D T125-A2, se ha construido por clonación del vector de cadena ligera K416-23 (que contiene las UT Kappa y DHFR) en el vector de cadena pesada optimizado H416-30 (que codifica la cadena pesada portadora de la mutación C68F a nivel de su región VH). Estos dos vectores de expresión se utilizan ya para las co-transfecciones en la línea YB2/0.

### **Ejemplo 3: Caracterización funcional del anticuerpo mutado**

En este estudio, se evaluó el impacto de la mutación C68F sobre la actividad funcional del anticuerpo anti-D T125.

40 Se extrae sangre de donantes voluntarios en tubos citrato de 7 ml suministrados por el Etablissement Français du Sang (EFS) de Rungis

- Hematíes Rhesus D negativos (grupos ABO indiferentes)

- Hematíes Rhesus D positivos grupo O R1R1 (densidad antigénica óptima)

#### **3.1 Estudio de las funciones ligadas específicamente a la parte Fab**

Estudio de la especificidad de reconocimiento del epítipo D

45 No se ha observado ninguna fijación de los anticuerpos anti-D no mutado (C68) y mutado (F68) sobre los hematíes de donantes Rhesus negativos en comparación con un control correspondiente a la autofluorescencia no específica

en las condiciones de realización de la dosificación. Esto confirma la especificidad de reconocimiento del epítipo D de estos dos anticuerpos.

Medida de la actividad específica del anti-D por citometría

5 Las actividades específicas de los dos anticuerpos no mutado (C68) y mutado (F68) son idénticas (con un intervalo de confianza de 15%). La funcionalidad del dominio Fab es comparable para los dos anticuerpos ensayados.

Estudio de competición in vitro por citometría entre los hematíes 0+ R1R1 saturados y no saturados por los anticuerpos anti-D

10 En las condiciones experimentales de competición, se puede concluir que las constantes de disociación obtenidas para los tres anticuerpos ensayados son equivalentes. Por lo tanto, no hay impacto de la mutación C68F sobre la constante de disociación.

Conclusión

Según estos resultados, la especificidad de reconocimiento antigénico y la actividad específica anti-D son idénticas para los dos anticuerpos anti-D no mutado (C68) y mutado (F68). La funcionalidad del dominio Fab (sitio de reconocimiento del antígeno en el anticuerpo) no parece, por lo tanto, modificada por la mutación C68F.

15 3.2 Ensayos funcionales in vitro de las partes Fc y Fab del anti-D

Los anticuerpos anti-D no mutado (C68) y mutado (F68) se han evaluado en dos ensayos que miden la fijación de los anticuerpos anti-D al antígeno y la implicación de su parte Fc con CD16 (receptor FcγRIII).

Actividad ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo)

20 No hay diferencias importantes entre la actividad ADCC de los anticuerpos no mutados (C68) respecto a la de los anticuerpos mutados (F68), situándose el porcentaje de lisis obtenido para todos estos anticuerpos entre la actividad del anticuerpo R297 y la del anticuerpo policlonal WinRho. Se ha requerido una modelización de las curvas con el programa informático PRISM para comparar más precisamente la actividad de los anticuerpos.

25 Los valores obtenidos de Emax (concentración de anticuerpo correspondiente a la actividad máxima) son respectivamente de 46 +/- 7 ng/ml y de 48 +/- 2 ng/ml para los anticuerpos no mutados (C68) y mutados (F68). Las CE50 (concentración de anticuerpo requerida para obtener 50% de la actividad máxima) son respectivamente de 20 +/- 3 ng/ml y de 21 +/- 2 ng/ml para los anticuerpos no mutados (C68) y mutados (F68).

La modelización de las curvas y la expresión de los valores de Emax y de CE50 indican que la mutación C68F no tiene efecto sobre la actividad ADCC de los anticuerpos.

Activación de CD16

30 Los porcentajes de activación de CD16 obtenidos son respectivamente de 104 +/- 7% y 100 +/- 16% para los anticuerpos no mutados (C68) y mutados (F68).

Conclusión

Según estos resultados, la actividad ADCC y la activación de CD16 no se modifican por la mutación C68F.

35 Los resultados de los diferentes ensayos realizados muestran que las funciones del anticuerpo anti-D T125 A2 soportadas por las partes Fab (especificidad, actividad específica, disociación) y Fc (ADCC, activación de CD16) no se modifican por la mutación C68F.

#### **Ejemplo 4: Estudio estructural comparativo de los clones no mutados y mutados**

Los glicanos de los anticuerpos anti-D no mutados (C68) y mutados (F68) se han analizado por HPCE-LIF.

40 Los resultados de los diferentes mapas glicánicos de los anticuerpos anti-D no mutados (C68) y mutados (F68) muestran perfiles comparables con las formas biantenadas no sialiladas agalactosiladas fucosiladas o no (G0F, G0) y monogalactosiladas fucosiladas o no (G1F, G1). Las formas mayoritarias son siempre de tipo agalactosiladas (G0). Se observan diferencias en la tasa de las formas fucosiladas que parece más baja para los anticuerpos anti-D mutados (F68). Estos últimos presentan igualmente estructuras que poseen una N-acetilglucosamina (GlcNAc) en posición bisectriz, es decir, entre las dos antenas. Estas estructuras GlcNAc en posición bisectriz están ausentes  
45 sobre los anticuerpos anti-D no mutados (C68).

Estas diferencias de estructura a nivel de las tasas de fucosa y de GlcNAc en posición bisectriz no afectan la actividad ADCC ni la activación de CD16. La diferencia de perfil de glicosilación no está probablemente ligada a la mutación. En efecto, los estudios realizados sobre diferentes anticuerpos monoclonales producidos en la línea YB2/0

han mostrado perfiles de glicosilación muy variables en función de los clones estudiados pero también en función del tiempo de cultivo sobre un mismo clon.

5 La mutación de la Cisteína por una Fenilalanina en posición 68 (C68F) de la región variable de la cadena pesada del clon T125 A2 se realizó por PCR. La secuencia de la región variable de la cadena pesada, portadora de la mutación puntual G a T, se ha amplificado a partir del plásmido T125-Phe68 y se clonó en un vector de cadena pesada optimizado H416-30. Al final, se ha construido un vector de expresión único HK463-18 a partir del vector de cadena pesada H416-30 y del vector de cadena ligera K416-23. La presencia de la mutación se verificó por secuenciación en calidad FDA. El anticuerpo mutado F68 obtenido de este vector único puede producirse, por lo tanto, en la línea YB2/0.

10 Los resultados del análisis funcional han permitido mostrar que la especificidad de reconocimiento del antígeno, la actividad específica anti-D y la constante de disociación no se modifican por la mutación C68F. Además, la actividad ADCC y la capacidad de activación de CD16 no se ven afectadas.

15 Se han observado diferencias estructurales entre los clones no mutados (C68) y mutados (F68). La tasa de fucosilación es más baja y una N-acetilglucosamina (GlcNAc) está presente en posición bisectriz para los clones mutados (F68). Esta diferencia del perfil de glicosilación no modifica las funcionalidades del anticuerpo y probablemente no está ligada a la mutación C68F.

En conclusión, el anticuerpo anti-D de la invención que posee la mutación C68F presenta una funcionalidad comparable al anticuerpo R297 del clon T125 A2.

#### Ejemplo 5: Formulaciones del anticuerpo

20 Se han preparado las formulaciones siguientes.

Tabla 1. Formulación del anticuerpo con Tween® 80:

Ingrediente	Concentración
Anticuerpo de la invención	0,3 g/L
Tampón citrato	30 mM
Manitol	17 g/L
NaCl	3,25 g/L
Polisorbato 80 (Tween® 80)	400 ppm

pH= 6,5

Tabla 2. Formulación del anticuerpo con Lutrol® F 68:

Ingrediente	Concentración
Anticuerpo de la invención	0,3 g/L
Tampón citrato	30 mM
Manitol	17 g/L
NaCl	3,25 g/L
Poloxámero 188 (Lutrol® F 68)	301 ppm

pH= 6,5

25 Se ha llevado a cabo un estudio de la estabilidad de las formulaciones durante varios meses. El estudio ha incluido la inspección visual regular de los matraces que contienen la formulación (para verificar el color, la opalescencia y la formación eventual de partículas), la verificación del pH, de la osmolalidad, la verificación de una degradación del anticuerpo (por SDS PAGE en condiciones reductoras o no reductoras), la verificación de la agregación eventual de los anticuerpos. También se han realizado ensayos de pureza por IEF (isoelectroenfoque) y HPSEC (cromatografía por exclusión de tamaño de alta resolución). El estado oxidativo se ha investigado por RP-HPLC.

30

Las formulaciones son estables después de 12 meses a 5°C, y hasta al menos 4 meses a 25°C.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> LFB Biotechnologies
- 5 <120> Anticuerpo monoclonal anti-Rhesus D
- <130> B849
- <160> 11
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 1425
- <212> ADN
- 15 <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- <222> (58)..(1425)
- 20 <400> 1

```

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgt      57

cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg      105
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10

tcc ctg aga ctc tcc tgt aca gcc tct gga ttc acc ttc aaa aac tat      153
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Asn Tyr
20          25          30

gct atg cat tgg gtc cgc cag gct cca gcc aag ggg ctg gag tgg gtg      201
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Ala Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

gca act ata tca tat gat gga agg aat ata caa tat gca gac tcc gtg      249
Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Ile Gln Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

aag ggc cga ttc acc ttc tcc aga gac aat tct cag gac acc ctg tat      297
Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asp Thr Leu Tyr
65          70          75

ctg caa ctg aac agc ctc aga ccg gag gac acg gct gtg tat tac tgt      345
Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95

gcg aga ccc gta aga agc cga tgg ctg caa tta ggt ctt gaa gat gct      393
Ala Arg Pro Val Arg Ser Arg Trp Leu Gln Leu Gly Leu Glu Asp Ala
100         105         110

ttt cat atc tgg ggc cag ggg aca atg gtc acc gtc tct tca gcc tcc      441
Phe His Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115        120        125

acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc      489
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130        135        140
    
```

ES 2 533 528 T3

tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc	537
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro	
145 150 155 160	
gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg	585
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val	
165 170 175	
cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc	633
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser	
180 185 190	
agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc	681
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile	
195 200 205	
tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt	729
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val	
210 215 220	
gag ccc aaa tot tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	777
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
225 230 235 240	
cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	825
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
245 250 255	
aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	873
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
260 265 270	
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	921
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
275 280 285	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag	969
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
290 295 300	
tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag	1017
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
305 310 315 320	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	1065
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
325 330 335	
ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	1113
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
340 345 350	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc	1161
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr	
355 360 365	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	1209
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
370 375 380	

ES 2 533 528 T3

gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac 1257  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 385 390 395 400

aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac 1305  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 405 410 415

agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc 1353  
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 420 425 430

tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag 1401  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 435 440 445

agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 1425  
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455

<210> 2  
 <211> 456  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

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

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Ala Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Ile Gln Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asp Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Val Arg Ser Arg Trp Leu Gln Leu Gly Leu Glu Asp Ala  
 100 105 110

Phe His Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 115 120 125

10

ES 2 533 528 T3

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

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
 145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
 180 185 190

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
 210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr  
 355 360 365

ES 2 533 528 T3

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 370 375 380

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

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455

<210> 3  
 <211> 708  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (67) .. (708)

<400> 3  
 atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60

agatgt gcc atc cgg atg acc cag tct cca tcc tca ttc tct gca tct 108  
 Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Phe Ser Ala Ser  
 1 5 10

aca gga gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agc cag gat att cgg 156  
 Thr Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg  
 15 20 25 30

aac tat gta gcc tgg tat cag caa aaa tca ggg aaa gcc cct aaa ttc 204  
 Asn Tyr Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Phe  
 35 40 45

ctg atc tat gct gct tcc act ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc 252  
 Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 50 55 60

agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc aac tcc ctg 300  
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu  
 65 70 75

cag tct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa caa tat tac aat tct 348  
 ln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Ser

ES 2 533 528 T3

cct ccg acc ttc ggc caa ggg acc agg gtg gaa atc acg cga act gtg 396  
 Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Thr Arg Thr Val  
 95 100 105 110

gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa 444  
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys  
 115 120 125

tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga 492  
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg  
 130 135 140

gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac 540  
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn  
 145 150 155

tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc 588  
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser  
 160 165 170

ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa 636  
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
 175 180 185 190

gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca 684  
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
 195 200 205

aag agc ttc aac agg gga gag tgt 708  
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 4  
 5 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Phe Ser Ala Ser Thr Gly  
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile  
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ser  
 5 70 75 80

10

ES 2 533 528 T3

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Thr Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

5 <210> 5  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Cys Thr Phe Ser Arg  
1 5 10 15

<210> 6  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6

10 Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys  
1 5 10

15 <210> 7  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

ES 2 533 528 T3

<400> 7  
**Cys Thr Phe Ser Arg**  
**1 5**

5 <210> 8  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8  
**Asp Asn Ser Gln Asp Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Pro**  
**1 5 10 15**

10 **Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Cys Thr Phe Ser Arg**  
**20 25 30**

<210> 9  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 9  
**Asp Asn Ser Gln Asp Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Pro**  
**1 5 10 15**

**Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg**  
**20 25**

20 <210> 10  
 <211> 64  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador

25 <400> 10  
**ctatatcata tgatggaagg aatatacaat atgcagactc cgtgaagggc cgattcacct 60**

**tctc 64**

30 <210> 11  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

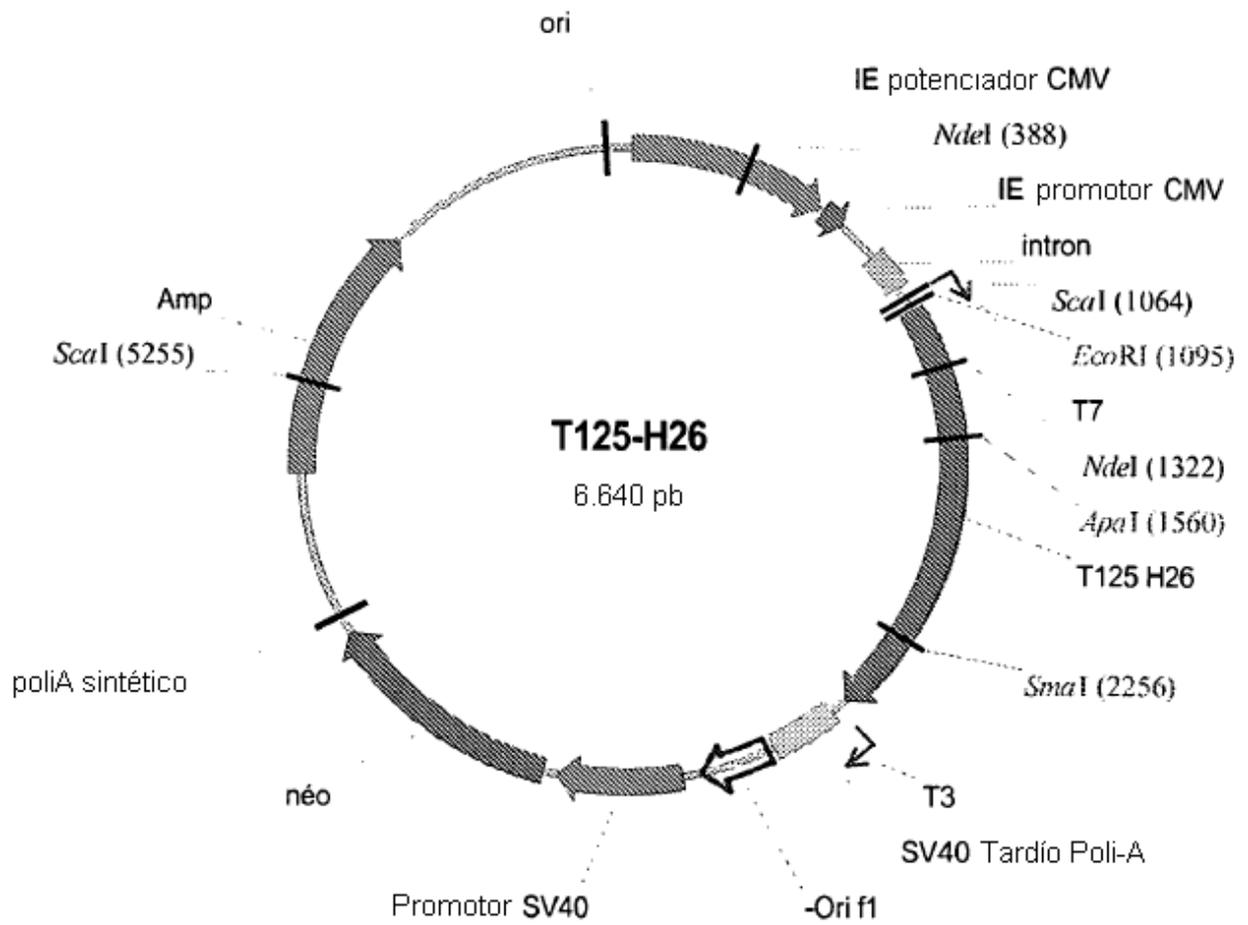
<220>  
 <223> cebador

35 <400> 11  
**ggaagtagtc cttgaccagg cag 23**

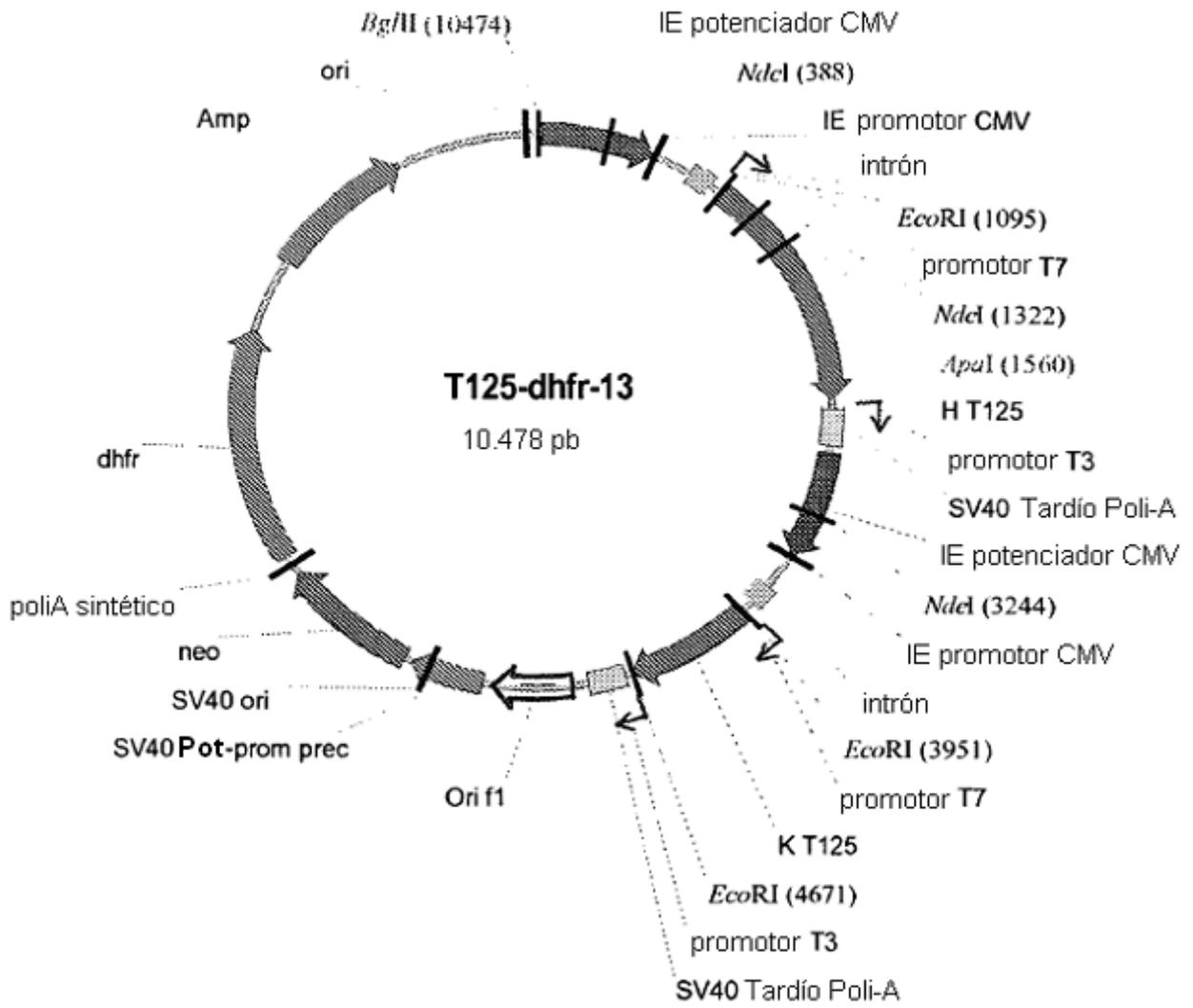
40

**REIVINDICACIONES**

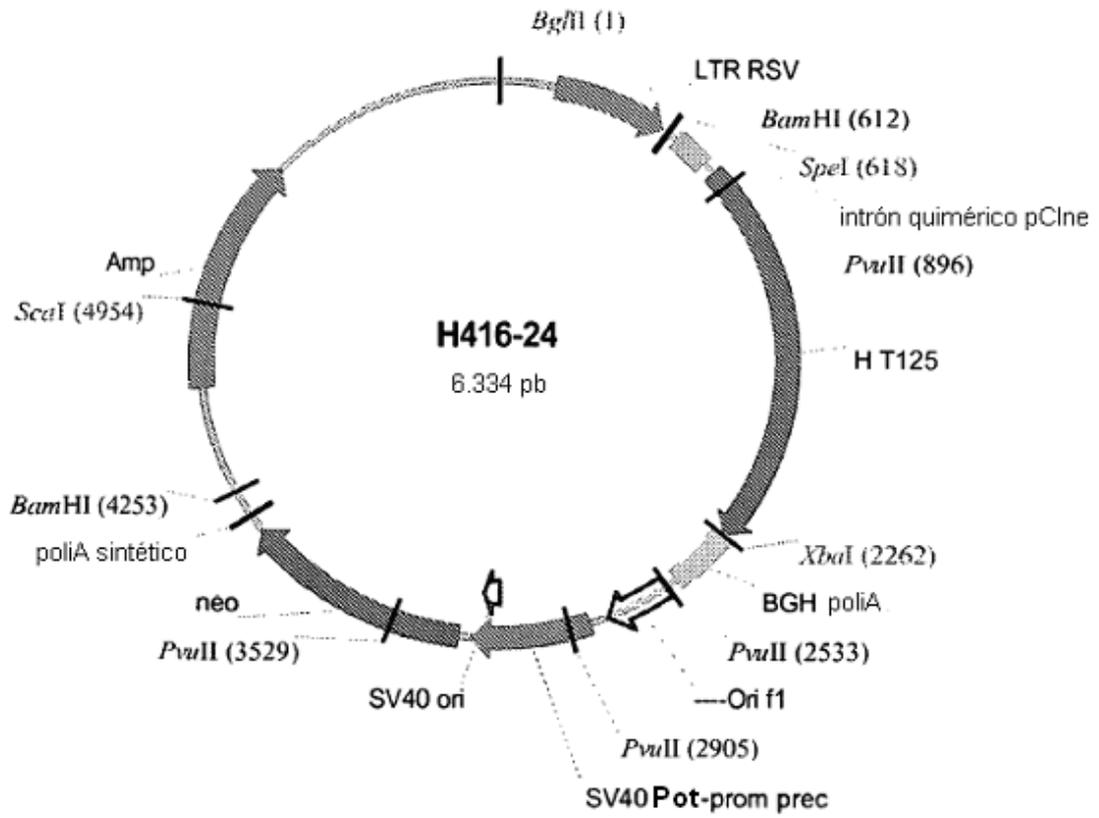
1. Anticuerpo monoclonal anti-RhD, que es una inmunoglobulina IgG1 tetramérica compuesta por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, comprendiendo la cadena pesada la secuencia de aminoácidos SEQ IN N°2, y comprendiendo la cadena ligera la secuencia de aminoácidos SEQ IN N°4.
- 5 2. Procedimiento de producción de un anticuerpo de la reivindicación 1, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes: a) el cultivo en un medio y condiciones de cultivo apropiadas de una célula huésped que expresa una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia SEQ ID N°2, y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia SEQ ID N°4; y b) la recuperación de dichos anticuerpos así producidos a partir del medio de cultivo o de dichas células cultivadas.
- 10 3. Anticuerpo de la reivindicación 1, a título de medicamento.
4. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1, en asociación con excipientes farmacéuticamente aceptables.
5. Composición según la reivindicación 4, que comprende un tampón citrato.
6. Composición según la reivindicación 4 ó 5, que comprende un tensioactivo no iónico.
- 15 7. Composición según una de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende un tampón citrato 30 mM, pH 6,5, polisorbato 80 o un poloxámero, manitol y NaCl.
8. Composición según la reivindicación 7, que comprende un tampón citrato 30 mM, pH 6,5, 400 ppm de polisorbato 80, 17 g/L de manitol y 3,25 g/L de NaCl.
- 20 9. Composición según la reivindicación 7, que comprende un tampón citrato 30 mM, pH 6,5, 301 ppm de poloxámero 188, 17 g/L de manitol y 3,25 g/L de NaCl.
10. Composición según una de las reivindicaciones 7 a 9, en la que la concentración de anticuerpo es de 0,3 g/L.
11. Anticuerpo de la reivindicación 1, para una utilización para la prevención de una alo-inmunización Rhesus de individuos Rhesus negativos.
- 25 12. Anticuerpo para una utilización según la reivindicación 11, para la prevención de una enfermedad hemolítica en el recién nacido, por administración a una mujer RhD negativa.
13. Anticuerpo según la reivindicación 1, para una utilización en la prevención o el tratamiento de una Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI).



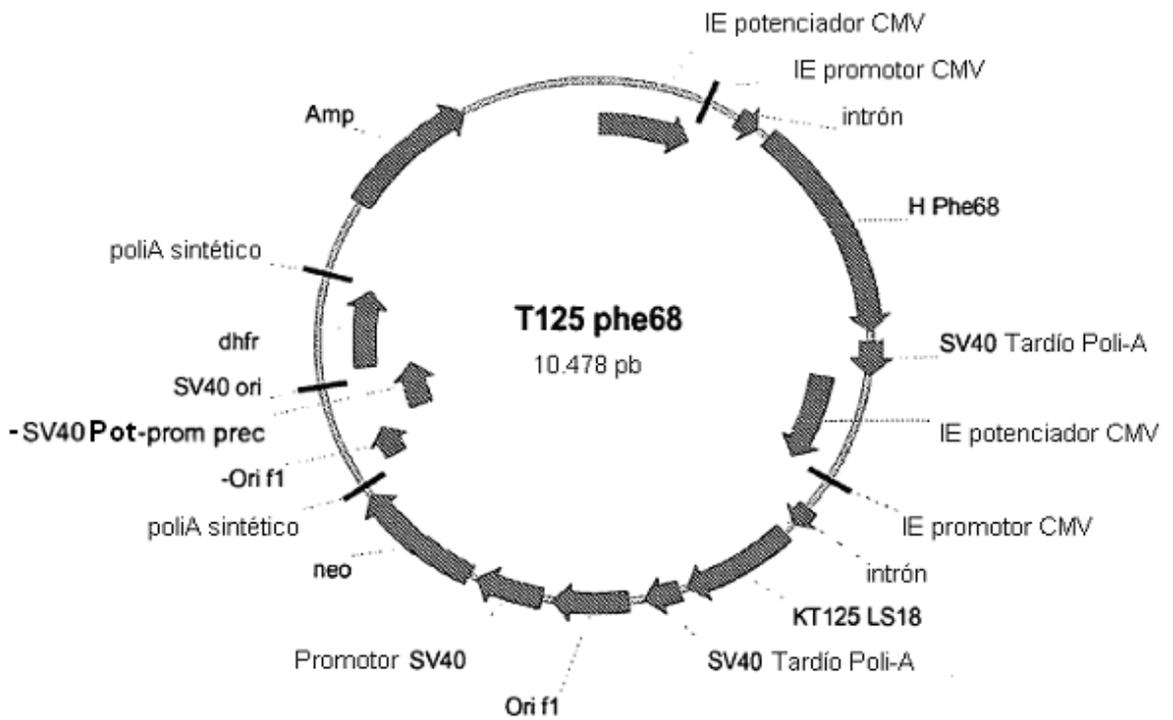
**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**

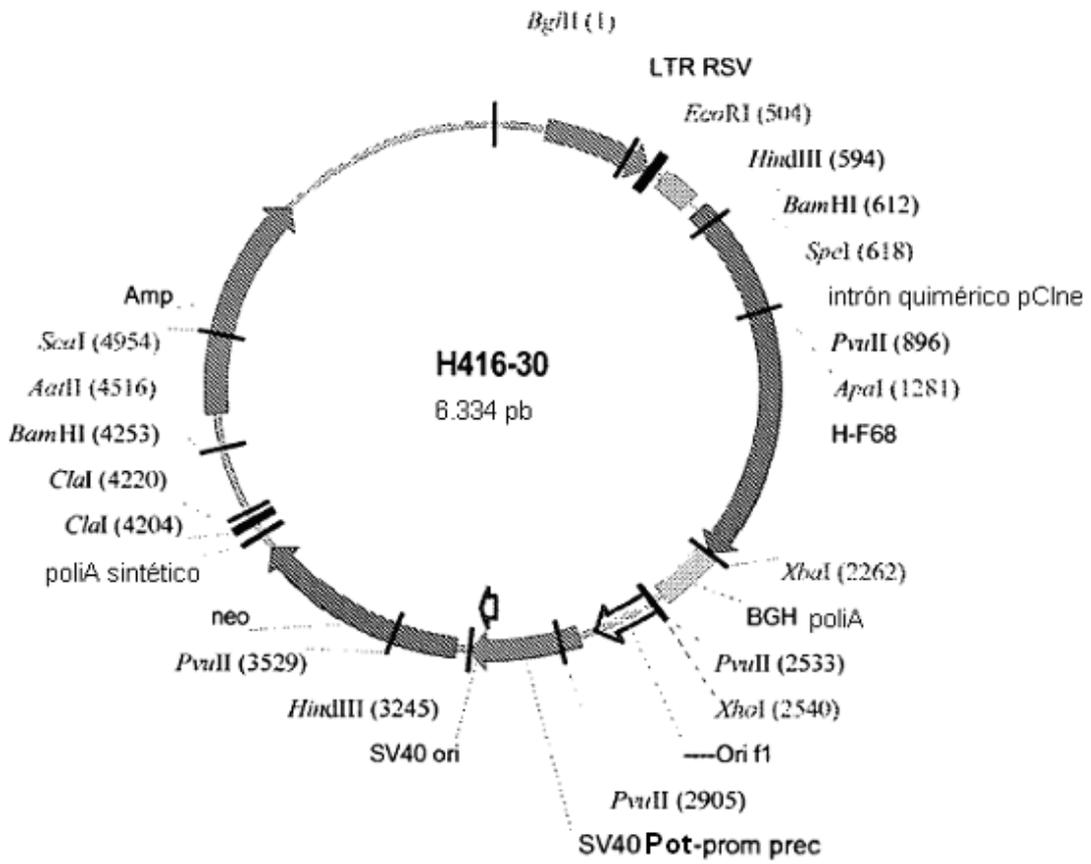


FIGURA 5

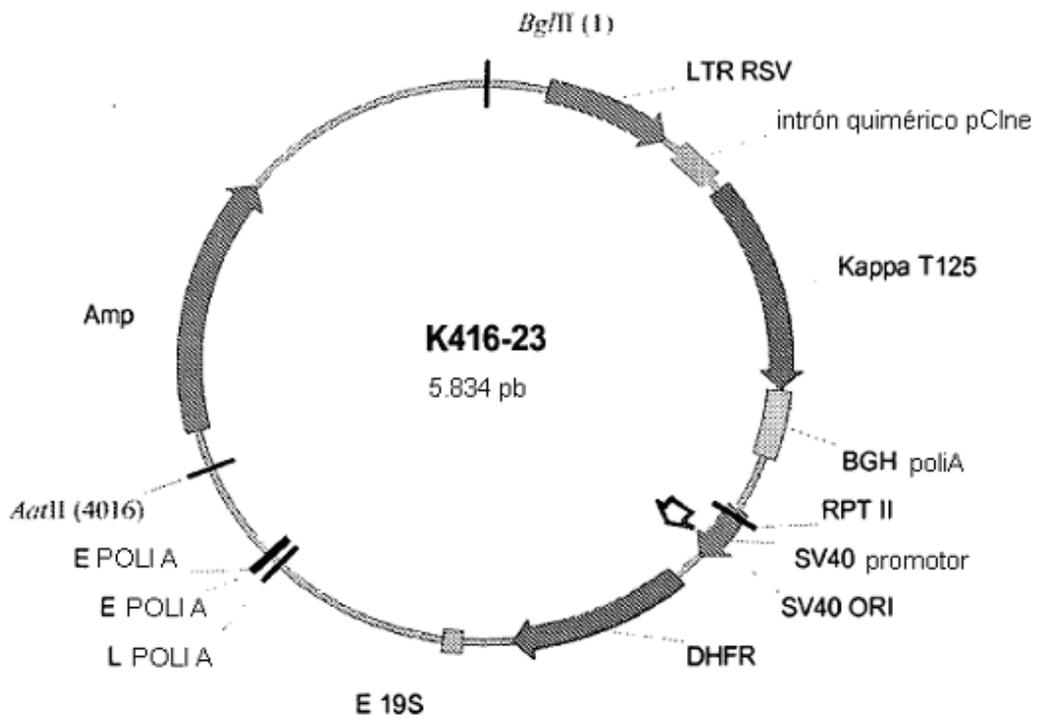


FIGURA 6

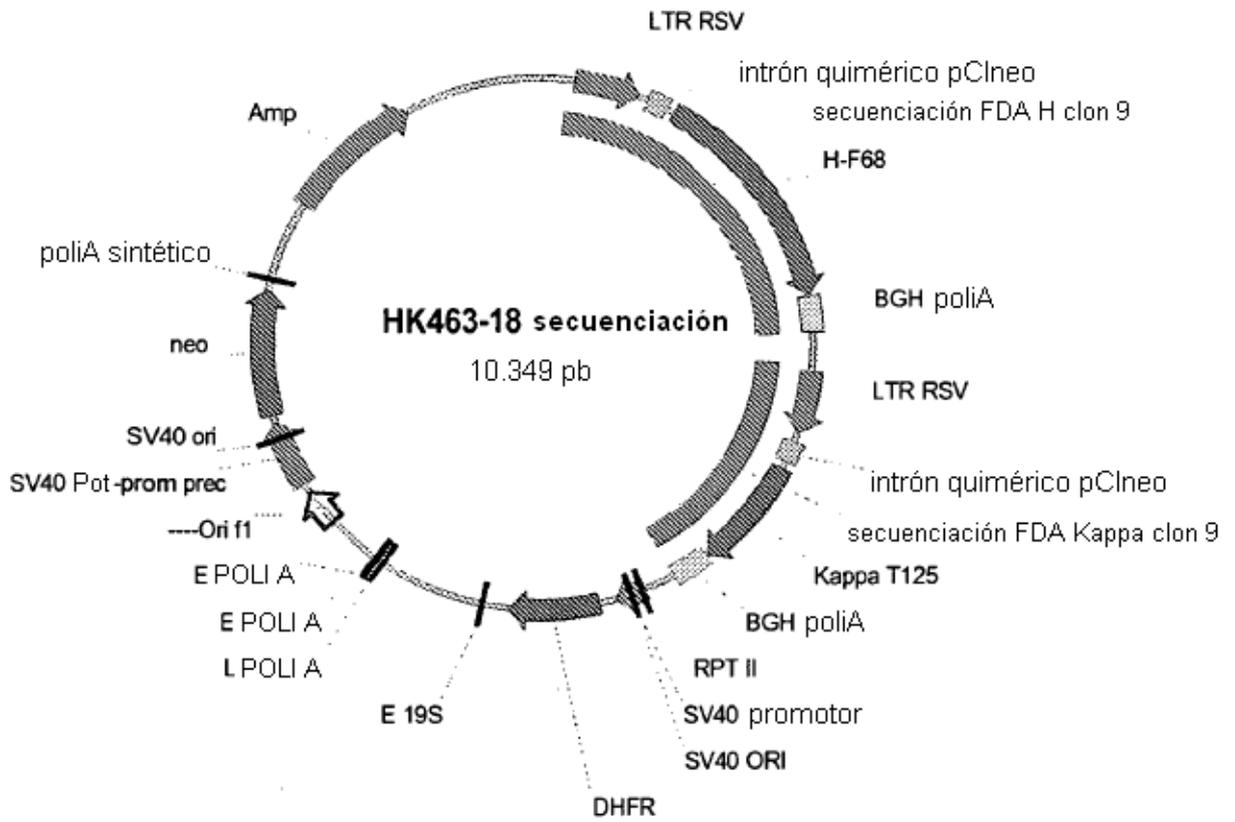
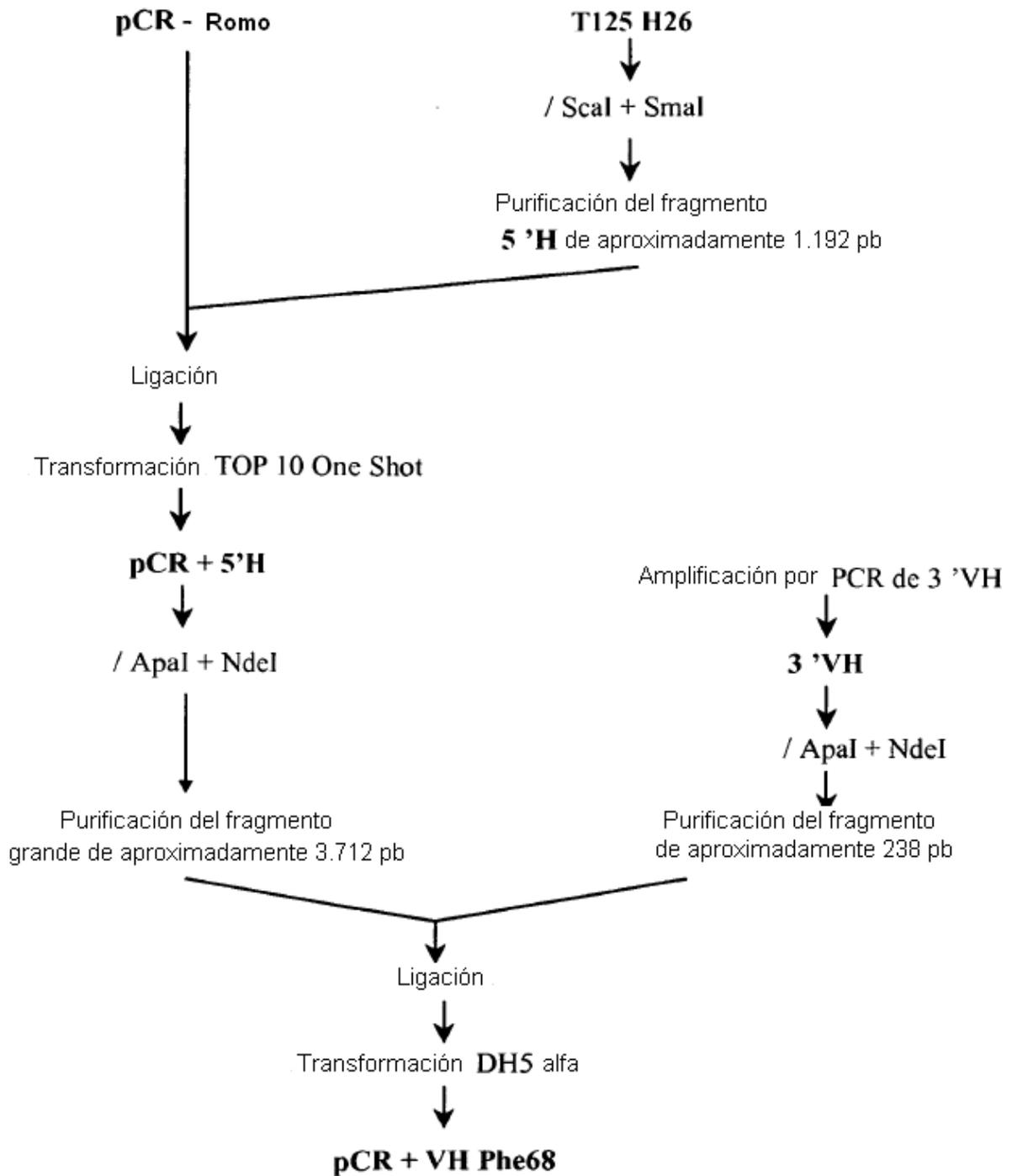


FIGURA 7



**FIGURA 8**

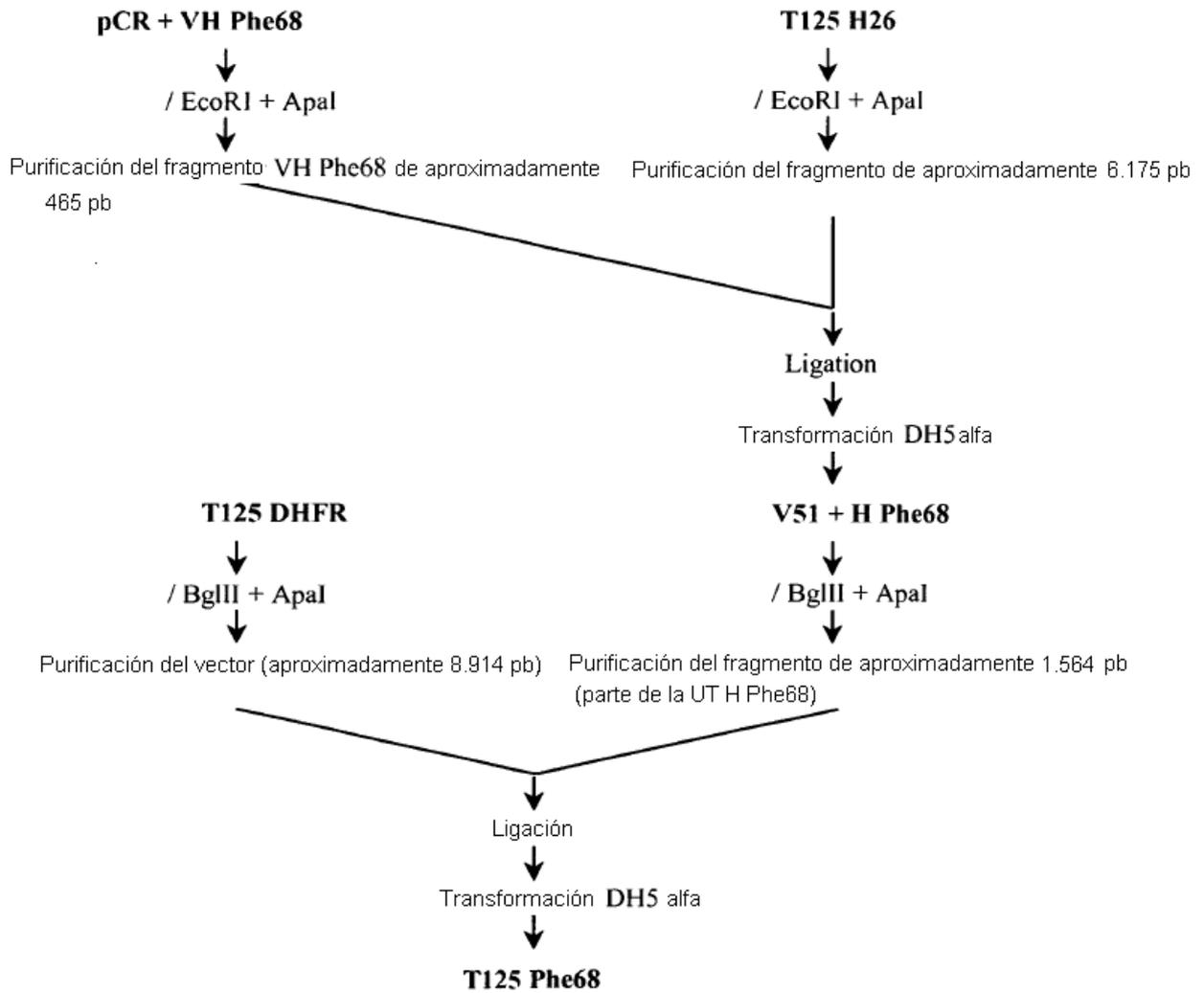


FIGURA 8 (continuación)