

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 511**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2008 E 08839670 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2205630**

54 Título: **Anticuerpo frente a las toxinas del ántrax**

30 Prioridad:

26.09.2007 FR 0706744

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

28.09.2016

73 Titular/es:

**ETAT FRANÇAIS REPRÉSENTÉ PAR LE
DÉLÉGUÉ GÉNÉRAL POUR L' ARMEMENT
(100.0%)**

**"La Rotonde", 26, boulevard Victor
00457 Armées, FR**

72 Inventor/es:

THULLIER, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 584 511 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 frente a las toxinas del ántrax

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a anticuerpos frente a las toxinas del ántrax. En particular, la presente invención tiene como objeto un anticuerpo anti PA, dirigido frente a la subunidad PA de toxinas letal y edematosa del ántrax, modificada para presentar una afinidad y una tolerancia mejoradas.

10

Estado de la técnica

El ántrax es una enfermedad causada por un bacilo Gram-positivo, *Bacillus anthracis*. Esta bacteria no es móvil y forma esporas cuando se coloca en un entorno desfavorable para su supervivencia. Las esporas pueden sobrevivir 15 24 horas en el aire y aproximadamente 100 años en el suelo, y poseen propiedades de resistencia al calor o a los agentes desinfectantes.

Una infección por ántrax puede tomar tres formas: cutánea, pulmonar o digestiva. La infección pulmonar lo más frecuentemente es mortal. En caso de inhalación, las esporas de *B. anthracis* pasan a través de los alvéolos en los que son fagocitadas por los macrófagos y las células dendríticas, en particular. Las esporas germinan en estas células y las formas vegetativas se multiplican en los ganglios linfáticos. Las bacterias pasan entonces a la sangre, se reproducen de forma continua y producen toxinas responsables, en parte, de la letalidad de la enfermedad. Las toxinas del ántrax se componen de tres proteínas distintas: antígeno protector (PA, 83 kDa antes de escisión enzimática intracelular y 63 kDa después de la escisión), factor letal (LF, 90 kDa) y factor de edema (FE, 89 kDa). La toxina letal está formada por PA y LF; y la toxina edematosa, cuyo papel en la fisiología de la enfermedad es menor, de PA y EF. Estas proteínas son secretadas por la bacteria como monómeros no tóxicos, y se reúnen en la superficie de las células diana para formar complejos tóxicos. Hasta ahora, varios antibióticos, tales como penicilina, doxiciclina y las fluoroquinolonas, se han usado para el tratamiento de infecciones por el ántrax. Sin embargo, algunos de estos antibióticos pueden no tener efecto en algunas cepas resistentes a los antibióticos. En particular, algunos de estos tratamientos no se pueden usar en casos de terrorismo o de guerra bacteriológica, cuando las cepas resistentes a los antibióticos podrían extenderse de forma deliberada. Además, como los antibióticos no pueden inhibir la acción de la toxina del ántrax, es necesario que estos antibióticos se administren en los primeros estadios de la infección, o los diagnósticos precoces son difíciles de establecer debido a que los síntomas iniciales no son específicos.

35

Se han desarrollado algunas vacunas, cuyo componente principal es el antígeno protector PA, pero solamente se usa para personas muy susceptibles al contacto con *B. anthracis*. Además, debido a la necesidad de un periodo de varios meses para adquirir una inmunidad suficiente, estas vacunas no se pueden usar en situaciones de emergencia. En Francia en la actualidad, ninguna de estas vacunas está actualmente aprobada para uso humano. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos enfoques terapéuticos y preventivos, distintos de los antibióticos. La inmunización pasiva con anticuerpos representa una estrategia efectiva para neutralizar la toxina. Se han hecho varios ensayos para neutralizar la toxina letal del ántrax usando anticuerpos monoclonales frente al antígeno protector (PA) y el factor letal (LF). La neutralización de la toxina letal del ántrax usando un anticuerpo se puede realizar por inhibición de la unión de PA y su receptor celular, inhibición de la escisión de PA, inhibición de la unión entre PA y LF o incluso la inhibición de la acción de LF por ejemplo.

45

La solicitud WO2007/084107 describe anticuerpos que neutralizan la toxina PA.

El desarrollo de los anticuerpos que permitan neutralizar la toxina del ántrax también es de interés general para una prevención y un tratamiento eficaz del ántrax. En un trabajo reciente, los inventores inmunizaron un macaco con el antígeno protector PA83 para obtener anticuerpos destinados a tratar la infección humana por el ántrax. A partir de la médula ósea, los inventores amplificaron los genes que codifican fragmentos de anticuerpos específicos de PA83 y los clonaron para obtener una biblioteca. Un fragmento de alta afinidad ($K_d = 3,4 \text{ nM}$) y fuertemente neutralizante (concentración de inhibición a un 50 % = $5,6 \pm 0,13 \text{ nM}$), denominado 35PA83, se aisló a continuación (Laffly *et al.*, antimicrobial agents and chemotherapy, 2005, 49 (8): 3414-3420). Los inventores demostraron que el fragmento de inmunoglobulina 35PA83 neutraliza la toxina del ántrax impidiendo la interacción de PA con su receptor celular.

55

Los inventores investigaron a continuación cómo modificar este fragmento de inmunoglobulina para mejorar las cualidades con el objetivo de un uso médico (profiláctico o terapéutico), mejorando su afinidad y su tolerancia para el ser humano. Mejorar la afinidad de este fragmento de inmunoglobulina presenta la ventaja de usar una cantidad de inmunoglobulina menor para obtener una actividad biológica suficiente y permitir también la reducción del coste del tratamiento. La mejora de la tolerancia en el ser humano presenta la ventaja de evitar respuestas inmunitarias dirigidas frente a este fragmento de anticuerpo. La presente invención tiene por lo tanto como objeto proporcionar un anticuerpo anti PA modificado a partir del fragmento de inmunoglobulina 35PA83.

65

Objeto de la invención

La presente invención también tiene como objeto una composición que comprende dicho anticuerpo modificado así como una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo modificado. La presente invención también tiene como objeto el uso de dicho anticuerpo modificado para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento o a la prevención de una infección por el ántrax.

La presente invención también se refiere a un método de detección de la toxina del ántrax usando dicho anticuerpo modificado.

La presente invención se comprenderá mejor con la ayuda de las definiciones siguientes.

El término « anticuerpo » se refiere a una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de una molécula de inmunoglobulina que tiene la capacidad de unirse de forma específica a un antígeno en particular. Algunos fragmentos de inmunoglobulina bien conocidos son por ejemplo los fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv, scFv y Fd.

El término « ántrax » se refiere a cualquier enfermedad causada, directa o indirectamente, por una infección por *Bacillus anthracis*. Los síntomas iniciales de una infección por inhalación se parecen a los de un resfriado (fiebre, dolores musculares ...). Después de varios días, estos síntomas evolucionan hacia problemas graves de estrés respiratorio y choque séptico. La inhalación del ántrax en general es mortal. La infección cutánea por el ántrax produce cuando la bacteria entra en la piel a nivel de una grieta cutánea este ente previamente. Esta infección da como resultado en un primer tiempo una pápula, que se desarrolla 2-3 días en una vesícula y a continuación en una úlcera de 1-3 centímetros de diámetro que presenta 1 a anecdótica en la parte central. La infección gastrointestinal por el ántrax se desarrolla después del consumo de carne contaminada y se caracteriza por una inflamación aguda del tracto intestinal.

El término « aislado » se refiere a « amplificado *in vitro* por PCR », « producido de forma recombinante por clonación », « purificado por separación sobre gel o por escisión », o incluso « sintetizado por ejemplo por síntesis química ».

El término « vector » se refiere a un ácido nucleico en el que la secuencia de interés se puede insertar por restricción y a continuación ligación para el transporte entre diferentes entornos genéticos o para su expresión en una célula hospedadora. Los vectores son, por ejemplo, los plásmidos, los cósmidos, los cromosomas artificiales de levaduras (YAC), los cromosomas artificiales de bacterias (BAC) y los cromosomas artificiales derivados del bacteriófago P1 (PAC), los vectores derivados de virus. Un vector de clonación es un vector capaz de replicarse en una célula hospedadora y que además se caracteriza por la presencia de uno o varios sitios de restricción por endonucleasas. Un vector de expresión es un vector en el que la secuencia de ADN de interés se puede insertar por restricción o ligación de modo tal que se pueda replicar y/o transcribir en ARN. Los vectores pueden contener además uno o varios marcadores de selección o de identificación de células que se hayan transformado o transfectados con el vector.

La expresión « anticuerpo humanizado » se refiere a anticuerpos de origen animal en los que los componentes humanos se han sustituido por ciertos componentes originales.

La expresión « prevención de una enfermedad » corresponde a la prevención de la aparición de esta enfermedad en un sujeto, en particular un ser humano, en el que la enfermedad todavía no se ha declarado.

La expresión « tratamiento de una enfermedad » corresponde la inhibición de esta enfermedad, es decir, la parada de su desarrollo, su regresión, o a la desaparición de los síntomas y consecuencias de la enfermedad, o incluso la desaparición de las causas de la enfermedad.

La expresión « cantidad terapéuticamente eficaz » se refiere la cantidad que es suficiente para realizar el tratamiento cuando se administra a un sujeto que necesita un tratamiento de este tipo. La cantidad terapéutica eficaz depende del sujeto, del estadio de la enfermedad a tratar y del modo de administración, y se puede determinar día de operaciones de rutina por el experto en la materia.

Como se sabe bien, sólo una parte del anticuerpo, la región variable, está implicado en la unión del anticuerpo a su epítipo. Las regiones constantes del anticuerpo activan los efectores inmunitarios, fagocitos o células asesinas, y el complemento; estas regiones constantes no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo cuya región constante (Fc) se ha escindido de forma enzimática con el fin de conservar la región bisagra se denomina fragmento F(ab')₂ y conservar los dos sitios de unión al antígeno.

Además, un anticuerpo cuya región constante, que comprende la región bisagra que se ha escindido de forma enzimática, o que se ha producido sin esta región, se denomina fragmento Fab y conserva uno de los dos sitios de unión al antígeno. Los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera que está unida de manera covalente a una parte de la cadena pesada denominada Fd.

En la región variable, se encuentran las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, complementary determining regions), también denominadas regiones hipervariables, que interactúan directamente con el antígeno. Por lo tanto, la modificación de las CDR puede permitir modificar la afinidad de un anticuerpo. En la región variable, se encuentra un segundo tipo de regiones, denominadas regiones marco (FR, frameworks), que mantienen la estructura terciaria de las CDR. Estas regiones marco son bastante específicas de la especie en la que se ha producido el anticuerpo. En el fragmento Fd de la cadena pesada y en la cadena ligera, se encuentran cuatro regiones marco (FR1 a 4) separadas respectivamente por tres CDR (CDR1 a 3).

La presente invención tiene como objeto un anticuerpo anti PA que comprende:

- una parte Fc de origen humano, y:
 - o bien la región variable de cadena pesada de secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N° 1 mutada en las posiciones siguientes: H/L (55) y S/G (74), y la región variable de cadena ligera de secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N° 2 mutada en la posición siguiente: Q/L (68),
 - o bien la región variable de cadena pesada de secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N° 1 mutada en las posiciones siguientes: G/S (31A), R/K (66) y K/R (73), y la región variable de cadena ligera de secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N° 2, siendo las posiciones de los aminoácidos las indicadas en la figura 1, y que presentan una afinidad superior a la del anticuerpo no mutado.

La secuencia peptídica SEQ ID N° 3, que corresponde al fragmento Fd del anticuerpo 35PA83, descrita en Laffly *et al.*, es accesible en los bancos informáticos, tales como Genbank, con el número CAH17920 y la secuencia peptídica SEQ ID N° 4, que corresponde a la cadena ligera del anticuerpo 35PA83 es accesible de la misma manera con el número CAH17921.

Las regiones variables de esta secuencia se presentan en forma de esquema bidimensional en la figura 1.

Las secuencias de ADN que codifican el fragmento Fd y la cadena ligera del anticuerpo 35PA83, denominadas en el presente documento SEQ ID N° 5 y SEQ ID N° 6, también son accesibles en los bancos informáticos, con los números AJ810486 y AJ810487, respectivamente.

La afinidad K_D de un anticuerpo se puede medir con las técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia.

El anticuerpo no modificado (es decir, no mutado) precursor 35PA83 presenta una afinidad K_D iguala $3,4 \cdot 10^{-9}$. Esta constante de afinidad se calculó a partir de constantes de asociación y de disociación medidas en tiempo real por resonancia de plasmones superficiales tal como se ha explicado en los ejemplos.

La mutación G/S (31A) en la región variable de la cadena pesada se refiere a que el aminoácido G en la posición 31A (véase la figura 1 para las posiciones de los aminoácidos) sustituyo con el aminoácido S.

Este anticuerpo anti PA modificado por las mutaciones mencionadas anteriormente en la región variable de la cadena pesada y en la región variable de la cadena ligera presenta una afinidad hacia PA mejorada con respecto a la del anticuerpo 35PA83.

De acuerdo con un modo de la invención, la parte Fc del anticuerpo se puede decir para producir IgA, IgM o IgG.

De acuerdo con la invención, el anticuerpo anti PA modificado de acuerdo con la invención posee una parte Fc de origen humano. Los anticuerpos completos de este tipo son preferentes para la administración en el ser humano ya que presentan una semivida más larga que los fragmentos de anticuerpos tales como los Fab, y están más adaptados para una administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, cutánea o transdérmica.

A partir de la descripción mencionada anteriormente, algunas secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera de los anticuerpos anti PA modificados de acuerdo con la invención, el experto en la materia es capaz de sintetizar, o de hacer sintetizar, ácidos nucleicos que codifican estas secuencias de aminoácidos.

La presente invención tiene por lo tanto como objeto un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti PA modificado de acuerdo con la invención, que presenta una afinidad mejorada con respecto al anticuerpo 35PA83 no mutado.

La presente invención también tiene como objeto un vector que comprende dicho ácido nucleico.

Estos ácidos nucleicos podrán estar comprendidos en un vector recombinante para la clonación o para la expresión de los anticuerpos de la invención.

La presente invención incluye todos los vectores recombinantes que contienen secuencias codificantes para la

transformación, transfección la terapia genética eucariota o procariota. Los vectores de este tipo se podrán preparar de acuerdo con las técnicas convencionales de biología molecular y comprenderán además un promotor apropiado, opcionalmente una secuencia señal para la exportación con la secreción, y secuencias de regulación necesarias para la transcripción de la secuencia de nucleótidos. Un polipéptido de fusión puede ser útil para la purificación de los anticuerpos de la presente invención. El dominio de fusión puede incluir, por ejemplo, una cola de poli-histidina que permita la purificación en columnas de Ni⁺, o un anclaje de membrana de fago filamentoso que es particularmente útil para la identificación sistemática de banco, de acuerdo con la tecnología de « presentación de fagos ».

Uno de los vectores apropiados en el contexto de la invención es una molécula de ADN recombinante adaptada para recibir y expresar una primera y una segunda secuencia de ADN, para permitir la expresión de anticuerpo heterodimérico tal como un anticuerpo de longitud completa o fragmentos F(ab')₂ o Fab de acuerdo con la invención. Un vector de este tipo proporciona un sistema para clonar de forma independiente las dos secuencias de ADN en dos casetes separados presentes en el vector, para formar dos cistrones separados para la expresión de un primero y un segundo polipéptido del anticuerpo heterodimérico. Un vector de expresión de este tipo se denomina vector dicistónico.

Los anticuerpos modificados de la presente invención se pueden producir en células eucariotas tales como CHO o hibridomas humano o murino por ejemplo, así como en células vegetales.

La presente invención también tiene como objeto células hospedadoras, procariota su eucariotas, que comprenden un vector de acuerdo con la invención.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición que comprende al menos un anticuerpo anti PA modificado de acuerdo con la invención para mejorar la afinidad.

La presente invención también tiene como objeto una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo anti PA modificado de acuerdo con la invención para mejorar la afinidad.

Dicha composición farmacéutica comprende de forma preferente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo de este tipo corresponde con el sentido de la invención, a un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos de la composición. La expresión « farmacéuticamente aceptable » se refiere a un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, un cultivo celular, un tejido o un organismo. Las características del vehículo dependerán del modo de administración.

La presente invención se refiere al uso de al menos un anticuerpo anti-PA modificado para mejorar la afinidad de acuerdo con la invención para la preparación de una composición farmacéutica o de un medicamento destinado al tratamiento o a la prevención de la infección por *Bacillus anthracis*.

El anticuerpo anti PA modificado para mejorar la afinidad de acuerdo con la invención puede estar etiquetado. Algunos ejemplos de etiquetas comprenden enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloides, compuestos quimioluminiscentes, y compuestos bioluminiscentes. Los métodos de unión de una etiqueta a un anticuerpo son bien conocidos por el experto en la materia.

Otra técnica de etiquetado consiste en acoplar el anticuerpo a haptenos de bajo peso molecular, pudiendo ser estos haptenos modificados de forma específica por medio de una segunda reacción. Algunos ejemplos de haptenos son biotina, que reaccionan con avidina, o dinitrofenol, piridoxal o fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos específicos anti-haptenos.

También se describe un kit para la detección de una toxina del ántrax que comprende PA. Este kit comprende:

- un recipiente que comprende al menos un anticuerpo anti PA modificado de acuerdo con la invención para mejorar la afinidad y que puede estar etiquetado o no,
- opcionalmente, un recipiente que comprende soluciones tampón
- y opcionalmente un recipiente que comprende medidas de detección de dicho anticuerpo anti PA modificado etiquetado, tal como una proteína de unión a biotina, por ejemplo avidina o estreptavidina, unida a una molécula transportadora, tal como una etiqueta fluorescente o enzimática. Este recipiente también puede comprender medios de detección de dicho anticuerpo anti PA modificado el etiquetado, es decir, esencialmente anticuerpos o fragmentos de anticuerpo.

El anticuerpo anti PA modificado para mejorar la afinidad de la invención se puede usar *in vitro*, por ejemplo, en ensayos inmunológicos en los que se usan en fase líquida o unido a un vehículo de fase sólida. Algunos ejemplos de vehículos bien conocidos son vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasa, celulosa natural o modificada, poliacrilamida, agarosa o magnetita. Algunos ejemplos de ensayos inmunológicos que usan el anticuerpo anti PA de la invención son radioinmunoensayos, etiquetados histoinmunológicos, ELISA, transferencias de Western, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de inmunodifusión, ensayos de fijación del complemento,

análisis con FACS o incluso análisis por chips de proteínas.

La presente invención tiene como objeto de proporcionar un método de detección *in vitro* de una toxina del ántrax, que comprende PA, en una muestra biológica, que comprende:

- 5 - la puesta en contacto la muestra con al menos un anticuerpo anti PA modificado de acuerdo con la invención para mejorar la afinidad y
- la detección de la unión de dicho anticuerpo como indicador de la presencia de dicha toxina del ántrax.

10 La muestra biológica puede ser líquida: por ejemplo saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, suero o sangre, o sólida o semisólida, por ejemplo tejidos o materias fecales o un tejido sólido tal como el que se usa normalmente en diagnóstico histológico.

15 También se describe un método de detección *in vivo* de una toxina del ántrax que comprende PA, en el que un anticuerpo anti PA modificado de acuerdo con la invención para mostrar la afinidad y etiquetado se administra a un sujeto. La cantidad de anticuerpo modificado etiquetado administrada debe ser suficiente para permitir la detección de la unión del anticuerpo a la toxina. La cantidad de anticuerpo modificado etiquetado administrada dependerá de factores tales como la edad y el sexo del sujeto, así como del estadio de la enfermedad. La cantidad administrada puede variar entre 0,01 mg/kg y 50 mg/kg, preferentemente entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg, y más preferentemente 20 entre 0,1 mg/kg y 2 mg/kg.

Para realizar el diagnóstico *in vivo*, el anticuerpo anti PA modificado de la invención se debe de unir a un radioisótopo directa o indirectamente a través de grupos funcionales. Algunos grupos funcionales usados normalmente son por ejemplo el ácido dietilen-triamin-pentacético (DTPA) y el ácido etilen-diamin-tetraacético (EDTA). Algunos ejemplos de iones metálicos radioisótopos son ¹¹¹In, ⁹⁷Ru, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ⁸⁹Zr y ²⁰¹Tl.

25 Los anticuerpos anti PA modificados de la invención también se pueden etiquetar con un isótopo paramagnético para el diagnóstico mediante formación de imágenes de resonancia magnética (IRM) o mediante resonancia de espín electrónico (ESR). También se pueden usar radioisótopos gamma emisores de positrones, tales como ¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ¹⁶²Dy, ⁶⁸Ga, ⁵²Cr y ⁵⁶Fe.

Los anticuerpos anti PA modificados para mejorar la afinidad de la invención también se pueden usar *in vitro* o *in vivo* para seguir la evolución del tratamiento de la enfermedad, por ejemplo, determinando el aumento o la disminución del número de células diana por las toxinas del ántrax por los cambios en la concentración de la toxina PA en una muestra biológica. También se describe un método para el tratamiento de un sujeto, preferentemente un ser humano, susceptible de infección por *Bacillus anthracis*, en el que una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti PA modificado de acuerdo con la invención para mejorar la afinidad se administra a dicho sujeto.

40 Una cantidad terapéuticamente eficaz corresponde a una cantidad suficiente para disminuir los síntomas de la enfermedad y la evolución de la infección. Esta cantidad puede variar con la edad, el sexo del sujeto y el estadio de la enfermedad y será determinada por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar entre 0,01 mg/kg y 50 mg/kg, preferentemente entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg, y más preferentemente entre 0,1 mg/kg y 2 mg/kg, en una o varias administraciones diarias, durante uno o varios días.

45 El modo de administración puede ser por inyección mediante perfusión gradual. La inyección puede ser intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o transdérmica.

Las preparaciones para una administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones o emulsiones. Algunos ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, o ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Algunos vehículos acuosos comprenden agua, soluciones de alcohol/agua, emulsiones o suspensiones.

La presente invención también tiene como objeto un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti PA modificado de acuerdo con la invención para mejorar la afinidad y unido, de forma directa o indirecta, a un agente terapéutico.

Los agentes terapéuticos de este tipo comprenden agentes químicos, radionucleidos, agentes inmunoterapéuticos, citoquinas, quimioquinas, toxinas o inhibidores enzimáticos. Algunos ejemplos de toxinas son cadena A de la difteria, cadena A de la exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantinas, proteínas de *Phytolacca americana*, el inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, el inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecnos. Algunos ejemplos de radionucleido son ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, y ¹⁸⁶Re.

La presente invención se comprenderá mejor con la ayuda del complemento de descripción que sigue a continuación, que se refiere a ejemplos de obtención de anticuerpo anti PA.

Descripción de las figuras

En los ejemplos que siguen a continuación, proporcionados a modo de ilustración, se hará referencia a las figuras adjuntas:

Figura 1: esquema de collar de perlas de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 35PA83.

La representación de IMGT en collar de perlas se realiza de acuerdo con la numeración de IMGT. Los puntos indican las diferencias entre los genes humanos más similares a 35PA83, y 35PA83. Los círculos rayados corresponden a las posiciones ausentes de acuerdo con la numeración de IMGT.

Figura 2: alineamiento de secuencias entre 3 anticuerpos anti PA modificados de acuerdo con la invención (6.20, V2 y J24-7) y que el anticuerpo precursor 35PA83.

El posicionamiento de las CDR sigue la definición del IMGT (en color gris claro) o la definición de Kabat (en color gris oscuro, Wu y Kabat 1970). Los restos sujetos a mutación están en negrita. Todos los restos se enumeran de acuerdo con la numeración de IMGT.

Descripción detallada de la invención

Materiales y métodos

Cepas de *E. coli*

Se usaron las cepas de *E. coli* que siguen a continuación:

- XL1 (Stratagène, La Jolla, CA): recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 sup E44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10(Tetr)]
- SURE (Stratagène): e14(McrA) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC: Tn5 (Kanr) uvrC [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]
- HB2151, usadas para expresión de los Fab solubles.

Toxinas

Las toxinas del ántrax (PA83, LF y EF) se adquirieron en los laboratorios List.

Construcción de la biblioteca de mutantes 35PA83

Una biblioteca de anticuerpos votantes derivados del gen 35PA83 se generó mediante Massive mutagenesis® (Biomethodes, Evry, Francia). Las mutaciones se introdujeron en las CDR de las cadenas pesada y ligera usando codones de NNS. Las regiones de CDR se definieron de acuerdo con Kabat *et al.* (Wu y Kabat 1970) y IMGT (Lefranc, Pommie *et al.* 2003).

La biblioteca de ADN se usó para transformar las células SURE por electroporación. Después de añadir medio SB suplementado con carbenicilina al cultivo e incubación durante 1 h a 37 °C, se añadió 1 ml de fago auxiliar VCSM13 (aproximadamente 10¹² pfu) al cultivo. Después de incubación durante 2 h, se añadieron 70 µg/ml de kanamicina y el cultivo se dejó en agitación durante la noche a 37 °C.

Selección de anticuerpo por fago

Las partículas de fagos-Fab se purificaron y se concentraron a partir de 50 ml de cultivo por precipitación con PEG, a continuación se volvieron a suspender en 3 ml de PBS-BSA al 1 %-azida al 0,02 % y se filtraron sobre un filtro de 0,45 µm. La titulación de esta preparación de fago era de aproximadamente 5 · 10¹⁰ pfu/ml. Los fagos-Fab se sometieron a tres ciclos de infección-selección-recuperación tal como se ha descrito anteriormente (Andris-Widhopf, Rader *et al.* 2000). Ciertos fagos se analizaron, o bien se sometieron a uno o bien al otro de los métodos que se describen a continuación:

Selección por elución a concentración de antígeno muy baja

La biblioteca se identificó sistemáticamente usando concentraciones decrecientes de PA83 biotinilado (100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM, 0,001 nM) y perlas magnéticas revestidas con estreptavidina µMACS (Mileny Biotech). Diferentes mezclas de fagos y antígeno biotinilado, a diferentes concentraciones, se incubaron durante 30 min a 37 °C en tubos de vidrio. Los fagos unidos al PA83 biotinilado se capturaron usando 100 µl de perlas magnéticas revestidas con estreptavidina µMACS (5 min a temperatura ambiente). Después de la captura de los fagos, las perlas se lavaron 5 veces en PBS y una vez en TPBS (PBS que contenía un 0,1 % de Tween 20). Los

fagos unidos se eluyendo con ción por incubación con 100 µl de tripsina (10 µg/ml). El eluato se usó para infectar las bacterias SURE de *E. coli* en fase de crecimiento exponencial.

Selección por incubación de larga duración

5 Aproximadamente 10^9 - 10^{10} fagos por pocillo (50 µl) se identificaron sistemáticamente mediante unión sobre la placa (Nunc Maxisorp) revestida con 5 µg/ml de PA83 en PBS y se bloqueó con un 5 % de MPBS. La placa PA83 se incubó con los fagos-Fab durante 2 h a 37 °C y se lavó 5 veces en un 0,1 % de Tween 20-PBS y 2 veces en PBS. A
10 continuación, los fagos se incubaron a 4 °C con 50 µg/ml de PA83 soluble durante los tiempos proporcionados (1 día, 3, 13, 18, y 24 días). Después de 5 lavados, los fagos unidos se eluyeron a 37 °C durante 15 min con 50 µl de tripsina y 10 µg/ml (Sigma) antes de reinfeksi3n de las bacterias SURE de *E. coli* en fase exponencial.

Expresión de Fab soluble, extracción periplasmática y purificación

15 Cada variante de ADN se transformó en bacterias de la cepa de *E. coli* denominada HB2151, expresadas como químicamente competentes. Las células se cultivaron a 30 °C, se agitaron a 250 rpm en 1 l de medio SB que contenía 50 µg/ml de carbenicilina y un 0,1 % de glucosa. Cuando el cultivo consigue una A600 de 1,5, se realizó inducción con 1 mM de IPTG durante 18 h a 22 °C.

20 Los Fab se extrajeron con sulfato de polimixina B (Sigma) y se purificaron sobre columna de níquel (columna de centrifugación de Ni-NTA, QIAGEN, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a continuación se dializaron con PBS 1X a 4 °C durante 3 h.

Cuantificación del Fab soluble

25 La pureza del Fab se sometió a ensayo por SDS-PAGE y su concentración se determinó con la ayuda del software Quantity One® (Biorad).

Medición en tiempo real de la resonancia de plasmones superficiales (SPR)

30 Las constantes de cinética de interacción entre PA83 y las variantes 35PA83 se determinaron usando el sistema Biacore X SPR (BIAcore, Uppsala, Suecia). El PA83 se inmovilizó sobre un chip sensible CM5 usando un método de acoplamiento de aminos por inyección de 30 µl de 2 µg/ml de PA83 en 10 mM de acetato sódico a pH 4,5. Para minimizar la probabilidad de nueva unión, la K_D se midió usando un caudal elevado (30 µl/min) y una cantidad
35 mínima de antígeno acoplado (aproximadamente 500 RU, unidades de resonancia). La tasa de unión de diferentes concentraciones de Fab que varían de 5 a 400 nM en PBS se determinó a un caudal de 30 µl/min. Los datos de unión se introdujeron en un modelo de Langmuir a 1:1 del software de evaluación BIA. Las constantes de asociación y de disociación ($k_{asociación}$ y $k_{disociación}$ respectivamente) para la unión del Fab a PA83 se determinaron a 35 °C.

Análisis de secuencias

Las secuencias de las cadenas pesada y ligera de los clones seleccionados se determinaron por Genome Express (Meylan, Francia) usando los cebadores ompseq y newpelseq (Andris-Widhopf, Rader *et al.*, 2000). Las secuencias se analizaron en línea, usando el sistema IMGIT (<http://imgt.cines.fr>).

Ensayo de neutralización *in vitro*

La línea celular de macrófago murino J774A.1 se incubó durante la noche a una densidad de 14 000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Se añadieron 400 ng/ml de PA y 40 ng/ml de LF de forma simultánea al Fab o al
50 medio solo y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. A continuación, las mezclas se añadieron a los macrófagos y se incubaron durante 4 h a 37 °C. El Kit de Ensayo Promega CytoTox 96 se usó a continuación de acuerdo con las instrucciones del fabricante para determinar los valores de la CI_{50} del Fab para la neutralización de LT (Pelat *et al.* 2007, Antimicrob. Agents Chemother 51, 2758-2764).

Resultados

Construcción de la biblioteca mutante de Fab (35PA83)

Una maduración de afinidad *in vitro* se realizó para generar nuevas variantes que presentaban una afinidad mejor.
60 Con este objeto, se generó una biblioteca de variantes por mutación exclusiva de los restos de las 6 CDR, es decir, a nivel de 73 posiciones. El tamaño de la biblioteca es de $5,4 \cdot 10^8$ transformantes. 45 clones plásmidos independientes se secuenciaron para determinar la diversidad (tabla 1) y la tasa de mutación. La tasa de mutación experimental es de 3 mutaciones por fragmento (VH + VL), lo que permite una selección directa de las combinaciones de mutaciones que aumentan la afinidad hacia PA.

65 El examen de la frecuencia de mutación en cada posición de la CDR diana en la biblioteca más seleccionada en

comparación con la biblioteca seleccionada (tabla 1) mostró que ciertas posiciones (en color gris) no son tolerantes a la variación. Por lo tanto, los restos que se encuentran en estas posiciones se parecen a los restos fundamentales para la unión al antígeno, que conservan la integridad del sitio de unión al antígeno. En particular, los restos (H31-H40) de la CDR1 se definen como restos de contacto en el antígeno.

- 5 Parece que una presión de selección sustancial se produjo durante el proceso de selección que la biblioteca no seleccionada presenta una diversidad mayor en comparación con las secuencias seleccionadas, en particular en L-CDR1 y H-CDR1. Dos posiciones (en negro) están frecuentemente montadas en la biblioteca seleccionada: H117 y L27. Con la excepción del mutante J24-15, las mutaciones del resto de serina H117 no afectaron a las propiedades de unión al antígeno de los Fab (Tabla 2). Por el contrario, las mutaciones de los restos de Glutamina L27 parecen desfavorables, ya que disminuyen la afinidad del Fab (mutante 6.7) o afectan a la eficacia de la expresión del Fab (datos no mostrados).

Fragmento Fd

H-CDR1	G	D	S	I	S	G	G	Y	Y	W	S
% de frecuencia de mutación en la biblioteca seleccionada	0	5,5	1,8	0	0	3,7	0	0	0	0	0
% de frecuencia de mutación en la biblioteca no seleccionada	8,5	4	11	6	2	2	17	2	6	2	8

H-CDR2	H	I	Y	G	S	T	A	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S
% de frecuencia de mutación en la biblioteca seleccionada	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	11	3,7	3,7	3,7	1,8	0	1,8	0
% de frecuencia de mutación en la biblioteca no seleccionada	4	2	0	4	0	0	0	4	0	17	4	15	2	15	6	4	8

H-CDR3	S	G	Y	N	F	W	S	G	E	Y	Y	G	L	D	S
% de frecuencia de mutación en la biblioteca seleccionada	0	0	1,8	0	0	0	1,8	0	1,8	1,8	5,5	0	1,8	0	22
% de frecuencia de mutación en la biblioteca no seleccionada	2	0	2	2	0	0	13	8	8	12	4	12	14	4	6

Cadena ligera

L-CDR1	H	A	S	Q	G	I	N	S	W	L	A
% de frecuencia de mutación en la biblioteca seleccionada	3,7	0	0	11	0	0	1,8	0	3,7	3,7	0
% de frecuencia de mutación en la biblioteca no seleccionada	11	11	2	4	4	4	8	0	9	9	4

L-CDR2	K	A	S	S	L	Q	S
% de frecuencia de mutación en la biblioteca seleccionada	5,3	0	3,7	5,5	11	14	15
% de frecuencia de mutación en la biblioteca no seleccionada	6	0	8	13	6	12	10

L-CDR3	Q	Y	D	S	A	P	L	A
% de frecuencia de mutación en la biblioteca seleccionada	0	0	1,8	0	7,4	3,7	1,8	3,7
% de frecuencia de mutación en la biblioteca no seleccionada	0	4	2	0	6	4	19	17

15 Tabla 1: Frecuencias de mutación en las posiciones CDR diana

Porcentaje de secuencias mutadas en una posición dada (54 secuencias individuales)

Tabla 2: Afinidad y cinéticas de unión para el Fab 35PA83 sus variantes.

Clon precursor	secuencia H	secuencia L	K _D (M)	K _{asociación} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	K _{disociación} (s ⁻¹)
35PA83	precursora	precursora	3,4 10 ⁻⁹	9,3 10 ⁴	3,2 10 ⁻⁴
Clones con afinidades netamente mejoradas	secuencia H	secuencia L	K _D (M)	K _{asociación} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	K _{disociación} (s ⁻¹)
v2	G>S (31A)	precursora	6,6 10 ⁻¹⁰	1,22 10 ⁵	8,1 10 ⁻⁵
	R>K (66)				
	K>R (73)				
6.20	H>L (55)	Q>L (68)	1,8 10 ⁻¹⁰	2,86 10 ⁵	5,1 10 ⁻⁵
	S>G (74)				
J24-7	precursora	H>R (24)	7,8 10 ⁻¹⁰	4,35 10 ⁵	3,4 10 ⁻⁴
		S>E (69)			
J24-15	S>L (117)	S>R (58)	8,8 10 ⁻¹⁰	3,41 10 ⁵	3 10 ⁻⁴
Clones con afinidades	secuencia H	secuencia L	K _D (M)	K _{asociación} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	K _{disociación} (s ⁻¹)
v3	precursora	L>R (67)	2,27 10 ⁻⁸	8,98 10 ³	2 10 ⁻⁴
5.20	precursora	S>R (69)	1,22 10 ⁻⁸	2,4 10 ⁴	2,91 10 ⁴
6.7	precursora	Q>V (27)	8,11 10 ⁻⁹	1,9 10 ⁴	1,5 10 ⁻⁴
		S>L (66)			
6.40	precursora	H>R (24)	1.10 ⁻⁸	1,9 10 ⁴	2.10 ⁻⁴
Clones con afinidades estables o poco mejoradas	secuencia H	secuencia L	K _D (M)	K _{asociación} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	K _{disociación} (s ⁻¹)
v8	L>F (115)	A>S (117)	2,54 10 ⁻⁹	9,2 10 ⁴	2,3 10 ⁻⁴
3.5	precursora	Q>R (27) A>P (114)	1,9 10 ⁻⁹	0,8 10 ⁵	1,5 10 ⁻⁴
5.7	S>R (29)	W>D (32)	2,57 10 ⁻⁹	5,5 10 ⁴	1,4 10 ⁻⁴
	S>R (117)				
5.15	S>A (117)	precursora	3,5 10 ⁻⁹	8,85 10 ⁴	3,11 10 ⁴
5.47	Y>T (112,4)	P>S (115)	2,11 10 ⁻⁹	8,81 10 ⁴	1,86 10 ⁻⁴
5.25	precursora	Q>R (68)	2 10 ⁻⁹	4,5 10 ⁴	9 10 ⁻⁵
5.39	G>E (31A) D>G (28)	precursora	1,71 10 ⁻⁹	0,63 10 ⁵	1,08 10 ⁻⁴
6.36	Y>T (113)	P>S (115)	2 10 ⁻⁹	0,62 10 ⁴	1,26 10 ⁻⁵
6.2	S>G (74)	A>G (114)	2 10 ⁻⁹	1,6 10 ⁵	3,2 10 ⁻⁴
6.46	S>A (70)	S>R (69)	1,82 10 ⁻⁹	6,9 10 ⁴	1,26 10 ⁴
	E>Q (112,3)				
	S>R (117)				

Clones con afinidades estables o poco mejoradas	secuencia H	secuencia L	KD (M)	kasociación (M-1.s-1)	kdisociación (s-1)
6.49	P>G (69)	precursora	1,55 10 ⁻⁹	9,6 10 ⁴	1,5 10 ⁻⁴
	S>T (111,2)				
J24-3	P>G (69)	precursora	1,5 10 ⁻⁹	2 10 ⁵	2,9 10 ⁻⁴
J24-12	precursora	A>D (114)	3,5 10 ⁻⁹	7,8 10 ⁴	2,8 10 ⁻⁴
J24-13	precursora	D>E (108)	1,5 10 ⁻⁹	1,2 10 ⁵	1,86 10 ⁻⁴
J24-14	D>G (28)	precursora	3,3 10 ⁻⁹	6,14 10 ⁵	2,03 10 ⁻⁴
	G>E (33)				
	S>L (117)				

Las constantes de asociación ($k_{\text{asociación}}$) y de disociación ($k_{\text{disociación}}$) se determinaron por resonancia de plasmones superficiales (BIAcore) y la K_D se calculó como igual a la proporción de $k_{\text{disociación}}/k_{\text{asociación}}$.

5

Selección de las variantes

La biblioteca mutante se sometió a 3 ciclos (R1, R2 y R3) de infección-selección-recuperación. Después de la etapa R3, se analizaron 12 clones individuales por secuenciación de VH y VL. Entre estas 8 variantes, se encontró que 2 eran idénticas. Por lo tanto, 7 Fab individuales se expresaron como Fab solubles. 3 de ellos se expresaron de manera suficiente para permitir la medición de la afinidad por SPR.

10

12 secuencias de H + L	4 precursoras	34 %		
	8 variantes (2 idénticas)	66 %	3 clones expresados	37 %
			5 clones no expresados	63 %

El triple mutante V2 mostraba una constante de disociación más baja ($k_{\text{disociación}} = 8,1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$) y una constante de asociación poco más rápida ($k_{\text{asociación}} = 1,22 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) que 35PA83, dando como resultado del aumento de la afinidad de 5,15 veces. Este mutante presenta 3 mutaciones en el dominio variable de la cadena pesada: una mutación (G31AS) en H-CDR1 y dos mutaciones en H-CDR2 (R66K, K73R).

15

Después del tercer ciclo, los pagos se seleccionaron de acuerdo con dos métodos complementarios de selección: seleccionen pocillos revestidos con antígeno con periodo de incubación prolongado (« selección por incubación prolongada ») o bien usando el antígeno biotinilado soluble a concentración muy baja (« selección por elución a concentración muy baja de antígeno soluble »).

20

Selección por elución la concentración muy baja de antígeno soluble

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9
[PA83 biotinilado] nM	100	10	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001	0
fagos eludidos ($\times 10^3$)	250	192	55	10	8,8	3,4	1	0,7	0,9

25

La biblioteca R3 se seleccionó usando concentraciones decrecientes de PA83 biotinilado, que variaban de 100 nM a 0,01 pM. 1 pM representa la concentración más baja que permite eluir más intensamente clones que el control negativo. Algunos clones individuales, obtenidos a partir de la condición 6, se analizaron en un primer tiempo mediante secuencias de cadenas pesadas y ligeras. Aproximadamente un 35 % entre ellos presentaban secuencias de tipo silvestre.

30

Condición 6

43 secuencias H + L	15 precursoras	35 %		
	28 variantes	65 %	Clones expresados	47 %
			Clones no expresados	63 %

Entre estas 28 variantes, un 47 % se expresaban lo suficientemente como para permitir la medición de la afinidad por SPR. Dada la redundancia de los clones, 8 variantes individuales se expresaron y sus constantes de cinética se midieron. El fragmento de anticuerpo que posee la mejor constante de afinidad ($K_D = 1,8 \cdot 10^{-10}$ M, es decir una mejora de un factor igual a 18,9) es el triple mutante 6.20. Esta variante posee dos mutaciones la CDR2 de la cadena pesada (H55L y S74G) y una mutación en la CDR2 de la cadena ligera (Q68L).

10

Selección por incubación de larga duración

Tiempo de incubación (días)	3	13	18	24	25
fagos eluidos	4000	5700	4000	18	0

14 secuencias H + L	3 precursoras	21 %		
	11 variantes	78 %	Clones expresados	72 %
			Clones no expresados	27 %

Entre los 18 clones eluidos el día 24, 14 eran enteramente secuencias (VH y VL) y solamente 3 eran de tipo silvestre. 6 variantes se expresaron de forma suficiente para determinar sus constantes de cinética. Los dobles mutantes J24-7 ($K_D = 7,8 \cdot 10^{-10}$ M) y J24-15 ($K_D = 8,8 \cdot 10^{-10}$ M) mostraban una afinidad de unión aumentada de un factor 4,35 y 3,96 respectivamente.

15

Ensayo de neutralización LT *in vitro*

20 La concentración de inhibición a un 50 % (CI_{50}) del Fab precursor 35PA83 es de 5,6 nM.

La concentración de inhibición a un 50 % se midió para las variantes v2 y 6.20: CI_{50} del Fab v2 = 0,9 nM y CI_{50} del Fab 6.20 = 3,3 nM.

25 Por lo tanto, las variantes v2 y 6.20 presentan una mejor capacidad de neutralización que el Fab precursor 35PA83.

Humanización de las variantes

Los anticuerpos inyectados en el ser humano se toleran muy bien cuando son humanos. Por el contrario, los anticuerpos de origen animal pueden ser la causa de efectos secundarios perjudiciales y se eliminan rápidamente. Sin embargo, las regiones hipervariables de los anticuerpos se mutan tanto durante la maduración de afinidad de modo que es difícil, después de un solo análisis secuencias, definir el origen. Dado que los Fab no comprenden región constante, las regiones bisagra son las únicas regiones implicadas en su tolerancia.

30

35 Para mejorar la tolerancia del Fab 35PA83, y de las moléculas de las que se derivará, este Fab se humanizó. Un análisis automático se realizó en el servidor IMGT (<http://imgt.cines.fr>) y permitió localizar, en las regiones bisagra del Fab 35PA83, los restos diferentes de los codificados por los genes germinales humanos, que codifican las secuencias más próximas a las de 35PA83. Algunas síntesis o mutaciones puntuales permitieron obtener secuencias de nucleótidos que codifican variantes del Fab 35PA83 y que comprenden uno, o un pequeño número, de mutaciones que aumentan la homología con las secuencias humana. Las mutaciones que no causaban degradación significativa de la afinidad, con respecto a 35PA83, figuran en las tablas 3 y 4. El conjunto de estas nuevas mutaciones se ha asociado con un nuevo gen sintético que codifica un Fab cuyas regiones bisagra son idénticas en un 97,75 % con regiones bisagra codificadas por genes germinales humanos, con respecto a un 88,69 % para el Fab precursor 35PA83. Sin embargo, la afinidad de esta variante totalmente humanizada ($K_D = 9 \cdot 10^{-9}$ M) está degradada en un factor de 3 aproximadamente con respecto al Fab 35PA83.

40

45

Tabla 3: mutaciones de las regiones bisagra de la cadena pesada

N.º del resto	35PA83	
1	ninguno	Q
2	ninguno	V
3	ninguno	Q
4	ninguno	L
5	ninguno	Q
6	ninguno	E
12	L	V
24	A	T
45	S	P
66	R	N
80	K	V
87	L	F
92	R	S
122	A	T
123	V	L

Tabla 4: mutaciones de las regiones bisagra de la cadena ligera

N.º del resto	35PA83	
1	ninguno	A
2	ninguno	I
3	ninguno	Q
4	ninguno	L
14	Y	S
18	K	R
24	H	R
87	Y	F
96	S	P
101	S	T
124	L	V

5 Los inventores buscaron un nuevo estudio para determinar cuáles eran las mutaciones en las regiones bisagra de la cadena pesada y de la cadena ligera que no conducían a modificaciones en la afinidad del Fab.

10 En un primer tiempo, las mutaciones descritas en las tablas 5 y 6 que siguen a continuación se realizaron en las opciones bisagra 1 y 4 de la cadena pesada y ligera de 35PA83.

La variante obtenida con estas mutaciones se denomina Hu₁35PA83.

Tabla 5: mutaciones de las regiones bisagra 1 y 4 de la cadena pesada de 35PA83

N.º del resto	35PA83	
1	ninguno	Q
2	ninguno	V
3	ninguno	Q
4	ninguno	L
5	ninguno	Q
6	ninguno	E
12	L	V
24	A	T
122	A	T
123	V	L

Tabla 5: mutaciones de las regiones bisagra 1 y 4 de la cadena ligera de 35PA83

N.º del resto	35PA83	
1	ninguno	A
2	ninguno	I
3	ninguno	Q
4	ninguno	L
14	Y	S
18	K	R
24	H	R
124	L	V

- 5 Las constantes de disociación K_d se midieron por Bioacore para 35PA83 y la variante Hu₁35PA83. Los resultados obtenidos son muy próximos: 3,40 nM para 35PA83 y 2,86 nM para Hu₁PA83.

Por lo tanto, las mutaciones realizadas en las regiones bisagra 1 y 4 de la cadena pesada y de la cadena ligera de 35PA83 no influyen en la afinidad de 35PA83 hacia su antígeno.

- 10 En un segundo tiempo, se realizaron mutaciones en las regiones bisagra 2 y 3 de la cadena pesada y de la cadena ligera de 35PA83. Estas mutaciones están presentes en las tablas 6 y 7 que siguen a continuación.

- 15 La variante obtenida por las mutaciones descritas anteriormente en las regiones bisagra 1 y 4 y por las mutaciones que se describen a continuación en las regiones bisagra 2 y 3 se denominó Hu₄PA83.

Tabla 6: mutaciones de las regiones bisagra 2 y 3 de la cadena pesada de 35PA83

N.º del resto	35PA83	
45	S	P
66	R	N
87	L	F
92	R	S

Tabla 7: mutaciones de las regiones bisagra 2 y 3 de la cadena ligera de 35PA83

N.º del resto	35PA83	
87	Y	F
96	S	P
101	S	T

Las constantes de disociación Kd se midieron por Bioacore para 35PA83 y la variante Hu435PA83. Los resultados obtenidos son muy próximos: 3,40 nM para 35PA83 y 3,72 nM para Hu4PA83.

Por lo tanto, las mutaciones realizadas en las regiones bisagra 1, 2, 3 y 4 de la cadena pesada y de la cadena ligera de 35PA83 tal como se describen en las tablas 4 a 7 no influyen en la afinidad de 35PA83 hacia su antígeno.

Un ensayo de neutralización LT también se realizó de acuerdo con el protocolo que se ha descrito anteriormente. La concentración de inhibición de un 50 % medida para Hu435PA83 es de 5,8 nM mientras que la medida para 35PA83 es de 5,6 nM.

Por lo tanto, las mutaciones realizadas en las regiones bisagra 1, 2, 3 y 4 de la cadena pesada y de la cadena ligera de 35PA83 tal como se describen en las tablas 4 a 7 no influyen en la capacidad de neutralización de 35PA83.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Etat français, représenté par le Délégué Général de l'Armement
THULLIER, Philippe

<120> Anticuerpos frente a las toxinas del ántrax

<130> BEX080300

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 1

ES 2 584 511 T3

Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
1 5 10 15

Ala Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
20 25 30

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

Ser Thr Ala Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr
50 55 60

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

Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr
85 90 95

Asn Phe Trp Ser Gly Glu Tyr Tyr Gly Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Ala Val Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 103
<212> PRT
<213> *Macaca fascicularis*
<400> 2

5

ES 2 584 511 T3

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Tyr Val Gly Asp Lys Val Thr

1 5 10 15

Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Asn Ser Trp Leu Ala Trp Tyr
20 25 30

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

Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
50 55 60

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala
65 70 75 80

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

Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
100

<210> 3

<211> 223

5 <212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 3

ES 2 584 511 T3

Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	1	5	10	15
Val	Ser	Gly	Asp	Ser	Ile	Ser	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	20	25	30	
Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	His	Ile	Tyr	Gly	Ser	35	40	45	
Thr	Ala	Asp	Thr	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	50	55	60	
Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Leu	Ser	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser	Val	65	70	75	80
Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Asn	85	90	95	
Phe	Trp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Ala	100	105	110	
Val	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	115	120	125	
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	130	135	140	
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	145	150	155	160
Ser	Gly	Ser	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	165	170	175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	180	185	190	
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Val	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	195	200	205	
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ile	Lys	Thr	Cys	Gly	Gly	210	215	220		

<210> 4
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> *Macaca fascicularis*

ES 2 584 511 T3

$\langle 400 \rangle$ 4

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Tyr Val Gly Asp Lys Val Thr
1 5 10 15

Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Asn Ser Trp Leu Ala Trp Tyr
20 25 30

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

Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
50 55 60

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala
65 70 75 80

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

Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe

110

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

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

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

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

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

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
195 200 205

Glu

5 $\langle 210 \rangle$ 5
 $\langle 211 \rangle$ 670

ES 2 584 511 T3

<212> ADN

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 5

5

```

cgggcccagg actgctgaag ccttcggaaa cctgtccct cacctgcgct gtctctggtg      60
actccatcag cgggtggttac tactggagct ggatccgccg gtccccaggg aaggggctgg      120
agtggattgg gcatatctat ggtagtactg cggacaccag gtacaacccc tccctcaaga      180
gtcgagtcac catttcaaaa gacacgtcca agaaccagct ctccctgcaa ctgaggtctg      240
tgaccgcgcg ggacacggcc gtgtattatt gtgcgagatc gggttacaat ttttggagtg      300
gtgaatatta cggtttggat tcttggggcc aaggggcccgt cgtcacgctc tctcagcct      360
ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg cgcctcctc caggagcacc tccgagagca      420
cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga acccgtgacc gtgtcgtgga      480
actcaggctc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccgcc tgtcctacag tctcagggc      540
tctaactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctacg      600
tctgcaacgt aaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagatcaaaa      660
catgtggtgg                                     670

```

<210> 6

<211> 634

<212> ADN

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 6

10

```

accagtcctc catcgtccct gtctgcatat gtgggagaca aagtcaccat cacttgccat      60
gccagtcagg gtattaacag ttggttagcc tggatcagc agaaaccagg gaaagcccct      120
aaacttctga tctataaggc gtccagtttg caaagtgggg tcccatcaag gttcagcggc      180
agtggatctg ggacagatta tactctcacc atcagcagct tgcagtcctga agactttgct      240
tcttattact gtctacaata tgacagtgcc ccattggctt tcggccccgg gaccaagctg      300
gatatcaaac gggctgtggc tccaccatct gtcttcatct tcccgcctc tgaagatcag      360
gtgacatctg gaactgtctc tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc      420
agcgtaaagt ggaaggtgga tgggtccctc aaaacgggta actcccagga gagtgtcaca      480
gagcaggaca gcaaggacaa cacctacagc ctgagcagca cctgacgct gagcagcaca      540
gagtaccaga gtcacaaagt ctatgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagttcgccc      600
gtcacaaga gcttcaacag gggagagtgt taat                                     634

```

15

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

ES 2 584 511 T3

<213> artificial

<220>

<223> Variante V2 de VH

5

<400> 7

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

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

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

Ile Gly His Ile Tyr Gly Ser Thr Ala Asp Thr Lys Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Arg Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu
65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Asn Phe Trp Ser Gly Glu Tyr Tyr Gly Leu
100 105 110

Asp Ser Trp Gly Gln Gly Ala Val Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

10

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

15

<220>

<223> Variante V2 de VL

<400> 8

ES 2 584 511 T3

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

Asp Lys Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Asn Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

Ala Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
100 105

<210> 9
<211> 125
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Variante 6.20 de VH

<400> 9

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

ES 2 584 511 T3

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

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

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

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

Ser Leu Gln Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Asn Phe Trp Ser Gly Glu Tyr Tyr Gly Leu
100 105 110

Asp Ser Trp Gly Gln Gly Ala Val Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Variante 6.20 de VL

<400> 10

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

Asp Lys Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Asn Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ser Ala Pro Leu

ES 2 584 511 T3

85

90

95

Ala Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
100 105

<210> 11
<211> 125
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Variante J24.15 de VH

<400> 11

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

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

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

Ile Gly His Ile Tyr Gly Ser Thr Ala Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu
65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Asn Phe Trp Ser Gly Glu Tyr Tyr Gly Leu
100 105 110

Asp Leu Trp Gly Gln Gly Ala Val Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Variante J24.15 de VL

<400> 12

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

ES 2 584 511 T3

Asp Lys Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Asn Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

Ala Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
100 105

<210> 13
<211> 125
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Variante J24.7 de VH

<400> 13

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

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

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

Ile Gly His Ile Tyr Gly Ser Thr Ala Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu
65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Asn Phe Trp Ser Gly Glu Tyr Tyr Gly Leu

ES 2 584 511 T3

100

105

110

Asp Ser Trp Gly Gln Gly Ala Val Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Variante J24.15 de VL

<400> 14

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

Ala Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
100 105

<210> 15
<211> 125
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Variante V2 de VH humanizada

<400> 15

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

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

ES 2 584 511 T3

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

Ile Gly His Ile Tyr Gly Ser Thr Ala Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Asn Phe Trp Ser Gly Glu Tyr Tyr Gly Leu
100 105 110

Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 16
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Variante V2 de VL humanizada
<400> 16

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Ser 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 Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Ala Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100

105

ES 2 584 511 T3

<210> 17
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Variante 6.20 de VH humanizada

<400> 17

10

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

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

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

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

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

Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Asn Phe Trp Ser Gly Glu Tyr Tyr Gly Leu
 100 105 110

Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 18
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> artificial

15

<220>
 <223> Variante 6.20 de VL humanizada

20

<400> 18

ES 2 584 511 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 19
<211> 125
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Variante J24.15 de VH humanizada

<400> 19

ES 2 584 511 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Gly Gly
 20 25 30
 Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly His Ile Tyr Gly Ser Thr Ala Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Asn Phe Trp Ser Gly Glu Tyr Tyr Gly Leu
 100 105 110
 Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

<210> 20
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Variante J24.15 de VL humanizada

<400> 20

ES 2 584 511 T3

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

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

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

Tyr Lys Ala Arg Ser 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 Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Ala Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 125
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Variante J24.7 de VH humanizada

<400> 21

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

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

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

ES 2 584 511 T3

Ile Gly His Ile Tyr Gly Ser Thr Ala Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Asn Phe Trp Ser Gly Glu Tyr Tyr Gly Leu
100 105 110

Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Variante J24.7 de VL humanizada

<400> 22

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti antígeno protector de la toxina del ántrax que comprende:

5 - una parte Fc de origen humano, y:

 - o bien la región variable de cadena pesada de secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N° 1 mutada en las posiciones siguientes: H/L (55) y S/G (74), y la región variable de cadena ligera de secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N° 2 mutada en la posición siguiente: Q/L (68),

10 - o bien la región variable de cadena pesada de secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N° 1 mutada en las posiciones siguientes: G/S (31A), R/K (66) et K/R (73), y la región variable de cadena ligera de secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N° 2,

15 siendo las posiciones de los aminoácidos las indicadas en la figura 1, y **caracterizado por que** dicho anticuerpo modificado presenta una afinidad superior a la del anticuerpo no mutado.

2. Ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti antígeno protector de la toxina del ántrax de acuerdo con la reivindicación 1.

20 3. Vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2.

4. Célula hospedadora que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 3.

25 5. Composición que comprende al menos un anticuerpo anti antígeno protector de la toxina del ántrax de acuerdo con la reivindicación 1.

6. Composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo anti antígeno protector de la toxina del ántrax de acuerdo con la reivindicación 1.

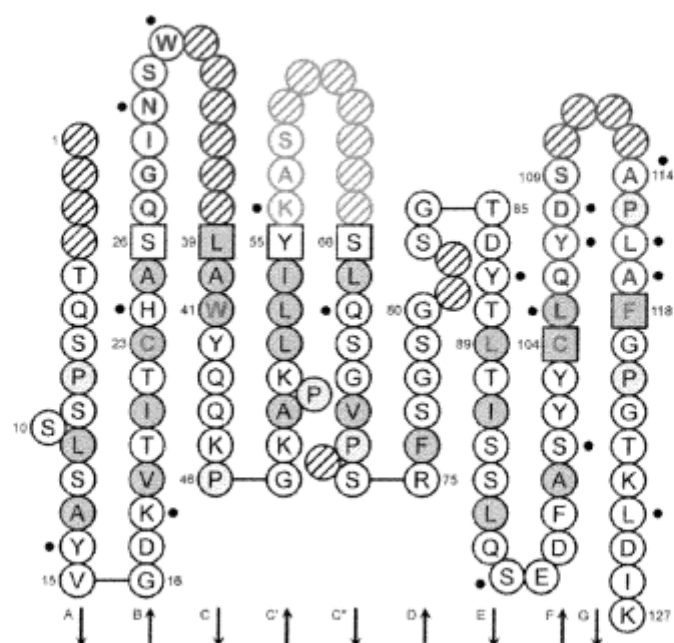
30 7. Método para la detección *in vitro* de una toxina del ántrax que comprende el antígeno protector de la toxina del ántrax en una muestra biológica, que comprende:

 - la puesta en contacto de la muestra con al menos un anticuerpo anti antígeno protector de la toxina del ántrax de acuerdo con la reivindicación 1, y

35 - la detección de la unión de dicho anticuerpo como indicador de la presencia de dicha toxina del ántrax.

8. Inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti antígeno protector de la toxina del ántrax de acuerdo con la reivindicación 1 unido a un agente terapéutico.

35L



35H

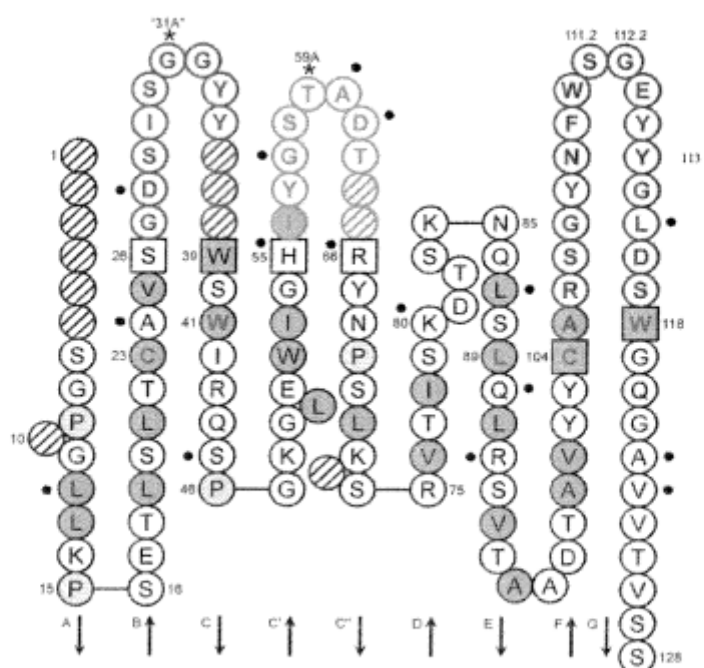


Figura 1

Cadena ligera

	10	20	30	40	50	60	70	
	L-CDR1				L-CDR2			
35PA83	---TQSPS	SLSAVVGDV	TITC HASQGI	NSW-----L	AWYQKPGKA	FKLLI KAS	----- SLQS	GVP-SRFSGS
6.20	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----- L -----	-----
v2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
J24.7	-----	-----	--- R -----	-----	-----	-----	----- E -----	-----

	80	90	100	110	120
	L-CDR3				
35PA83	G--SGTDVTL	TISSLQSEDF	ASY YLQYDS	----APLAFG	PGTKLDIKRA
6.20	-----	-----	-----	-----	-----
v2	-----	-----	-----	-----	-----
J24.7	-----	-----	-----	-----	-----

Cadena pesada

	10	20	30	40	50	60	70
35PA83	SGP	-GLLKPSL	SLTCAV SGDS	ISGGYY ...W	SWIRQSPKG	LEWIGH IYGS	TADT --RYNP
6.20							
v2				-S-----			
J24.7							

	80	90	100	110	120
35PA83	KDTSKNQLSL	QLRSVTAADT	AVYYCAR SGY	NFWSCEYYGLDSWG	QGAVVTVSS
6.20					
v2					
J24.7					

Numeración de H-CDR3:

110 111.1 112.2 112.4

CAR**SGY**NFWS**G**CEYY

Numeración de H-CDR3:

110 111.1 112.2 112.4
 CARSGYNF W S G E Y Y GLDSWG
 111.2 112.3

Figura 2