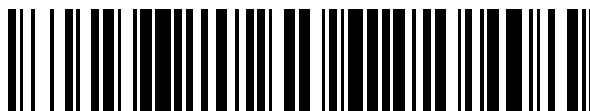


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 565**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
C07K 16/12	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)
A61K 47/42	(2007.01)
G01N 33/569	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2008 PCT/FR2008/052160**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2009 WO09071860**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2008 E 08856851 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2235057**

54 Título: **Inmunoglobulina G contra las toxinas del ántrax**

30 Prioridad:

29.11.2007 FR 0759419

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.01.2018

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(50.0%)
3 avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis, FR y
ETAT FRANÇAIS REPRÉSENTÉ PAR LE
DÉLÉGUÉ GÉNÉRAL POUR L'ARMEMENT
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**THULLIER, PHILIPPE y
BEHRENS, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 649 565 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

Inmunoglobulina G contra las toxinas del ántrax

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere e a una inmunoglobulina primatizada dirigido contra la subunidad PA (antígeno protector) de la bacteria *Bacillus anthracis*.

10 **Estado de la técnica**

El ántrax es una enfermedad infecciosa causada por una bacteria gram positiva, *Bacillus anthracis*. Esta bacteria es inmóvil, y forma esporas, muy resistentes, que germinan en una forma vegetativa cuando se encuentran en entornos tales como sangre o tejidos de seres humanos o animales. A pesar de su alta resistencia, las esporas no se reproducen, por el contrario, pueden sobrevivir decenas de años en el suelo.

Una infección por ántrax puede presentarse en tres formas: cutánea, pulmonar o digestiva. La infección pulmonar es la más frecuentemente mortal. En caso de inhalación, las esporas de *B. anthracis* pasan a los alveolos, donde son fagocitadas por macrófagos y células dendríticas, especialmente. Las esporas germinan en estas células y las formas vegetativas se multiplican en los ganglios. En ese momento, las bacterias pasan a la sangre, se reproducen de forma continua y producen toxinas, parcialmente responsables de la letalidad de la enfermedad. Las toxinas del ántrax se componen de tres proteínas distintas: el antígeno protector (PA, 83 kDa antes escisión enzimática intracelular y 63 kDa después de la escisión), el factor letal (LF, 90 kDa) y el factor edematoso (EF, 89 kDa). La toxina letal está compuesta por PA y LF; y la toxina edematosa, cuyo papel en la fisiología de la enfermedad es menor, de PA y EF.

La bacteria secreta estas proteínas como monómeros no tóxicos, y se ensamblan en la superficie de las células diana para formar complejos tóxicos.

30 Hasta el momento presente, varios antibióticos, tales como la penicilina, la doxiciclina y fluoroquinonas (por ejemplo la ciprofloxacina), se han utilizado para el tratamiento de infecciones por el ántrax.

No obstante, es posible que algunos de estos antibióticos no tengan efectos sobre ciertas cepas, resistentes a los antibióticos. En particular, es posible que algunos de estos tratamientos no puedan utilizarse en caso de terrorismo o guerra bacteriológica, cuando cepas resistentes a los antibióticos podrían diseminarse voluntariamente.

Además, puesto que los antibióticos no pueden inhibir la acción de la toxina del ántrax, es necesario que estos antibióticos se administren en estados iniciales de la infección, sin embargo, un diagnóstico precoz es difícil de establecer porque los síntomas iniciales son inespecíficos.

40 Se han desarrollado vacunas cuyo componente principal es el antígeno protector PA, pero solamente se utilizan en personas con elevada susceptibilidad de estar en contacto con *B. anthracis*. Además, debido a la necesidad de un período de varios meses para conseguir una inmunidad suficiente, estas vacunas no pueden utilizarse en situaciones de emergencia. En Francia, actualmente, ninguna de estas vacunas está autorizado para su uso en seres humanos. Por tanto, es necesario desarrollar nuevos enfoques terapéuticos y preventivos, así como antibióticos.

50 La inmunización pasiva con anticuerpos supone una estrategia eficaz para neutralizar la toxina. Se han realizado varios ensayos para neutralizar la toxina letal del ántrax mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno protector (PA) y el factor letal (LF). La neutralización de la toxina letal del ántrax mediante un anticuerpo puede realizarse por inhibición del enlace entre el PA y su receptor celular, inhibición de la escisión del PA, inhibición de la unión entre PA y LF o también la inhibición de la acción del LF, por ejemplo.

55 El desarrollo de novedosos anticuerpos que permitan neutralizar la toxina del ántrax tiene, por tanto, un interés general para la prevención y tratamiento eficaz del ántrax.

En un trabajo reciente, se inmunizó un macaco con el antígeno protector PA83 para obtener anticuerpos destinados a tratar la infección de seres humanos por ántrax. A partir de la médula ósea, los inventores amplificaron los genes que codifican los fragmentos de anticuerpos específicos de PA83 y los clonaron para obtener una biblioteca.

60 Un fragmento de elevada afinidad ($K_d=3,4$ nM) y muy neutralizante (concentración de inhibición del 50 % = $5,6 \pm 0,13$ nM), designado con el nombre de 35PA83, se aisló a continuación (Laffly et al., antimicrobial agents and chemotherapy, 2005, 49(8): 3414-3420). Laffly et al, 2008 (J Mol Biol, 378, 1094-1103) describen un método que permite aislar los anticuerpos dirigidos contra el antígeno protector de la toxina del ántrax con una afinidad elevada. Este documento describe una serie de anticuerpos, entre otros, los anticuerpos 6.20, con una afinidad de $0,18 \times 10^{-9}$ M. Los autores indican que las afinidades elevadas son excepcionales. El fragmento de inmunoglobulina 35PA83

neutraliza la toxina del ántrax impidiendo la interacción de PA con su receptor celular.

5 No obstante, a la vista del uso de este fragmento de inmunoglobulina en un uso médico (profiláctico o terapéutico), una mejora de su afinidad podría tener la ventaja de reducir la cantidad a administrar al paciente y reducir el coste del tratamiento. Por otra parte, debido al origen simio de este fragmento de inmunoglobulina, podría presentar riesgos de inmunogenicidad y alteración de su biodisponibilidad en el ser humano.

Objeto de la invención

10 Por tanto, la presente invención tiene por objeto suministrar una inmunoglobulina entera, de isotipo IgG1 o IgG2, dirigida contra el antígeno PA, obtenido a partir del fragmento de inmunoglobulina 35PA83, previamente modificados para mejorar su afinidad por el antígeno y presentar mayor parecido con los anticuerpos humanos.

15 La presente invención tiene, por tanto, como objeto una inmunoglobulina de clase G (IgG) dirigida contra el antígeno protector (PA) de la toxina del ántrax, que comprende las regiones variables de los anticuerpos 35PA83 cuyos residuos deben estar mutados, y regiones constantes de origen humano.

20 En particular, la invención tiene por objeto una inmunoglobulina de clase G (IgG) dirigida contra el antígeno protector (PA) de la toxina del ántrax, que comprende:

- una región variable de cadena ligera que tiene:
 - una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N° 1, o
 - una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N° 1 y que comprende además al menos una mutación seleccionada entre:
 - ningún/A (1) en la que un aminoácido A se ha añadido en la posición -4 de la secuencia SEQ ID N° 1, es decir, inmediatamente antes del resto N.º-3 si existe, y de forma predeterminada inmediatamente antes del resto N.º-2, y por defecto inmediatamente antes del resto N.º-1, y por defecto inmediatamente antes del resto N.º1
 - ningún/I (2) en la que un aminoácido I se ha añadido en la posición -3 de la secuencia SEQ ID N° 1, bien inmediatamente antes del resto N.º-2 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º1
 - ningún/Q (3) en la que un aminoácido Q se ha añadido en la posición -2 de la secuencia SEQ ID N° 1, bien inmediatamente antes del resto N.º-1 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto
 - ningún/L (4) en la que un aminoácido L se ha añadido en la posición -1 de la secuencia SEQ ID N° 1, bien inmediatamente antes del resto N.º1
 - Y/S, en la que el aminoácido Y en la posición 10 de la secuencia SEQ ID N° 1 se ha sustituido por el aminoácido S,
 - K/R, en la que el aminoácido K en la posición 14 de la secuencia SEQ ID N° 1 se ha sustituido por el aminoácido R,
 - H/R, en la que el aminoácido H en la posición 20 de la secuencia SEQ ID N° 1 se ha sustituido por el aminoácido R,
 - Lu, en la que el aminoácido L en la posición 100 de la secuencia SEQ ID N° 1 se ha sustituido por el aminoácido V,,

y

- una región variable de cadena pesada que tiene:
 - una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N° 2, o
 - una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N° 2 y que comprende además al menos una mutación seleccionada entre las mutaciones siguientes:
 - ningún/Q (1) en la que un aminoácido Q se ha añadido en la posición -6 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N.º-5 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-4, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-3, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-2, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto NO-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º1
 - ningún/V (2) en la que un aminoácido V se ha añadido en la posición -5 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N.º-4 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-3, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-2, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º1
 - ningún/Q (3) en la que un aminoácido Q se ha añadido en la posición -4 de la secuencia SEQ ID N° 2, es decir, inmediatamente antes del resto N.º-3 si existe, y de forma predeterminada inmediatamente antes del resto N.º-2, y por defecto inmediatamente antes del resto N.º-1, y por defecto inmediatamente antes

del resto N.^o-1

- ningún/L (4) en la que un aminoácido L se ha añadido en la posición -3 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N°-2 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1
- 5 - ningún/Q (5) en la que un aminoácido Q se ha añadido en la posición -2 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N°-1 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1
- ningún/E (6) en la que un aminoácido E se ha añadido en la posición -1 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N°1
- 10 - L/V, en la que el aminoácido L en la posición 5 de la secuencia SEQ ID N° 2 se ha sustituido por el aminoácido V,
- A/T, en la que el aminoácido A en la posición 17 de la secuencia SEQ ID N° 2. se ha sustituido por el aminoácido T,
- 15 - A/T, en la que el aminoácido A en la posición 113 de la secuencia SEQ ID N°2 se ha sustituido por el aminoácido T,
- V/L, en la que el aminoácido V en la posición 114 de la secuencia SEQ ID N° 2 se ha sustituido por el aminoácido L;

siendo dicha inmunoglobulina una IgG1 o una IgG2.

20 La presente invención tiene también por objeto un ácido nucleico que codifica la IgG de la invención, así como un vector que comprende este ácido nucleico, y una célula hospedadora que comprende este vector.

25 La presente invención tiene también por objeto una composición que comprende la IgG de la invención, así como una composición farmacéutica que comprende la IgG.

La presente invención tiene también por objeto el uso de la IgG de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección por *Bacillus anthracis*.

30 La presente invención también se refiere a un kit para detectar la toxina del ántrax, un método de detección in vitro de una toxina del ántrax, así como un inmunoconjugado que comprende la IgG de la invención.

Descripción de la invención

35 La presente invención describe, por tanto, una inmunoglobulina de clase G (IgG) dirigida contra el antígeno protector (PA) de la toxina del ántrax, que comprende:

- una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia SEQ ID N°1, y
- 40 - una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia SEQ ID N°2, y que comprende los restos de aminoácidos correspondientes a los restos Serina en la posición 25, Lisina en la posición 54 y Arginina en la posición 60,

caracterizada por que se trata de una IgG1 o de una IgG2.

45 Un primer ácido nucleico que tiene al menos un 90 % de identidad con un segundo ácido nucleico de referencia, tendrá al menos un 90 %, preferentemente al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,3 %, 98,6 %, 99 %, 99,6 % de identidad en nucleótidos con dicho segundo ácido nucleico de referencia.

50 Un primer polipéptido que tiene al menos un 90 % de identidad con un polipéptido de referencia, tendrá al menos un 90 %, preferentemente al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,3 %, 98,6 %, 99 %, 99,6 % de identidad de aminoácidos con dicho segundo polipéptido de referencia.

55 El "porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o entre dos secuencias de polipéptido", en el sentido de la presente invención, se determina comparando las dos secuencias alinearse de manera óptima, mediante una ventana de comparación.

60 La parte de la secuencia nucleotídica o de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender, por tanto, adiciones o deleciones (por ejemplo, "huecos") con respecto a la secuencia de referencia (que no comprende estas adiciones o deleciones) de forma que se obtiene un alineamiento óptimo entre las dos secuencias.

65 El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones en las que una base nucleica idéntica, o un resto de aminoácido idéntico, se observa en las dos secuencias comparadas, y dividiendo a continuación el número de posiciones en las que hay identidad entre los dos bases nucleicas, o entre los dos restos de aminoácidos, por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y después multiplicando el resultado por cien para obtener el porcentaje de identidad en nucleótidos de as dos secuencias entre sí, o el porcentaje de identidad en

aminoácidos de las dos secuencias entre sí.

El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación se puede llevar a cabo de forma informática mediante algoritmos conocidos.

5 De forma totalmente preferida, el porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante el programa informático CLUSTAL W (versión 1.82), fijándose los parámetros de la siguiente forma: (1) CPU MODE = ClustalW mp; (2) ALIGNMENT = "completo"; (3) OUTPUT FORMAT = "aln w/números"; (4) OUTPUT ORDER = "alineado"; (5) COLOR ALIGNMENT = "no"; (6) KTUP (word size) = "predeterminado"; (7) WINDOW LENGTH = "predeterminado"; (8) SCORE TYPE = "porcentaje"; (9) TOPDIAG = "predeterminado"; (10) PAIRGAP = "predeterminado"; (11) PHYLOGENETIC TREE/TREE TYPE = "ninguno"; (12) MATRIX = "predeterminado"; (13) GAP OPEN = "predeterminado"; (14) END GAPS = "predeterminado"; (15) GAP EXTENSION = "predeterminado"; (16) GAP DISTANCES = "predeterminado"; (17) TREE TYPE = "cladograma" y (18) TREE GRAP DISTANCES = "ocultar". La anotación de las mutaciones en la región variable de la cadena ligera y en la región variable de la cadena pesada de una anticuerpo de acuerdo con la invención, y de forma más general, de cualquier complemento relativo a la descripción de algunas realizaciones de los anticuerpos de la invención, el experto en la materia puede consultar la solicitud de patente francesa n.º FR 07/06744 presentada el 26 de septiembre de 2007 para un "anticorps contre les toxines du charbon", cuyo contenido se ha integrado en el Anexo, al finalizar la presente memoria descriptiva, de la page 52 a la página 80.

20 La presencia de un resto Serina en la posición 25 de la secuencia SEQ ID N° 2 corresponde a la mutación designada "31A" en la parte "35H" de la Figura 11, pudiéndose designar igualmente esta mutación como "G/S (31A)".

25 La presencia de un resto Lisina en la posición 54 de la secuencia SEQ ID N° 2 corresponde a la mutación "66" en la parte "35H" de la Figura 11, pudiéndose designar igualmente esta mutación como "R/K (66)".

30 La presencia de un resto Arginina en la posición 60 de la secuencia SEQ ID N° 2 pudiéndose designar igualmente esta mutación como "K/R (73)" y corresponde al resto Arginina en la posición 73 de la parte "35H" de la Figura 11.

De acuerdo con la invención, los restos "correspondientes" a los restos Serina en la posición 25, Lisina en la posición 54 y Arginina en la posición 60 consisten en los residuos anteriores, y:

- 35 (i) que están en la misma posición en la secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia SEQ ID N°2, o
 (ii) que están en una posición distinta, por ejemplo, por que la secuencia que tienen un 90 % de identidad con la secuencia SEQ ID N°2 comprende una o varias deleciones o adiciones de aminoácido(s), con respecto a la secuencia SEQ ID N° 2 de referencia.

40 La invención tiene también por objeto una inmunoglobulina de clase G (IgG) como se define anteriormente, **caracterizada por que** comprende:

- 45 - una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N° 1, y
 - una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°2

50 El fragmento de inmunoglobulina 35PA83, compuesto por una cadena ligera y un fragmento Fd, se ha obtenido mediante la inmunización un macaco con el antígeno protector PA83 del ántrax, como se describe en Laffly et al. (2005).

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

55 El anticuerpo no modificado (es decir, no mutado) precursor 35PA83 presenta una afinidad K_D igual a $3,4 \cdot 10^{-9}$ M. Esta constante de afinidad se ha calculado a partir de las constantes de asociación y disociación medidos en tiempo real mediante resonancia de plasmón superficial, como se explica en los ejemplos.

60 La región variable de cadena ligera de la IG de la invención (SEQ ID N°1) se deriva de la región variable de cadena ligera del fragmento de la inmunoglobulina 35PA83, cuya secuencia es accesible en los bancos informatizados, como Genbank, con los números CAH17921 y AJ810487.

Ventajosamente, la región variable de cadena ligera de la IG de la invención, que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°1, comprende además al menos una mutación seleccionada entre:

- 65 - ningún/A (1)

- ningún/I (2)
- ningún/Q (3)
- ningún/L (4)
- Y/S (14)
- 5 - K/R (18)
- H/R (24)
- L/V (124).

10 La mutación ningún/A (1) significa que un aminoácido A se ha añadido en la posición 1 de la secuencia de la parte "35L" de la figura 11 y en la posición -4 de la secuencia SEQ ID N° 1, bien inmediatamente antes del resto N°-3 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-2, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1.

15 La mutación ningún/I (2) significa que un aminoácido I se ha añadido en la posición 2 de la secuencia de la parte "35L" de la figura 11 y en la posición -3 de la secuencia SEQ ID N° 1, bien inmediatamente antes del resto N°-2 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1.

20 La mutación ningún/Q (3) significa que un aminoácido se ha añadido en la posición 3 de la secuencia de la parte "35L" de la figura 11 y en la posición -2 de la secuencia SEQ ID N° 1, bien inmediatamente antes del resto N°-1 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1.

25 La mutación ningún/L (4) significa que un aminoácido se ha añadido en la posición 4 de la secuencia de la parte "35L" de la figura 11 y en la posición -1 de la secuencia SEQ ID N° 1, bien inmediatamente antes del resto N°1.

La mutación Y/S (14) significa que el aminoácido Y en la posición 14 de la secuencia de la parte "35L" de la figura 11 y en la posición 10 de la secuencia SEQ ID N° 1 se ha sustituido por el aminoácido S.

30 La mutación K/R (18) significa que el aminoácido K en la posición 18 de la secuencia de la parte "35L" de la figura 11 y en la posición 14 de la secuencia SEQ ID N° 1 se ha sustituido por el aminoácido R.

La mutación H/R (24) significa que el aminoácido H en la posición 24 de la secuencia de la parte "35L" de la figura 11 y en la posición 20 de la secuencia SEQ ID N°1 se ha sustituido por el aminoácido R.

35 La mutación L/V (124) significa que el aminoácido L en la posición 124 de la secuencia de la parte "35L" de la figura 11 y en la posición 100 de la secuencia SEQ ID N°1 se ha sustituido por el aminoácido V.

40 Preferentemente, la adición de al menos una de estas mutaciones permite reducir la inmunogenicidad de la región variable de la cadena ligera de la IgG de la invención con respecto a la del fragmento 35PA83 de la que se deriva.

De manera particularmente ventajosa, la región variable de cadena ligera de la IgG de la invención, que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°1, comprende las mutaciones siguientes:

- ningún/A (1)
- 45 - ningún/I (2)
- ningún/Q (3)
- ningún/L (4).

50 De manera particularmente ventajosa, la región variable de cadena ligera de la IgG de la invención, que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N° 1, comprende las mutaciones siguientes:

- ningún/A (1)
- ningún/I (2)
- ningún/Q (3)
- 55 - ningún/L (4)
- Y/S (14)
- K/R (18)
- H/R (24)
- L/V (124).

60 Preferentemente, la adición de estos restos permite reducir la inmunogenicidad de la región variable de la cadena ligera de la IgG de la invención con respecto a la del fragmento 35PA83 de la que se deriva.

65 La región variable de la cadena pesada de la IgG de la invención (SEQ ID N°2) se deriva de la región variable del fragmento Fd del fragmento de inmunoglobulina 35PA83, cuya secuencia es accesible en los bancos informatizados, como Genbank, con los números CAH17920 y AJ810486.

ES 2 649 565 T3

Ventajosamente, la región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°2 comprende además una mutación seleccionada entre:

- 5 - ningún/Q (1)
- ningún/V (2)
- ningún/Q (3)
- ningún/L (4)
- ningún/Q (5)
- ningún/E (6)
- 10 - L/V (12)
- A/T (24)
- A/T (122)
- V/L (123).

15 La mutación ningún/Q (1) significa que un aminoácido Q se ha añadido en la posición 1 de la secuencia de la parte "35H" de la figura 11 y en la posición -6 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N°-5 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-4, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-3, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-2, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1.

20 La mutación ningún/V (2) significa que un aminoácido V se ha añadido en la posición 2 de la secuencia de la parte "35H" de la figura 11 y en la posición -5 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N°-4 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-3, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-2, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1.

25 La mutación ningún/Q (3) significa que un aminoácido Q se ha añadido en la posición 3 de la secuencia de la parte "35H" de la figura 11 y en la posición -4 de la secuencia SEQ ID N°2, bien inmediatamente antes del resto N°-3 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-2, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1.

30 La mutación ningún/L (4) significa que un aminoácido L se ha añadido en la posición 4 de la secuencia de la parte "35H" de la figura 11 está en la posición -3 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N°-2 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1.

35 La mutación ningún/Q (5) significa que un aminoácido Q se ha añadido en la posición 5 de la secuencia de la parte "35H" de la figura 11 y en la posición -2 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N°-1 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1.

40 La mutación ningún/E (6) significa que un aminoácido E se ha añadido en la posición 6 de la secuencia de la parte "35H" de la figura 11 y en la posición -1 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N°1.

45 La mutación L/V (12) significa que el aminoácido L en la posición 12 de la secuencia de la parte "35H" de la figura 11 y en la posición 5 de la secuencia SEQ ID N° 2 se ha sustituido por el aminoácido V.

50 La mutación A/T (24) significa que el aminoácido A en la posición 14 de la secuencia de la parte "35H" de la figura 11 y en la posición 17 de la secuencia SEQ ID N° 2 se ha sustituido por el aminoácido T.

55 La mutación A/T (122) significa que el aminoácido A en la posición 122 de la secuencia de la parte "35H" de la figura 11 y en la posición 113 de la secuencia SEQ ID N° 2 se ha sustituido por el aminoácido T.

La mutación V/L (123) significa que el aminoácido V en la posición 123 de la secuencia de la parte "35H" de la figura 11 y en la posición 114 de la secuencia SEQ ID N° 2 se ha sustituido por el aminoácido L.

Preferentemente, la adición de al menos una de estas mutaciones permite reducir la inmunogenicidad de la región variable de la cadena pesada de la IgG de la invención con respecto a la del fragmento 35PA83 de la que se deriva.

60 La región variable de la cadena pesada de la IgG de la invención (SEQ ID N°2) se deriva de la región variable del fragmento Fd del fragmento de inmunoglobulina 35PA83, cuya secuencia es accesible en los bancos informatizados, como Genbank, con los números CAH17920 y AJ810486. La región variable de la cadena pesada de la invención (SEQ ID NO:2) está modificada, con respecto a la región variable del fragmento de inmunoglobulina 35PA83, por que comprende las tres mutaciones siguientes: G/S (31A), R/K (66) y K/R (73). De manera ventajosa, estas tres mutaciones permiten mejorar la afinidad de la región variable de la cadena pesada de la IgG de la invención con respecto a la región variable del fragmento de inmunoglobulina 35PA83.

De manera particularmente ventajosa, la región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°2 incluye además las mutaciones siguientes:

- 5
- ningún/Q (1)
 - ningún/V (2)
 - ningún/Q (3)
 - ningún/L (4)
 - ningún/Q (5)
 - ningún/E (6)

10 De manera particularmente ventajosa, la región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°2 incluye además las mutaciones siguientes:

- 15
- ningún/Q (1)
 - ningún/V (2)
 - ningún/Q (3)
 - ningún/L (4)
 - ningún/Q (5)
 - ningún/E (6)
- 20
- L/V (12)
 - A/T (24)
 - A/T (122)
 - V/L (123).

25 Preferentemente, la adición de al menos una de estas mutaciones permite reducir la inmunogenicidad de la región variable de la cadena ligera de la IgG de la invención con respecto a la del fragmento 35PA83 de la que se deriva.

En una realización particular de la invención, la región variable de cadena ligera del anticuerpo (SEQ ID NO: 1) comprende las mutaciones siguientes:

- 30
- ningún/A (1)
 - ningún/I (2)
 - ningún/Q (3)
 - ningún/L (4),

35 y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo (SEQ ID NO: 2) comprende las mutaciones siguientes:

- 40
- ningún/Q (1)
 - ningún/V (2)
 - ningún/Q (3)
 - ningún/L (4)
 - ningún/Q (5)
 - ningún/E (6).

45 De manera ventajosa, la región constante de la cadena ligera de la IgG de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia SEQ ID N°3, y la región constante de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia SEQ ID N°4.

50 Para los fines de la descripción de la presente invención, el término "inmunoglobulina" se refiere a una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de una molécula de inmunoglobulina que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno particular. Fragmentos de inmunoglobulina bien conocidos son, por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv, scFv y Fd.

55 Las inmunoglobulinas de tipo G (IgG), son heterodímeros constituidos por 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras, unidas entre sí mediante puentes disulfuro. Cada cadena está constituida, en su posición del extremo N, por una región o dominio variable (codificada por los genes reordenados V-J para la cadena ligera y V-D-J para la cadena pesada) específica del antígeno contra el cual se dirige la inmunoglobulina y, en la posición del extremo C, de una región constante, constituida por un solo dominio CL para la cadena ligera o por 3 dominios (CH1, CH2 y CH3) para la cadena pesada. La asociación de los dominios variables y los dominios CH₁ y CL de las cadenas ligeras y pesadas forma las partes Fab, que están conectadas con la región Fc por una región bisagra muy flexible que permite a cada Fab fijarse a su diana antigénica, mientras que la región Fc, mediadora de las propiedades efectoras del anticuerpo, sigue estando accesible a los efectores inmunitarios, fagocitos o linfocitos citotóxicos, y el complemento; estas regiones constantes no están involucradas en el enlace con el antígeno. La región Fc, compuesta por 2 dominios globulares CH₂ y CH₃, está glicosilada en el dominio CH₂ con presencia, en cada una de las 2 cadenas, de un *N*-glicano bifurcado de tipo lactosaminico, unido a Asn 297.

60

65

En lo que respecta a la región variable, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo.

Un anticuerpo cuya región constante (Fc) se ha escindido enzimáticamente para conservar la región bisagra se denomina como un fragmento F(ab')₂ y conserva los dos sitios de unión al antígeno.

5 Asimismo, un anticuerpo cuya región constante, comprendida la región bisagra, se ha escindido enzimáticamente, o se ha producido sin esta región, se designa como un fragmento Fab y conserva uno de los dos sitios de unión al antígeno.

10 El fragmento Fd incluye las regiones VH y CH1.

En la región variable, se encuentran las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, complementary determining regions), también llamadas regiones hipervariables, que interactúan directamente con el antígeno. Por tanto, la modificación en 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 que se ha producido el anticuerpo. En el fragmento Fd de la cadena pesada y de la cadena ligera, se encuentran cuatro regiones marco (FR1 a 4) separadas respectivamente por tres CDR (CDR1 a 3).

20 Según la descripción anterior de los aminoácidos de la región variable de la cadena pesada, y de la región variable de cadena ligera de la IgG dirigida contra PA de la invención, el experto en la materia puede sintetizar o hacer sintetizar, ácidos nucleicos que codifican estas secuencias de aminoácidos.

25 Ventajosamente, las regiones constantes de cada una de las cadenas ligeras y cadenas pesadas de la IgG de la invención son regiones constantes humanas.

Preferentemente, las regiones constantes de cada una de las cadenas ligeras de la IgG de la invención son de tipo K. Todos los alotipos son adecuados para la realización de la invención, por ejemplo Km(1), Km(1, 2), Km(1, 2, 3) o Km(3), pero el alotipo preferido es Km(3).

30 La región constante de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo puede ser de tipo γ 1, de tipo γ 2, de tipo γ 3, estos tres tipos de regiones constantes tienen la particularidad de fijar el complemento humano, o también el tipo γ 4.

35 Preferentemente, la región constante de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo es de tipo γ 1, ya que un anticuerpo de ese tipo tiene la capacidad de generar una actividad ADCC en el mayor número de individuos (humanos). A tal efecto, todos los alotipos son adecuados para la realización de la invención, por ejemplo G1 m(3), G1 m(1, 2, 17), G1 m(1, 17) o G1 m(1,3). De manera preferente, el alotipo es G1 m(1,17).

40 De manera ventajosa, la región constante de cada una de las cadenas pesadas de la IgG de la invención es de tipo γ 1 y comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°4 y la región constante de cada una de las cadenas ligeras de la IgG de la invención comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°3.

45 De manera ventajosa, cada una de las cadenas ligeras de la IgG de la invención comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°5, y cada una de las cadenas pesadas de la IgG de la invención comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID N°6.

Otro objeto de la invención es un ácido nucleico que codifica la IgG de la invención.

50 La región variable de cada una de las cadenas ligeras de la IgG de la invención está codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 7, y la región variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo de acuerdo con la invención está codificada por la secuencia de ácido nucleico murino SEQ ID NO: 8.

55 En un aspecto particular de la invención, la región constante de cada una de las cadenas pesadas de la IgG de la invención está codificada por la secuencia de ácido nucleico humana SEQ ID NO: 9, y la región constante de cada una de estas cadenas ligeras está codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 10.

Más concretamente, cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo de acuerdo con la invención está codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 11, y cada una de las cadenas pesadas está codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 12.

60 Otro objeto de la invención es un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la IgG de la invención.

65 El término "vecteur" se refiere a un ácido nucleico en el que la secuencia de interés se puede insertar mediante restricción y posterior ligadura para el transporte entre distintos entornos genéticos o par la expresión en una célula hospedadora. Los vectores son, por ejemplo, los plásmidos, los cósmidos, los cromosomas artificiales de levadura (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 que se puede replicar en una célula hospedadora y que se caracteriza además 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 mediante restricción o ligadura de tal forma que se puede replicar o transcribir en ARN. Los vectores pueden contener además uno o
5 varios marcadores de selección o de identificación de las células que se han transformado o transfectado con el vector.

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

La presente invención incluye todos los vectores recombinantes que contienen secuencias codificantes para la transformación, transfección o terapia génica eucariota o procariota. Dichos vectores se pueden preparar según las técnicas convencionales de biología molecular y comprenderán, además, un promotor adecuado, opcionalmente una secuencia señal para la exportación o la secreción, y secuencias reguladoras necesarias para la transcripción de la
15 secuencia nucleotídica.

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 polihistidina que permite la purificación en columnas Ni^{2+} , o un ancla de la membrana de fago filamentosos que es especialmente útil para el cribado del banco, según la tecnología de
20 expresión en fago (phage display).

Uno de los vectores adecuado en el marco de la invención es una molécula de ADN recombinante adaptada para recibir y expresar una primera y una segunda secuencia de ADN, de manera que permita la expresión de anticuerpos heterodiméricos tales como un anticuerpo de longitud completa o de fragmentos $F(ab')_2$ o Fab de
25 acuerdo con la invención. Un vector de ese tipo suministra un sistema para clonar independientemente las dos secuencias de ADN en dos casetes separadas presentes en el vector, de manera que se formes dos cistrones separados para la expresión de un primer y un segundo polipéptido del anticuerpo heterodimérico. Un vector de expresión de ese tipo es un vector dicistrónico.

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

La presente invención tiene también por objeto células hospedadoras, procariotas o eucariotas, que comprenden un vector de acuerdo con la invención.

Ventajosamente, el vector de expresión de la invención permite la expresión de la cadena ligera de la IgG de la invención. En esta realización particular, el vector es una molécula de ácido nucleico en que la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 7 que codifica la región variable de cada una de las cadenas ligeras de la IgG, y la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO:10 que codifica la región constante de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo
40 se han insertado, para introducirlas y mantenerlas en una célula hospedadora. Permite la expresión de estos fragmentos de ácido nucleico extraños en la célula hospedadora porque tiene las secuencias indispensables (promotor, secuencia de poliadenilación, gen de selección) a esta expresión. Vectores de este tipo son bien conocidos del experto en la técnica, y pueden ser un adenovirus, un retrovirus, un plásmido o un bacteriófago, sin que esta lista sea limitativa. Además, cualquier célula de mamífero se puede utilizar como célula hospedadora, es decir, como célula que expresa los fragmentos de ácidos nucleicos contenidos en el vector de expresión de la
45 cadena ligera de la IgG de la invención, por ejemplo YB2/0, CHO, CHO dhfr- (por ejemplo CHO DX B11, CHO DG44), CHO Lec13, SP2/0, NS0, 293, BHK o COS.

Ventajosamente, el vector de expresión de la invención permite la expresión de la cadena pesada de la IgG de la invención. En esta realización particular, el vector es una molécula que permite la expresión de la IgG de la invención cuya cadena pesada está codificada por la secuencia de ácido nucleico SED ID N°: 12. Este vector es una molécula de ácido nucleico en que la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 8 que codifica la región variable de cada una de las cadenas pesadas de la IgG, y la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 9 que codifica la región constante de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo se han insertado, para introducirlas y mantenerlas en
50 una célula hospedadora. Permite la expresión de estos fragmentos de ácido nucleico extraños en la célula hospedadora porque tiene las secuencias indispensables (promotor, secuencia de poliadenilación, gen de selección) a esta expresión. Como se ha indicado anteriormente, el vector puede ser por ejemplo un plásmido, un adenovirus, un retrovirus o un bacteriófago, y la célula hospedadora puede ser cualquier célula de mamífero, por ejemplo YB2/0, CHO, CHO dhfr- (CHO DX B11, CHO DG44), CHO Lec13, SP2/0, NS0, 293, BHK o COS.

El vector de la invención puede incluir secuencias que codifican la cadena pesada y/o las cadenas ligeras de la inmunoglobulina de la invención.

Un ejemplo de vector que permite la expresión de las cadenas pesadas y ligeras de la IgG de la invención se proporciona en el ejemplo 2. Este vector es un vector único que contiene las dos unidades de transcripción de la
65 cadena pesada y de la cadena ligera de la IgG de la invención.

Otro objeto de la invención es una célula hospedadora que comprende el vector que se ha definido anteriormente.

Ventajosamente, la célula hospedadora de la invención se selecciona entre SP2/0, YB2/0, IR983F, el mieloma humano Namalwa, PERC6, las líneas CHO, especialmente CHO-K-1, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K6H6, NS0, SP2/0-Ag 14 y P3X63Ag8.653.

En un modo de realización preferido, el anticuerpo se produce en hibridoma de rata YB2/0 (célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, depositada en la American Type Culture Collection con el número ATCC CRL-1662). Esta línea se ha seleccionado por su capacidad de producir anticuerpos que tienen una actividad ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) mejorada con respecto a los anticuerpos de la misma estructura primaria producidos, por ejemplo, en CHO.

En un aspecto particular de la invención, la línea celular estable que expresa un anticuerpo de acuerdo con la invención, y más especialmente seleccionado entre el grupo anteriormente descrito, ha integrado el o los dos vectores de expresión de la cadena pesada y de la cadena ligera tales como los anteriormente descritos.

Otro objeto de la invención es una composición que comprende al menos una IgG de la invención.

Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende al menos una IgG de la invención.

Dicha composición farmacéutica comprende de manera preferida un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo corresponde, en el sentido de la invención, a un material no tóxico, que no interfiera 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 tal como una célula, un cultivo celular, un tejido o un organismo. Las características del vehículo dependerán de la vía de administración.

La presente invención se refiere al uso de al menos una IgG de la invención en la preparación de una composición farmacéutica o de un medicamento destinado al tratamiento o la prevención de una infección por *Bacillus anthracis*.

El término "prevención" corresponde a la prevención de la aparición de la enfermedad en un sujeto, en especial un ser humano, en el que la enfermedad no se ha declarado aún.

El término "tratamiento" corresponde a la inhibición de esta enfermedad, es decir, la detención de su desarrollo, su regresión, o a la desaparición de los síntomas y consecuencias de la enfermedad, o incluso a la separación de las causas de la enfermedad.

La IgG de la invención puede estar marcada. Los ejemplos de marcadores incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes, y compuestos bioluminiscentes.

Los métodos de enlace de un marcador a un anticuerpo son bien conocidos del experto en la materia.

Otra técnica de marcado consiste en enlazar el anticuerpo con haptenos de bajo peso molecular, pudiendo estar estos haptenos específicamente modificados por medio de una segunda reacción. Ejemplos de haptenos son la biotina, que reacciona con avidina, o el dinitrofenol, piridoxal o fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos específicos contra los haptenos.

Un objeto de la presente invención es suministrar un kit para la detección de una toxina del ántrax que comprende PA. Este kit comprende:

- un recipiente que contiene al menos una IgG anti-PA de la invención y que puede estar marcada o no,
- opcionalmente, un recipiente que comprende soluciones tampón
- y opcionalmente un recipiente que comprende medios de detección de la IgG marcada, tal como una proteína de unión a la biotina, por ejemplo avidina o estreptavidina, unida a una molécula indicadora, como un marcador fluorescente o enzimático. Este recipiente puede comprender también medios de detección de la IgG no marcada, es decir, básicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

La IgG de la invención se puede utilizar *in vitro*, por ejemplo en ensayos inmunológicos en los que se utilizan en fase líquida o vinculados a un vehículo en fase sólida. Los ejemplos de vehículos bien conocidos son el vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasa, celulosa natural o modificada, poliacrilamida, agarosa o magnetita. Los ejemplos de ensayos inmunológicos que utiliza la IgG anti-PA de la invención son radioinmunoensayos, marcados histoinmunológicos, ELISA, transferencias Western, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de inmunodifusión, ensayos de fijación del complemento, análisis FACS o también análisis con chips de proteínas.

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

- la puesta en contacto de la muestra con al menos una IgG anti PA de la invención, y
- la detección de la unión de dicho anticuerpo como indicador de la presencia de dicha toxina del ántrax.

5 La muestra biológica puede ser líquida: por ejemplo saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, suero o sangre, o sólido o semisólido, por ejemplo tejidos o materia fecal o un tejido sólido tal como se usa comúnmente en el diagnóstico histológico.

10 La presente invención tiene también por objeto proporcionar un método de detección *in vivo* de una toxina del ántrax, que comprende PA, en la que una IgG de acuerdo con la presente invención, y marcada, se administra a un sujeto. La cantidad de IgG marcada administrada debe ser suficiente para permitir la detección de la unión del anticuerpo a la toxina. La cantidad de IgG marcada administrada dependerá de factores como la edad y sexo del sujeto, así como de la fase 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 entre 0,1 mg/kg y 2 mg/kg.

15 Para realizar el diagnóstico *in vivo*, la IgG anti PA modificada de la invención debe estar unida a un radioisótopo directa o indirectamente a través de grupos funcionales. Los grupos funcionales comúnmente utilizados son, por ejemplo, ácido dietilén-triamina-pentaacético (DTPA) y el ácido etilén-diamina-tetraacético (EDTA). Los ejemplos de iones metálicos radioisótopos son ¹¹¹In, ⁹⁷Ru, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹⁵Zn, ⁸⁹Zr y ²⁰¹Tl.

20 Las IgG anti PA modificadas de la invención pueden estar marcadas también con un isótopo paramagnético para el diagnóstico por imagen de resonancia magnética (IRM) o por resonancia de spin electrónico (ESR). También se pueden usar radioisótopos gamma emisores de positrones, tales como ¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ¹⁶²Dy, ⁶⁸Ga, ⁵²Cr, y ²⁰Na.

25 Las IgG de la invención también se pueden utilizar *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 de las toxinas del ántrax o de los cambios en la concentración de la toxina PA en una muestra biológica.

30 La presente descripción describe un método de tratamiento de un sujeto, preferentemente un ser humano, que se puede infectar con *Bacillus anthracis*, en el que se administra a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo dirigido contra PA de acuerdo con la invención.

35 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad que es suficiente para efectuar el tratamiento cuando se administra a un sujeto que necesita dicho tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz depende del sujeto, de la fase de la enfermedad a tratar y del modo de administración, y puede determinarse de forma rutinaria por el experto en la materia.

40 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 avanzan hacia problemas graves de dificultad respiratoria y choque séptico. La inhalación del ántrax suele ser mortal.

45 La infección cutánea por ántrax se produce cuando la bacteria entra en la piel por una rotura cutánea existente. Esta infección produce en primer lugar una pápula, que se desarrolla en dos-tres días para dar una vesícula, y posteriormente una úlcera de 1-3 cm de diámetro con una área necrosada en el centro. La infección gastrointestinal por ántrax se desarrolla tras el consumo de carne contaminada y se caracteriza por una inflamación aguda del tracto intestinal.

50 Una cantidad terapéuticamente eficaz corresponde a una cantidad suficiente para reducir los síntomas de la enfermedad y la evolución de la infección. Esta cantidad puede variar con la edad, el sexo del sujeto y la fase de la enfermedad y se determinará 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.

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

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

65 La presente invención tiene también por objeto un inmunoconjugado que comprende una IgG de la invención unido, de manera directa o indirecta, a un agente terapéutico.

Dichos agentes terapéuticos incluyen agentes químicos, radionucleidos, agentes inmunoterapéuticos, citoquinas,

quimioquinas, toxinas o inhibidores de enzima. Los ejemplos de toxinas son la cadena de la difteria, la cadena A de la exotoxina, la cadena A del ricino, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeccina, la alfa-sarcina, las proteínas Aleurites fordii, las proteínas diantinas, las proteínas Phytolaca americana, el inhibidor momordica charantia, curcina, crotina, el inhibidor sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos. Los ejemplos de radionucleidos son ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re .

Ventajosamente, la IgG de la invención está asociada a un tratamiento profiláctico con tetraciclina. La IgG de la invención permite reducir la profilaxis basada en tetraciclina, deteniendo, de manera segura, tras un riesgo de exposición, con un tratamiento rápido ("tratamiento corto") de tetraciclina seguido de una inyección de la IgG de la invención.

Ventajosamente, la IgG de la invención está asociada a un tratamiento curativo con ciprofloxacina.

La presente invención se comprenderá mejor gracias al complemento de la descripción siguiente, que se refiere a los ejemplos de obtención de la IgG anti-PA.

Descripción de las figuras

En los ejemplos siguientes, que se proporcionan a título ilustrativo, se hará referencia las figuras del anexo:

Figura 1: esquema de la amplificación de la región VKV2 (región variable de cadena ligera de la IgG de la invención que contiene las mutaciones descritas en la tabla 1).

Figura 2: esquema de la amplificación de la región VHV2 (región variable de la cadena pesada de la IgG de la invención que contiene las mutaciones descritas en la tabla 2).

Figura 3: esquema del vector CHK463-23.

Figura 4: esquema del vector HK558-12.

Figura 5: profilaxis mediante IgG 35PA83 v2 (IgG de la invención que contiene las mutaciones descritas en las tablas 1 y 2). 2 mg/kg de la IgG 35PA83 v2 que permite un índice de supervivencia del 60 % y 5 mg/kg permiten una supervivencia completa. No se observó ningún evento nuevo hasta el 30º día.

Figura 6: profilaxis de la tetraciclina. La administración de tetraciclina se detuvo después del 7º día y todos los ratones mueren entre el 4º y el 7º día tras la detención del tratamiento.

Figura 7: profilaxis con doxiciclina, complementada o con la IgG 35PA83. Se inició tratamiento con tetraciclina (dosis diaria de 5 mg/kg) en los ratones A/J. Doce después, los animales se infectaron con 10 000 DL₅₀ de esporas Sterne. Las inyecciones de tetraciclina se detuvieron el Día 7 del tratamiento, en presencia o ausencia de una inyección de 35PA83 (1 o 2 mg/kg). No se observó ningún evento más allá del período de tiempo representado en la figura (500ª hora). Los efectos muy significativos se indican en la figura con un signo "****".

Figura 8: tratamiento con ciprofloxacina, IgG 35PA83 v2 o ambos. Ciprofloxacina o IgG 35PA83 v2 utilizada en solitario no permiten prácticamente supervivencia, mientras que una combinación de estas dos moléculas permite un índice de supervivencia del 80 %. No se observó ningún evento nuevo hasta el 30º día.

Figura 9: tratamiento con ciprofloxacina, complementada o con la IgG 35PA83. Ratones A/J se infectaron con 1000 DL₅₀ de esporas Sterne. Doce horas después de la infección, en dos grupos diferentes (10 animales en cada grupo), se inició un tratamiento de ciprofloxacina sola (25 mg/kg dos veces al día) durante cinco días, o se inyectó una dosis única de la IgG 35PA83 (10 mg/kg). En tres momentos temporales diferentes siguiendo la infección (12, 24 o 48 horas), estando representado cada tiempo por un grupo diferente de animales, los ratones recibieron un tratamiento combinado de ciprofloxacina (25 mg/kg dos veces al día durante cinco días) y una inyección de la IgG 35PA83 (10 mg/kg). No se observó ningún evento más allá del período de tiempo representado en la figura (150ª hora). Los efectos muy significativos se indican en la figura con un signo "***" ($p=0,03$) o "****" ($p=0,0007$).

Figura 10: Profilaxis pasiva con la IgG 35PA83. Se administró una inyección de 35PA83 (2 mg/kg o 5 mg/kg) doce horas antes de la infección (10 000 DL₅₀). Los ratones supervivientes más allá del 30º día se reinfectaron (10 000 DL₅₀) el Día 30. No se observó ningún evento más allá del período de tiempo representado en la figura (40ª hora). Los efectos muy significativos se indican en la figura con un signo "****" ($p=0,0001$).

Figura 11: esquema en forma de collar de perlas de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 35PA83 no mutado.

La representación IMGT en collar de perlas se realizó según la numeración IMGT. Los puntos indican las diferencias entre los genes humanos más similares a 35PA83 y 35PA83. Los círculos rayados corresponden a las posiciones que faltan según la numeración IMGT.

Descripción detallada de la invención

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de la biblioteca mutante de Fab (35PA83)

Materiales y métodos

Cepas E. coli

Se usaron las siguientes cepas de E. coli:

- 5 - 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 (Carte et al., 1985), utilizadas para la expresión de Fabs solubles.

10

Toxinas

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

15 Construcción de la biblioteca de mutantes 35PA83

Se construyó la variante del fragmento de inmunoglobulina 35PA83 para humanizarla. Esta variante se obtuvo realizando las mutaciones descritas en las tablas 3 y 4:

20

Tabla 1: Mutaciones para humanización de la cadena ligera de 35PA83

Resto número	35PA83	Hu35PA83
1	Ninguno	A
2	Ninguno	I
3	Ninguno	Q
4	Ninguno	L

Tabla 2: Mutaciones para la humanización del Fd de 35PA83

Resto número	35PA83	Hu35PA83
1	Ninguno	Q
2	Ninguno	V
3	Ninguno	Q
4	Ninguno	L
5	Ninguno	Q
6	Ninguno	E

25 A partir de esta variante humanizada, se generó una biblioteca de anticuerpos mutantes derivados del gen 35PA83 mediante mutagénesis Massive® (Biomethodes, Evry, Francia). Las mutaciones se introdujeron en las CDR de las cadenas pesada y ligera utilizando los codones NNS (N codifica A, T, G, o C et S codifica G o C). Las regiones CDR se definieron según Kabat et al. (Wu y Kabat 1970) e IMGT (Lefranc, Pommie et al. 2003).

30 La biblioteca de ADN se utilizó para transformar células SURE por electroporación. Tras adición de medio SB enriquecido en carfecilina al medio de cultivo e incubación durante 1 h a 37 °C, 1 ml del fago auxiliar VCSM13 (Andris-Widhopf et al., 2001) (aproximadamente 1012 ufp) se añadió al cultivo. Tras la incubación durante 2 h, se añadieron 70 µg/ml de kanamicina, y el cultivo se puso en agitación durante la noche a 37°C.

35 Selección de anticuerpos mediante fagos

Las partículas de fagos-Fab se purificaron y se concentraron a partir de 50 ml de cultivo mediante precipitación con PEG, y resuspendidas en 3 ml de PBS-BSA 1 %-azida, 0,02 % y filtradas con un filtro de 0,45 µm. El título de esta preparación de fagos era de aproximadamente 1010 ufp/ml. Los fagos-Fab se sometieron a tres ciclos de infección-selección con recuperación, correspondientes a 5, 10 y 15 lavados, respectivamente, como se ha descrito anteriormente (Andris-Widhopf, Rader et al. 2000).

40

Expresión de Fab soluble, extracción periplásmica y purificación

45 Cada variante de ADN se transformó en bacterias de la cepa de E. coli denominada HB2151, convertidas en 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 0,1 % de glucosa. Cuando el cultivo alcanzó una absorbancia a λ = 600 nm de 1,5, se realizó una inducción con IPTG 1 mM (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) durante 18 h a 22°C.

Los Fabs se extrajeron con sulfato de polimixina B (Sigma) y se purificaron en una columna de níquel (Ni-NTA spin

column, QIAGEN, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y posteriormente se dializaron con PBS 1X a 4°C durante 3 h.

Cuantificación del Fab soluble

5 La pureza del Fab se analizó mediante SDS-PAGE y su concentración se determinó mediante el programa informático Quantity One® (Biorad).

Medida en tiempo real mediante resonancia de plasmón superficial (SPR)

10 Las constantes de la cinética de la interacción entre PA83 y las variantes 35PA83 se determinaron utilizando el sistema Biacore X SPR (BIAcore, Uppsala, Suecia). El PA83 se inmovilizó sobre un chip sensible CM5 (Biacore) usando un procedimiento de acoplamiento de aminas por inyección de 30 µl de 2 µg/ml de PA83 en 10 mM de acetato de sodio pH 4,5. Para minimizar la probabilidad de segundo enlace, la K_D se midió usando un caudal elevado (30 µl/min) y una cantidad mínima de antígeno acoplado (aproximadamente 500 UR, unidades de resonancia). El índice de unión de diferentes concentraciones de Fab comprendidas de 5 a 400 nM en PBS se determinó a un caudal de 30 µl/min. Los datos de enlace se introdujeron en un modelo de langmuir 1:1 del programa informático de evaluación BIA (Biacore). Las constantes de asociación y disociación (k_{on} y k_{off} respectivamente) para el enlace del Fab al PA83 se determinaron a 35°C.

Análisis de las secuencias

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

Resultados

30 Se realizó una maduración por afinidad in vitro para generar nuevas variantes que presenten una mayor afinidad. Con este fin, se generó una biblioteca de variantes mediante mutación exclusiva de los restos de 6 CDR, es decir, en 73 posiciones. El tamaño de la biblioteca es de $5,4 \cdot 10^8$ transformantes. 45 clones plasmídicos independientes se secuenciaron para determinar la diversidad 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 mutación que aumentan la afinidad a PA.

35 El examen de la frecuencia de mutaciones para cada posición de la CDR diana en la biblioteca no seleccionada, comparada con la biblioteca seleccionada (tabla 1) mostró de determinadas posiciones no son tolerantes a la variación. De este modo, los restos que se encuentran en estas posiciones parecen ser los restos claves para el enlace con el antígeno, conservando la integridad del sitio de unión con el antígeno. En particular, los restos (H31-H40) de CDR1 se definen como los restos de contacto con el antígeno.

40 Parece que tuvo lugar una presión de selección notable durante el proceso de selección, ya que la biblioteca no seleccionada presenta una mayor diversidad en comparación con las secuencias seleccionadas, en particular en L-CDR1 y H-CDR1.

45 Entre todas las posiciones mutadas, una combinación de mutaciones mostró una afinidad claramente mejorada: el clon v2, cuyas afinidades y la cinética de unión se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Afinidad y cinéticas de unión para el Fab 35PA83 y el clon v2.

Clon precursor	Secuencia H	Secuencia L	KD (M)	Kon (M-1.s-1)	Koff (s-1)
35PA83	precursor	precursor	$3,4 \cdot 10^{-9}$	$9,3 \cdot 10^4$	$3,2 \cdot 10^{-4}$
Clon v2	G>S (31A)	precursor	$6,6 \cdot 10^{-10}$	$1,22 \cdot 10^5$	$8,1 \cdot 10^{-5}$
	R>K (66)				
	K>R (73)				

50 Las constantes de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) se determinaron mediante resonancia de plasmón superficial (BIAcore) y se calculó K_D como igual al cociente K_{off}/K_{on} .

55 El triple mutante v2 mostró una constante de disociación más baja ($K_{off} = 8,1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$) y una constante de asociación un poco más rápida ($K_{on} = 1,22 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) que 35PA83, dando como resultado un aumento en 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 (la CDR1 de la región variable de la cadena pesada) y dos mutaciones (R66K, K73R) en H-CDR2 (la CDR2 de la región variable de la cadena pesada).

Después del tercer ciclo, los fagos se seleccionaron en dos procesos adicionales de selección: expansión en pocillos recubiertos con el antígeno e incubación prolongada ("selección por incubación prolongada") o también usando el antígeno biotinilado soluble a concentración muy baja ("selección por elución con concentración muy baja del antígeno soluble").

5 **Ejemplo 2: construcción del vector de expresión HK558-12 para la expresión de la IgG quimérica macaco-ser humano 35PA83 v2**

10 La región variable de la cadena pesada (VH) de la variante seleccionada (v2) presenta tres mutaciones comparada con la de la variante humanizada del Fab 35PA₈₃: G→S (6ª resto de HI, según la nomenclatura de IMGT), R→K (2º resto de anclado de H2) y K→R (6ª resto del FR3 según la nomenclatura de IMGT).

15 El vector HK558-12 (véase la figura 4) se construyó a partir del vector genérico único optimizado CHK463-23-1 (véase la figura 3) mediante "doble" quimerización, es decir, adición a la secuencia de macaco v2 de regiones líder humanas en 5' (las secuencias de v2 clonadas en el plásmido pCOMB (Andris-Widhopf et al., 2000) no incluyen las secuencias líder), y las regiones constantes CK y G1 humanas en 3'.

1. Principio de los métodos

20 Se aplicaron técnicas clásicas de biología molecular para la construcción del vector HK558-12. Las secuencias de ADN de interés se amplificaron mediante PCR del conjunto (10 ciclos con enzima "Proofstart DNA polymerase" Qiagen ref 202 203) y se clonaron (digestión con una enzima de restricción y posterior ligadura) en un plásmido o vector de expresión. Los plásmidos recombinantes así obtenidos se introdujeron posteriormente en bacterias (transformación de las bacterias) para amplificación (cultivo de las bacterias) para obtener cantidades de vector
25 suficientes para la etapa de transfección. Los vectores producidos durante el cultivo se purificaron posteriormente y después se linealizaron con vistas a la transfección en las líneas YB2/0 y CHO.

1.1 Síntesis mediante PCR del conjunto de la región variable de cadena ligera de la variante v2 (VKv2)

30 La región VKv2 corresponde a la quimerización de las regiones:

- líder de la región variable de cadena ligera (VK) - inicio VK: secuencia humana Z0006 (número de registro) (en el grupo VK1, VK1 -13), selección CRSSA-IMGT:
- VK macaco (plásmido pComb3X, descrito en el artículo de Laffly et al., 2005, que contiene las secuencias VH y VL de v2).

La secuencia líder humana se añadió en 5' de VK macaco para proporcionar la siguiente secuencia:

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTC
CCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTG (SEQ ID N° 13)

(en cursiva: inicio VK humano)

Esta secuencia no contiene ninguno de los sitios de restricción utilizados para las clonaciones.

45 Amplificación de la región VKv2:

➤ Par de cebadores VK1_CA y VK2_CA

VK1_CA : 5'-
CTCAGTACTAGTGCCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCT-3' (SEQ ID
N° 14)

VK2_CA : 5'-
ACCTGGGAGCCAGAGCAGCAGAAGCCCCAGGAGCTGAGCGGGGA-3' (SEQ ID N°
15)

50 Este par de cebadores permite introducir el sitio Spe I y el principio de la secuencia líder correspondiente al líder VK humano (VK1-13 Z00006, número de registro) más cercano a la secuencia de v2.

El amplicón obtenido corresponde al amplicón 1 (78 pb).

➤ Par de cebadores VK3_CA y VK4_CA

VK3_CA : 5'-

TGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGACCCA-3 (SEQ ID N° 16)'

VK4_CA : 5'-

CTCCCACATATGCAGACAGGGACGATGGAGACTGGGTCAACTGGA-3' (SEQ ID N° 17)

5 Este par de cebadores permite introducir el resto de la secuencia líder de la región 5' de VK humano (VK1-13 Z00006) y el principio de VK de V2. El amplicón obtenido corresponde al amplicón 2 (75 pb).

➤ Par de cebadores VK1_CA y VK4_CA

10 *VK1_CA :* 5'-

CTCAGTACTAGTGCCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCT-3' (SEQ ID N° 18)

VK4_CA : 5'-

CTCCCACATATGCAGACAGGGACGATGGAGACTGGGTCAACTGGA-3 (SEQ ID N° 19)'

Este par de cebadores permite obtener el amplicón 3 (136 pb) por PCR del conjunto de amplicones 1 y 2.

15 ➤ Par de cebadores VK_CA_Nde y VK_CA_Dra

VK_CA_Nde : 5'-TCGTCCCTGTCTGCATATGTGGGAG-3' (SEQ ID N°20)

VK_CA_Dra : 5'-

GATGAAGACACTTGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATATCCAG-3 (SEQ ID N° 21)'

20 Este par de cebadores permite obtener el amplicón 4 (327 pb) usando como matriz el plásmido pCOMB v2. Además, el amplicón 4 contiene antes región VK humana que permite la última PCR del conjunto con el amplicón 3.

➤ Par de cebadores VK1_CA y VK_CA_Dra

VK1_CA : 5'-

CTCAGTACTAGTGCCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCT-3' (SEQ ID N° 22)

VK_CA_Dra : 5'-

GATGAAGACACTTGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATATCCAG-3 (SEQ ID N° 23)'

25 Este par de cebadores permite obtener el amplicón 5 (438 pb) por PCR del conjunto de amplicones 3 y 4. Permite la concatenación de las secuencias líder VK humana y del VK macaco.

Las secuencias de los cebadores y de los amplicones obtenidos se presentan en la figura 1.

30 El amplicón 3 se obtiene por PCR del conjunto de amplicones 1 y 2 introduciendo el sitio Spe I, la secuencia líder VK humana y el principio de la secuencia VK de v2. El amplicón 4 corresponde a la región codificante VK de v2.

El amplicón 5 final se obtiene por PCR del conjunto de amplicones 3 y 4 para permitir la concatenación de secuencias líder VK humana y VK macaco.

5 1.2 Síntesis mediante PCR del conjunto de la región variable de la cadena pesada con la variante v2 (VHV2)

La región VHV2 corresponde a la quimerización de las regiones:

- 10 - líder VH - inicio VH: secuencia humana M29812 (número de registro) (en el grupo VH4, VH4-59). Los genes V humanos que codifican las secuencias más cercanas a 35PA83: IGHV4-59*01 para Fd y IGKV1-13*02 para la cadena ligera (nomenclatura IMGT), mutadas como se describe anteriormente
- VH macaco (plásmido pComb3X)

La secuencia humana se añadió en 5' de VH macaco para proporcionar la secuencia siguiente:

15 ATGAAACATCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTC *CTGTCCCAGGTGCAGCTG-CAGGAGT* (SEQ ID N° 24)

(en cursiva: inicio VH humano)

20 Esta secuencia no contiene ninguno de los sitios de restricción utilizados para las clonaciones.

La figura 2 muestra la síntesis de la región VHV2 con los diferentes pares de cebadores y amplicones obtenidos.

25 1.2.1 Amplificación de la región VHV2

La amplificación de la región VHV2 se esquematiza en la figura 2.

➤ Par de cebadores VH1_CA y VH2_CA

VH1_CA : 5'-
CTCAGTGCTAGCGCCGCCACCATGAAACATCTGTGGTTCTTCCTTCT-3 (SEQ ID N° 25)'

30 *VH2_CA :* *5'-CCCATCTGGGAGCTGCCACCAGGAGAAGGAAGAACCACA-3*
(SEQ ID N° 26)'

Este par de cebadores permite introducir el sitio Nhe I y el principio de la secuencia líder correspondiente al líder VH humano (VH4-59 M29812, los genes V humanos que codifican las secuencias más cercanas a 35PA83: IGHV4-59*01 para Fd y IGKV1-13*02 para la cadena ligera (nomenclatura IMGT), mutadas como se describe anteriormente) más cercanas a la secuencia de v2. El amplicón obtenido corresponde al amplicón 1 (70 pb).

➤ Par de cebadores VH3_CA y VH4_CA_mut

VH3_CA : 5'-
TGGCAGCTCCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCAGCTGCAGG-3 (SEQ ID N° 27)'

VH4_CA_mut : *5'-CAGTCCTGGTCCCGACTCCTGCAGCTGCACCTGGG-3'*
(SEQ ID N° 28)

40 Este par de cebadores permite introducir el resto de la secuencia líder, es decir, la región 5' de VH humano (VH4 M29812) y el principio de la secuencia VH de v2. El cebador VH4_CA suprime por mutagénesis un sitio Apa I del inicio de VH. El amplicón obtenido corresponde al amplicón 2 (59 pb).

45 ➤ Par de cebadores VH1_CA y VH4_CA_mut

VH1_CA : *5'*
CTCAGTGCTAGCGCCGCCACCATGAAACATCTGTGGTTCTTCCTTCT-3 (SEQ ID N°

29)'

VH4_CA_mut : *5'-CAGTCCTGGTCCCGACTCCTGCAGCTGCACCTGGG-3'*
 (SEQ ID N° 30)

Este par de cebadores permite obtener el amplicón 3 (111 pb) por PCR del conjunto de amplicones 1 y 2.

- 5 ➤ Par de cebadores 5VH_CA_mut y 3VH_CA_Apa

5VH_CA_mut : *5'-CAGCTGCAGGAGTCGGGACCAGGACTG-3'* (SEQ ID N°31)

3VH_CA_Apa : *5'-ACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGAC-*
3' (SEQ ID N° 32)

- 10 Este par de cebadores permite obtener el amplicón 4 (392 bases) usando como matriz el plásmido pCOMB V2. Además, el amplicón 4 contiene antes región VH humana que permite la última PCR del conjunto.

- Par de cebadores VH1_CA y 3VH_CA_Apa

VH1_CA : *5'*
CTCAGTGCTAGCGCCGCCACCATGAAACATCTGTGGTTCTTCCTTCT-3' (SEQ ID N°
 33)

3VH_CA_Apa : *5'-ACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGAC-*
3' (SEQ ID N° 34)

- 15 Este par de cebadores permite obtener el amplicón 5 (476 pb) por PCR del conjunto de amplicones 3 y 4. Permite la concatenación de las secuencias líder VH humana y VH macaco.

- 20 Las secuencias de los cebadores y de los amplicones obtenidos se presentan en la figura 2.

- El amplicón 3 se obtiene por PCR del conjunto de amplicones 1 y 2 introduciendo el sitio Nhe I, la secuencia líder VH humana y el principio de la secuencia VH de v2. El amplicón 4 corresponde a la región codificante VH de v2.

- 25 El amplicón 5 final se obtiene por PCR del conjunto de amplicones 3 y 4 para permitir la concatenación de secuencias líder VH humana y VH macaco.

1.3 Secuenciación y verificación por la FDA (Food and Drug Administration) del vector final

- 30 La secuenciación se realizó mediante la técnica de Sanger (o método de los terminadores de cadena, ref.: Sanger F. et al, 1977, PNAS 74: 5463).

- 35 Esta técnica utiliza la incorporación aleatoria de didesoxinucleótidos (ddNTP), o "terminadores", para general, a partir de un extremo fijo (zona de fijación del cebador de secuenciación), terminando todos los fragmentos en una base dada (A, C, G o T). El análisis de estos fragmentos en un secuenciador automático (separación dependiendo del tamaño y detección) permite definir el orden de las diferentes bases y por lo tanto la secuencia de un ADN dado.

- Las secuenciaciones se realizaron según el nivel de calidad " FDA". Se trata del nivel de calidad máximo, con doble cobertura de la doble hebra del ADN secuenciado, un mínimo de redundancia de 4 veces, una precisión del 100 %, instrumentos específicos, la redacción de un informe de calidad y el archivo de la documentación generada.

- 40 Tras la secuenciación, las secuencias proporcionadas por el prestador se compararon mediante alineación (programa informático AlignX, Vector NTI, Invitrogen) con la secuencia teórica esperada.

1.4 Cebadores de cribado por PCR --> Cebador 5prsvbis

5'-GCTCGATACAATAAACGCCA-3 (SEQ ID N°35)'

5 Cebador localizado en el intrón de la UT (unidad de transcripción) K o H, utilizada con CK4 o GSP2ANP, permite la detección de las inserciones VK (amplicón de 781 pb) y VH (amplicón de 821 pb) tras la clonación.

➤ Cebador CK4

10 5'-TCTGGGATAGAAGTTATTCAG-3 (SEQ ID N°36)'

Cebador situado en 5' de la región constante CK humana, utilizado con 5prsvbis, permite la detección de las inserciones VK después de la clonación.

15 ➤ Cebador GSP2ANP

5'-GGAAGTAGTCCTTGACCAGGCAG-3' (SEQ ID N° 37)

20 Cebador situado en 5' de la región constante G1 humana, utilizado con 5prsvbis, permite la detección de las inserciones VH después de la clonación.

1.5 Vector intermedio K558-12

1.5.1 Clonación en el vector CHK463-23

25 Esta etapa realiza la quimerización macaco-ser humano de la cadena kappa de la IgG 35PA₈₃ v2.

Después de la amplificación por PCR de conjunto y digestión con Spe I y Dra III, la secuencia VKv2 se clonó en el vector CHK463-23 en los sitios únicos Spe I y Dra III previstos a tal efecto.

30 Tras la ligadura, las colonias recombinantes se cribaron para determinar la presencia de la inserción mediante PCR con los cebadores 5prsvbis y CK4 (amplicón de 781 pb).

35 De los 23 clones bacterianos cribados mediante la PCR, 20 eran recombinantes, portadores de la inserción VKv2. Tras la purificación de los plásmidos, los clones 1 a 8 se controlaron mediante restricción con Nde I (8536, 1246, 943 bases), Dra III (linealización) y Spe I (linealización).

1.5.2 Secuenciación de la región VKV2 del vector intermedio K558-12

40 Los 8 clones recombinantes identificados se controlaron mediante secuenciación con el cebador CK4.

Los clones 2, 3, 4, 5 y 8 tienen una secuencia correcta entre los sitios de clonación Spe I y Dra III. No obstante, los clones 1 y 6 presentaban mutaciones, y el clon 7 no dio resultados aprovechables.

45 El clon 55806231-2 se guardó para continuar la construcción del vector de expresión HK558-12.

1.6 Vector final HK558-12

1.6.1 Clonación en el vector K558-12

50 Esta etapa realiza la quimerización macaco-ser humano de la cadena pesada del anticuerpo (IgG 35PA₈₃ v2).

55 Después de la amplificación por PCR de conjunto y digestión con Nhe I y Apa I, la secuencia VHv2 se clonó en el vector intermedio K558-12 en los sitios únicos Nhe I y Apa I, previstos a tal efecto. Tras la ligadura, las colonias recombinantes se cribaron para determinar la presencia de la inserción mediante PCR con los cebadores 5prsvbis y GSP2ANP (amplicón de 821 pb). De los 22 clones bacterianos cribados mediante la PCR, 18 eran recombinantes, portadores de la inserción VHv2.

1.6.2 Secuenciación de la región VHv2 del vector final y control mediante restricción

60 Tras la purificación, los plásmidos de los clones 1 a 5, 7, 9 y 11 se comprobaron mediante secuenciación con el cebador GSP2ANP.

Los clones 2, 4, 7 y 9 tienen una secuencia correcta entre los sitios Nhe I y Spe I mientras que los otros cuatro

clones presentan mutaciones.

5 Los controles de restricción se realizaron sobre los clones 2, 4, 7 y 9. El análisis mediante restricción con Nhe I (linealización), Apa I (linealización) y Bgl II + Nde I (2900, 2222, 1975, 1879, 1246, 934, 9 pb) permitió confirmar que los cuatro clones tenían el perfil de restricción esperado.

El clon 55806298-9 se seleccionó para la expresión del anticuerpo quimérico macaco-ser humano (IgG 35PA₈₃). El esquema de este vector se presente en la figura 4.

10 1.6.3 Control del vector final mediante digestión

Una digestión Not I (linealización) y una doble digestión Bgl II + Nde I (2900, 2222, 1975, 1880, 1246, 934, 9 pb) se llevaron a cabo para controlar el plásmido purificado procedente del clon 55806298-9 seleccionado.

15 El perfil de restricción obtenido corresponde a lo esperado, el clon 55806298-9 se secuenció con calidad FDA. La secuencia es conforme a lo esperado.

1.6.4 Preparación del vector HK558-12 para transfección

20 La preparación del vector HK558-12, linealizado con Not I (véase el párrafo 1.6.3), en tampón TE (Tris 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM) se conservó a -20°C antes de ajustar a la concentración de 1 µg/µl y entrega al grupo de Ingeniería celular para su transfección en las líneas YB2/0 y CHO.

25 **Ejemplo 3: obtención de transformants productores del anticuerpo monoclonal quimérico macaco-ser humano 35PA₈₃ v2 dirigido contra el antígeno protector del ántrax.**

El anticuerpo 35PA₈₃ v2 se produjo en las líneas YB2/0 (anticuerpo EMABling®) y CHO (anticuerpo no EMABling®) para estudiar el impacto de la glicosilación sobre su actividad neutralizante de toxinas *in vitro* e *in vivo*.

30 Para las experimentaciones siguientes, la técnica ELISA aplicada se realizó en las condiciones siguientes:

35 Placas de 96 pocillos microtitulados (maxisorp, Nunc, Dinamarca) se revistieron con PA diluido en PBS (5 µg/ml, 100 µl por pocillo), durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon por adición de 200 µl de PBS-BSA 5 % a 37°C durante 1 hora, y los sueros diluidos en serie en PBS-Tween 20 0,1 %-BSA 1 % se incubaron (100 µl por pocillo) a 37°C durante 2 horas. Un conjugado de fosfatasa alcalina con anti-IgG de ratón, o "anti-human IgG alkaline phosphatase conjugate" (Sigma) se incubaron (1/10 000) a 37°C durante 1 hora. Un sustrato fosfato de p-nitrofenilo se incubó a continuación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los resultados se determinaron por medida de la absorbancia a 405 nm con un lector de microplacas automatizado. (iEMS reader MF, Labsystems, Helsinki, Finlandia). El último punto de dilución cuya reversión determina el título del suero, se determina cuando se proporciona una señal inferior o igual a 2 veces el suero no expuesto utilizado como control negativo.

40 El esquema de obtención de los transformants en la línea YB2/0 se ilustra en la Tabla 4, al finalizar la presente memoria descriptiva.

45 1.1 Control de la calidad de la transformación

➤ Índice de transformación. El índice de transformación se evaluó sobre el índice de proliferación de células en P96 cinco semanas después del cultivo en D+3 en medio selectivo.

50 En una selección simple con el agente selectivo G418, el índice de transformación es de aproximadamente 1/500 a 1/900. En selección doble con los agentes selectivos G418 y MTX (metotrexato), es superior a 1/2200.

➤ Índice de producción medio

55 Se realizaron 3 combinaciones de 8 pocillos P24 cuando los pocillos se rellenaron con el % de células para conseguir una producción máxima (D+7) para evaluar la producción media.

60 Estas combinaciones permitieron evaluar las características medias de la población considerada y permitieron garantizar que se conseguía un nivel mínimo de estas características, aunque los datos de estos transformants aún no están disponibles.

La producción media con el vector HK558-12 y mezcla testigo de vectores es, respectivamente, de

1,2 µg/ml y de 3,3 µg/ml.

65

1.2 Selección de cloides

➤ Índice de producción: primer diagnóstico de los cloides más productores

- 5 La producción de IgG humanas se determinó por la técnica ELISA sobre sobrenadantes de los pocillos de P96 con doble selección que contenían $\frac{3}{4}$ de células para realizar una primera clasificación de los cloides respecto de sus capacidades de producción.

- 10 Se realizaron tres diagnósticos sucesivos (cada 2-3 días) y se seleccionaron los 10 mejores productores de cada diagnóstico. Para 528 transformantes, 27 se siguieron y se mantuvieron en P24 y se realizó en paralelo un estudio de su productividad en D+3 y su producción máxima (D+7).

➤ Productividad en D+3 y producción máxima (D+7)

- 15 Los 15 cloides más productores seleccionados con una productividad mayoritariamente superior a 5 pcd y una producción máxima superior a 10 $\mu\text{g/ml}$ se amplificaron celularmente en medio selectivo (doble selección) para su conservación en nitrógeno líquido.

➤ Índice de fucosa

- 20 Se realizó una con la técnica ELISA una medida del índice de fucosa sobre el sobrenadante de los 15 cloides seleccionados en D+3 y D+7.

1.3 Selección del cloide DD12 y producción de la IgG en cilindro

- 25 El cloide DD12 se guardó para la producción de la IgG en cilindros (19 l) ya que es el mejor cloide en lo que respecta a los criterios de selección de productividad (11,6 pcd), producción máxima (20,17 $\mu\text{g/ml}$) e índice de fucosa (26,9 % a D+3 y 26,7 % a D+7).

- 30 Se produjeron 461 mg de anticuerpos para la purificación. Tras concentración (15 veces) y purificación, se obtuvieron 351 mg de anticuerpos, es decir, una cantidad suficiente para los ensayos preliminares *in vivo* a realizar.

1.4 Formación de colonias de 3 clones

- 35 Los 3 cloides más productores DD12, FH2 y GA11 (productividad superior a 10 pcd, producción máxima superior a 20 $\mu\text{g/ml}$ e índice de fucosa menor del 33 %) se clonaron mediante dilución límite para prever una posible inestabilidad de los transformantes.

➤ Producción de IgG: primer diagnóstico de los clones más productores

- 40 La producción de IgG humanas se determinó por la técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) sobre sobrenadantes de los pocillos de P96 que contenían $\frac{3}{4}$ de células para realizar una primera clasificación de los clones respecto de sus capacidades de producción.

- 45 Se realizaron dos diagnósticos sucesivos (con 7 días de separación) y se seleccionaron los 8 mejores clones productores de cada cloide. La productividad es mayor de 6 $\mu\text{g/ml}$.

➤ Productividad a D+3

- 50 La productividad a D+3 de estos 24 clones se determinó para seleccionar los 15 clones más productores, es decir 5 clones/cloides. Es mayoritariamente superior a 4 pcd.

Los 15 clones seleccionados se amplificaron celularmente para su conservación en nitrógeno líquido.

1.5 Selección del clon DD12-8F2

El clon DD12-8F2 se guardó como el clon mejor según los criterios de selección de productividad (6,6 pcd) e índice de fucosa a D+3 (27,8 %).

- 60 Las características del clon DD12-8F2 son parecidas a las de su cloide precursor DD12 salvo por la productividad (D+3) que es más baja debido al uso de medios diferentes. Puesto que la productividad de los clones es homogénea, se valida la estabilidad del cloide.

1.6 Obtención de transformants en la línea CHO

El diagrama de flujo que corresponde a la obtención de transformantes productores de anticuerpos 35PA83 v2 en la línea CHO se representa en la Tabla 5 al finalizar la presente memoria descriptiva.

5

2.1 Control de la calidad de la transformación

Índice de transformación

10 El índice de transformación se evaluó sobre el índice de proliferación de células en P96 cinco semanas después del cultivo en D+3 en medio selectivo.

2.2 Selección de cloides

15 ➤ Índice de producción: primer diagnóstico de los cloides más productores

La producción de IgG humanas se determinó por la técnica ELISA sobre sobrenadantes de los pocillos de P96 con selección simple y doble que contenían ¼ de células para realizar una primera clasificación de los cloides respecto de sus capacidades de producción.

20

Se realizaron tres diagnósticos sucesivos (cada 2-4 días) y se seleccionaron los 10 mejores productores de cada diagnóstico. Para 953 transformantes, 30 se siguieron y se mantuvieron en P24 y se realizó en paralelo un estudio de su productividad en D+4 y su producción máxima (D+7).

25 ➤ Productividad en D+4 y producción máxima (D+7)

Los 15 cloides más productores seleccionados con una productividad mayoritariamente superior a 1 pcd y una producción máxima superior a 1 µg/ml se amplificaron celularmente en medio selectivo (selección simple o doble dependiendo de las condiciones de obtención) para su conservación en nitrógeno líquido.

30

➤ Índice de fucosa

Se realizó una con la técnica ELISA una medida del índice de fucosa sobre el sobrenadante de los 15 cloides seleccionados en D+7.

35

El índice de fucosa de las IgG producidas en la línea CHO es generalmente superior al 75 %.

2.3 Amplificación génica

40 Las transformaciones que presentan índices de producción bajos y que no permiten producir las cantidades deseadas de anticuerpos, se llevó a cabo una amplificación génica para aumentar el número de copias de vectores integrados y, por tanto, la productividad de los cloides amplificados.

45 La amplificación génica se llevó a cabo en 3 cloides (13G8, 9D4 y 8F11) y 2 grupos de cloides (1 combinación de 4 cloides (PA1) y 1 combinación de 8 cloides (PA2)). Esta selección se realizó teniendo en cuenta el conjunto de los resultados obtenidos para la productividad D+4, la producción máxima y el índice de fucosa.

50 La amplificación génica se realizó mediante replicación de las células en medio de cultivo selectivo con G418 y MTX. La primera etapa de amplificación se realizó con una concentración de MTX de 5 nM para los cloides obtenidos sin MTX y de 40 nM para los cloides obtenidos con MTX 10 nM. A continuación se realizó la producción de IgG en D+4.

Siguieron otras etapas de amplificación aumentando la concentración de MTX 4 veces durante la segunda etapa de la amplificación y en 16 durante la tercera.

55 El estudio de las producciones D+4 muestra un aumento en la producción de la IgG durante el proceso de amplificación. Efectivamente, la productividad es aproximadamente cuatro veces superior a la obtenida antes de la amplificación génica.

2.4 Selección de dos cloides y producción en rodillo del cloide 13G8

60

Los cloides 13G8 y 9D4 presentan el mayor índice de producción tras la amplificación con un máximo de productividad alcanzado en la segunda etapa de la amplificación.

65 Por tanto, los cloides 13G8 (20 nM MTX) y 9D4 (160 nM MTX) se amplificaron celularmente en medio selectivo para su conservación en nitrógeno líquido.

Tras la determinación del índice de fucosa realizado para las IgG purificadas obtenidas con los dos cloides 13G8 y 9D4, el cloide 13G8 (20nM MTX) fue seleccionado para la producción de IgG en cilindro (5,5 l). El índice de fucosa de las IgG purificadas es del 76,6 %.

- 5 Se produjeron 65,5 mg de IgG para la purificación. Tras la purificación, se obtuvieron 46,2 mg de anticuerpos.

2.5 Conclusión

- 10 Para la producción en la línea YB2/0, el cloide DD12 se seleccionó como el mejor para el conjunto de criterios de selección con una productividad de 11,6 pcd, una producción máxima de 20,17 µg/ml y un índice de fucosa de aproximadamente 27 %.

La producción en cilindro (19 l) de este cloide permitió obtener 351 mg de anticuerpos purificados con un índice de fucosa del 26 %.

- 15 Para la producción en la línea CHO, el cloide 13G8 (20 nM MTX) se seleccionó como el mejor para el conjunto de criterios de selección con una productividad de 8,2 pcd y un índice de fucosa en IgG purificada del 76,6 %.

- 20 La producción en cilindro (5,5 l) de este cloide permitió obtener 46,2 mg de anticuerpos purificados con un índice de fucosa del 84 %.

Las cantidades de anticuerpos purificados producidas en las dos líneas son por tanto suficientes para conseguir realizar los primeros ensayos *in vivo*.

25 Ejemplo 4: Ensayos de neutralización *in vitro*

- Después de la producción de DD12 en células YB2/0, se recuperó el sobrenadante del cultivo celular, se concentró 15 veces, y a continuación se sometió a una cromatografía de afinidad por medio de una proteína recombinante de A-Sefarosa. Se aplicó una segunda etapa de purificación mediante la columna de intercambio catiónico HiPrep 16/10 SP FF. La integridad de la IgG purificada y la ausencia de contaminantes se controló mediante SDS-PAGE y ELISA para la unión al PA83 recombinante.

- 30 Las afinidades se midieron mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) con BIAcore™ (Biacore Uppsala, Suecia). PA83 (List biological laboratories, Campbell, CA) inmovilizado a un máximo de 210 UR sobre un chip de CM5 (Biacore) mediante un enlace amina, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Durante la medición se mantuvo un caudal de 30 µl/min. Para cada medición, un mínimo de 6 diluciones de la IgG en tampón HBS-EP (Biacore), con concentraciones comprendidas entre 10 y 0,1 µg/ml, se analizaron durante 1900 segundos. Después de cada dilución de IgG, el chip se regeneró con glicina pH 1,5 (Biacore), con un caudal de 10 µl/min durante 30 segundos. Las constantes se calcularon mediante un método de análisis bivalente (Karlsson et al. 1991), y se comprobó con ensayos de consistencia interna (Schuck et al. 1996).

- 45 El ensayo de neutralización *in vitro* se realiza según el protocolo descrito en Little et al. (Little et al., 1990). La línea celular de macrófagos de ratones J774A.1 (ATCC-LGC, Molsheim, Francia) se incubó durante 16 horas a una concentración de 14.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Los componentes de la toxina letal, 400 ng/ml de PA (List laboratories) y 40 ng/ml de LF, diluyéndose cada uno en PBS a 1 mg/ml y conservado congelado hasta el uso, se añadieron simultáneamente a la IgG o al medio solo y se incubaron durante 1 hora a 37°C. El producto de la incubación se añadió seguidamente a los macrófagos y se incubó a 37°C durante 4 horas. El ensayo Cytotox@ (Promega) se utilizó según las indicaciones del proveedor para evaluar la viabilidad de las células. Cada ensayo se corrigió para una viabilidad celular del 100 % (los pocillos de control son los que no contienen ni toxina ni IgG) y una viabilidad del 0 % (los pocillos de control son los que contienen toxina pero no IgG).

- 50 Resultados: La afinidad aparente de la IgG 35PA83 se mide con un resultado de 80 pM y el valor del 50 % de neutralización (CI₅₀) medido es de 0,75 ± 0.02 nM (media ± DE), representando: (IgG 35PA83 / PA) de ¼ o una relación (IgG 35PA83 sitios de unión / PA) de ½.

55 Ejemplo 5: Estudios farmacocinéticos

- 60 Para evaluar la duración de la semivida de la IgG 35PA83, seis ratones A/J de seis semanas (Harlans, Gannat, Francia) se repartieron en dos subgrupos de igual tamaño. Todos los ratones recibieron la IgG 35PA83, administrada mediante una inyección única subcutánea con una dosis de 10 mg/kg. La sangre se recogió mediante punción retroorbital diaria, desde el Día 1 y hasta el Día 6 después de la inyección, después del Día 8 hasta el Día 10 tras la inyección, utilizando cada día ratones diferentes en alternancia. La duración de la semivida de la 35PA83 se determinó a partir de los resultados de las pruebas ELISA realizadas para la combinación de muestras de suero, tras extrapolación lineal de los valores obtenidos.

- 65 Para realizar las pruebas ELISA, los pocillos de las placas de microtitulación de 96 pocillos se revistieron con el

- antígeno PA83 o el antígeno LF (List Laboratories) diluidos en tampón PBS (5 µg/ml, 100 µl por pocillo) durante una noche a 4°C. Los sitios libres de los pocillos de la microplaca se bloquearon posteriormente mediante incubación con un volumen de 200 µl de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 5 % en tampón PBS, durante 1 hora a 37°C. Los sueros se diluyeron en serie en un tampón PBS con 0,1 % de Tween® 20, 1 % de BSA, y después se incubaron en las placas (100 µl/pocillos), durante 2 horas a 37°C. Los pocillos de las placas se incubaron a continuación con un conjugado de anti-IgG de ratón/fosfatasa alcalina o un conjugado de anti-IgG humana/fosfatasa alcalina diluido en 1/10 000 (Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), durante 1 hora a 37°C. El sustrato fosfato de p-nitrofenilo (Sigma) se añadió a continuación y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura de laboratorio. Se determinó la absorbancia a 405 nm utilizando un lector automático de microplacas (iEMS reader MF, Labsystems, Helsinki, Finlandia). Se ha definido el punto de dilución límite, cuyo valor inverso corresponde al título de anticuerpos del suero, como el punto en el que el valor de la señal es igual al doble del valor de la señal medida para el suero de ratones no expuestos al tratamiento. El suero de ratones no expuestos al tratamiento se utiliza como testigo negativo.
- 15 Resultados: El tiempo de semivida de IgG 35PA83 en ratones A/J se determinó en $7,78 \pm 1,46$ días.

Ejemplo 6: Estudios de protección pasiva de ratas

- Para los ensayos *in vivo*, se inyectaron a ratas Fischer (250 a 300g) (C. River, L'Abresle, Francia) 40 µg de PA (List biological laboratories, Campbell, CA) y 8 µg de LF por 250 g de rata, de la forma descrita en Ezzel et al. (Ezzel et al., 1984), salvo que se utilizó la vena de la cola. Se utilizaron 4 animales por grupo, y para evaluar la IgG 35PA83, la IgG se añadió al PA y al LF antes de la inyección. Las ratas se observaron 2 veces al día durante 10 días. Todos los ensayos *in vivo* presentados en este estudio fueron autorizados por el comité de ética local para la experimentación y el cuidado de los animales.

- 25 Preparación y utilización de las esporas Sterne:

- Las esporas de *B. anthracis* Sterne (colección Pasteur) se prepararon como se explica en Albrecht et al. (Albrecht et al., 2007), y se guardaron congeladas (-20°C). Las esporas se numeraron mediante recuento de placas viables después de la congelación/descongelación y el recuento se comprobó al utilizar cada tubo en el estudio. La DL50 de estas esporas administrada por vía intravenosa a ratones machos A/J (Harlan, Gannat, Francia), de 9 semanas, con pesos de 20-25 g, se estableció en 1.10^4 , que conducen a la muerte en 48 a 72 horas, cercano a un valor de 2.10^4 usado en otro estudio (Albrecht et al., 2007).

- 35 Resultados: Las ratas inyectadas con las toxinas mueren en solo 2 horas. Cuando están protegidas con 0,15 nmol de la IgG 35PA83, mueren solamente 2 ratas a las 4.5 horas y 5 horas (efecto considerado significativo por análisis estadístico, $p = 0,045$). Las 4 ratas sobreviven cuando se utilizan 0.2 nmol de la IgG 35PA83 (efecto significativo, $p = 0,03$), correspondiente a una relación molar (sitios de unión al antígeno de la IgG / PA83) de 0,8.

40 Ejemplo 7: Profilaxis con la IgG 35PA83 v2, tratamiento corto con tetraciclina, o las 2

- Para los estudios de un esquema profiláctico de la IgG 35PA83 v2 o solamente con tetraciclina, se inyectaron las IgG a grupos de 10 ratones A/J, por vía subcutánea, 12 horas antes de la infección (una inyección de 5 mg/kg o de 2 mg/kg). El estímulo se administró como 10 000 LD50 o 1.10^8 esporas, y los ratones se observan 2 veces al día durante 2 semanas, después, 5 veces a la semana durante 2 semanas adicionales. Los ratones supervivientes se volvieron a analizar mediante infección un mes más tarde, con la misma cantidad de esporas, y se observaron durante un mes adicional. Para los estudios de un esquema profiláctico que implicaba al mismo tiempo tetraciclina y la IgG 35PA83, grupos de 10 ratones se trataron con tetraciclina como en el esquema que implicaba la tetraciclina sola pero, además, se inyectó IgG 35PA83v2 12 horas antes del estímulo. Para los estudios de protección activa, se inyectaron 10 ratones por vía subcutánea con 5 µg de PA por ratón, en adyuvante completo de Freund. Un segundo grupo recibió la misma inyección, más, 1 mes más tarde, la respuesta inmune de este grupo se estimuló con la misma dosis de PA en adyuvante de Freund incompleto.

- Resultados: Los tratamientos profilácticos comienzan 12 horas antes de un estímulo con 10 000 LD50 y las curvas de supervivencia se muestran en las figuras 5 y 6 (tetraciclina, 7 días). Todos los ratones que recibieron 5 mg/kg de la IgG 35PA83 sobrevivieron, y el 60 % de los ratones que recibieron 2 mg/kg de IgG 35PA83 sobrevivieron (significativo, $p < 0,0001$). En los 16 ratones supervivientes, un mes después de la inyección del 35PA83 y el estímulo, no se puede detectar ningún anticuerpo mediante el conjugado anti IgG humana, y por tanto, se considera que ninguna IgG 35PA83 está ya presente en ese momento. Los títulos de estos ratones de IgG murina dirigida contra el PA están comprendidos en el intervalo de 64 000-128 000, y sus títulos de la IgG murina dirigida contra LF están en el intervalo de 32 000 a 64 000, independientemente de la dosis recibida. Cuando estos ratones se vuelven a estimular con 10 000 LD50 de esporas Sterne, un mes después de la infección inicial, todas sobreviven.

- 65 Todos los ratones que recibieron un tratamiento profiláctico con tetraciclina sobreviven durante el tratamiento (7 días). No obstante, estos ratones mueren entre 4 y 7 días tras la detención de la administración del antibiótico. Cuando la última inyección se complementa con una inyección de la IgG 35PA83 a una dosis de 1 mg/kg, 20 % de

los ratones sobreviven (no significativo) pero todos sobreviven cuando se utiliza una dosis de 2 mg/kg (significativo, $p=0,008$). Los ratones que quedan protegidos activamente mediante una inyección de PA tienen un título de anticuerpos comprendido entre 25 000 y 50 000 un mes más tarde. A continuación son estimuladas, y sobreviven 6 ratones de 10 (considerado como significativo, $p=0,01$). Los ratones que quedan protegidos activamente mediante 2 inyecciones de PA tienen un título de anticuerpos comprendido entre 160 000 y 640 000 1 mes después de la segunda inyección y todos sobreviven

De este modo, los ensayos efectuados muestran que una inyección de IgG 35PA83 v2 permite recortar la profilaxis basada en tetraciclina y, cuando el anticuerpo se ha inyectado una vez a una dosis de 2 mg/kg al finalizar la profilaxis, se observó una supervivencia completa de los ratones. Cuando los ratones protegidos con un corto tratamiento de tetraciclina (7 días) se inyectan con 1000 LD₅₀ de la cepa Sterne de *B. anthracis*, 12 horas después de haber comenzado el tratamiento, 60 % de los ratones sobreviven. Después de haber recibido un estímulo con 10 000 LD₅₀, todos los ratones que habían recibido tetraciclina mueren en menos de 7 días después de la detención de la administración del antibiótico, probablemente debido a una germinación de esporas tardía. De este modo, esto demuestra que la profilaxis por medio de tetraciclina se puede detener, de manera segura, tras un riesgo de exposición, mediante un tratamiento corto de tetraciclina seguido de una inyección de la IgG 35PA83. Esta solución tiene la ventaja de estimular un mayor cumplimiento de la toma de antibióticos por las personas, ya que esta toma es más corta, así como los costes reducidos debido a la reducción de las dosis de antibióticos suministradas.

20 **Ejemplo 8: Profilaxis con la IgG 35PA83 v2, tratamiento corto con doxiciclina, o las 2**

El estudio de la profilaxis con doxiciclina, con o sin la IgG 35PA83, se realizó con grupos de diez ratones A/J de 10 semanas (Harlan, Gannat, Francia), a los que se inyecta de forma profiláctica el antibiótico por vía intra peritoneal, a la dosis única diaria de 5 mg/kg. La quimioprofilaxis se inició 12 horas antes de la infección y se llevó a cabo durante 7 días, lo que representa una reducción de 9/10 de la duración convencional, que es de 60 días.

Se seleccionó una dosis de doxiciclina que es aproximadamente el doble de la dosis convencional para seres humanos (dosis diaria de 3 mg/kg para un ser humano adulto), y se mostró que dosis más pequeñas eran eficaces contra *B. anthracis* (Friedlander et al., 1993, J Infect Dis, Vol. 167: 1239-1243; Kalns et al., 2002, Biochem Biophys Res Commun, Vol. 297: 506-509). Se usaron dosis más grandes (Heine et al., 2007, Antimicrob Agents Chemother, Vol. 51: 1373-1379); se observó en cualquier caso que una dosis de 50 mg/kg parecía tolerarse mal en ratones A/J, que mostraban en ese caso hinchazón del abdomen y un pelo erizado. Para complementar el tratamiento de doxiciclina con la IgG 35PA83, se inyectó una dosis única de este anticuerpo (1 o 2 mg/kg) o no de forma paralela a la última dosis de doxiciclina. La infección usó 1×10^8 esporas inyectadas por vía intra peritoneal, lo que representa 10 000 LD₅₀. Los ratones se observaron dos veces al día durante las dos primeras semanas, después, cinco veces a la semana durante dos semanas adicionales.

Resultados: Tras la diseminación del ántrax en Estados Unidos en 2001, se mostró un cumplimiento terapéutico incompleto del tratamiento profiláctico de larga duración (60 días) con antibióticos. Para determinar si la IgG 35PA83 podía reducir el tiempo de tratamiento, se inició un tratamiento profiláctico con una dosis diaria de 5 mg/kg de doxiciclina durante solo 7 días, 12 horas antes de la infección con 10 000 LD₅₀. El último día del tratamiento, el tratamiento profiláctico con antibióticos se complementó o no con una inyección única de la IgG 35PA83 (**Figura 7**). No obstante, si la última inyección de doxiciclina se complementaba con 1 mg/kg de la IgG 35PA83, la duración media hasta la mrt aumentaba de 288 a 456 horas y un 20 % de los ratones sobrevivieron, lo que representa un efecto protector significativo (comparación *versus* doxiciclina, $p<0,001$). Con una dosis de 2 mg/kg de IgG 35PA83, la totalidad de los diez animales sobrevivió. Un mes después de la infección inicial, se tomaron muestras de los doce ratones supervivientes, reunidos en combinados, y almacenados a -20°C, de forma sistemática. Cuando los sueros se analizaron con ELISA, la mediana del título de anticuerpos anti-IgG PA era de 64 000 y la mediana del título de anticuerpos anti-IgG LF era de 32000.

50 **Ejemplo 9: Terapia con la IgG 35PA83 v2, tratamiento corto con ciprofloxacina, o las 2**

Para los estudios del esquema terapéutico, grupos de 10 ratones A/J se estimularon con una dosis de 1000 DL50 o 1.10^7 esporas. Después de 12 horas, la IgG 35PA83 v2 (vía subcutánea, 1 inyección de 10 mg/kg) o ciprofloxacina (vía subcutánea, 50 mg/kg 2 veces al día durante 5 días) se inyectaron por separado, o ciprofloxacina y la IgG 35PA83 se inyectaron ambas el primer día, después ciprofloxacina sola se volvió a inyectar durante 4 días adicionales.

Resultados: Los tratamientos terapéuticos comienzan 12 horas después de un estímulo con 1000 LD₅₀ y las curvas de supervivencia (ciprofloxacina, 5 días de tratamiento o IgG 35PA83 o los 2) se muestran en la figura 8. Ningún ratón que recibió el ciclo de ciprofloxacina de 5 días sobrevivió, solamente sobrevivieron el 10 % de ratones que había recibido la IgG 35PA83 sobreviven (no significativo). No obstante, el 80 % de los ratones que recibieron tanto ciprofloxacina como la IgG 35PA83 sobreviven (significativo, $p=0.0007$).

65 El uso simultáneo de ciprofloxacina y la IgG 35PA83 permite una supervivencia del 80 %. Se demostró mediante la terapia un importante efecto sinérgico entre la IgG PA83 y la ciprofloxacina y, de manera interesante, ninguna de las

vacunas permite un tratamiento tan corto con antibióticos (5 días), dado que este plazo no permite la creación de una respuesta inmunitaria. Además, IgG 35PA83 previene de forma definitiva las recaídas después de este breve tratamiento con antibióticos, y podría ser incluso más eficaz por este motivo en los seres humanos, cuyo tiempo de supervivencia se espera que sea como mínimo 3 veces el de los ratones (3 a 7 días vs 21 días).

5

Ejemplo 10: Terapia con la IgG 35PA83 v2, tratamiento corto con ciprofloxacina, o las 2 (otro ensayo)

Para los estudios del tratamiento curativo, grupos de 10 ratones A/J se estimularon con una dosis de 1000 LD₅₀ o 1.10⁷ esporas. Después de 12 horas, los ratones se trataron con ciprofloxacina (por vía subcutánea, con una inyección inicial de 25 mg/kg) o con la IgG 35PA83 v2 (vía subcutánea, 1 inyección de 10 mg/kg) por separado; o bien ciprofloxacina y la IgG 35PA83 se inyectan ambas simultáneamente en dos sitios diferentes. También se estudiaron retrasos adicionales de 24 horas y 48 horas antes de comenzar el tratamiento combinado (ciprofloxacina y IgG 35PA83). Después de la primera administración del tratamiento, ciprofloxacina sola (25 mg/kg, dos veces al día) se inyectó durante los 4,5 días siguientes. La dosis de ciprofloxacina se seleccionó en aproximadamente el doble de la dosis convencional para seres humanos (dosis diaria de 20 mg/kg en el adulto humano), puesto que esta dosis ya se había utilizado eficazmente contra *B. anthracis* (Kalns et al., 2002, Biochem Biophys Res Commun, Vol. 297: 506-509). La tolerancia a esta dosis seleccionada se probó favorablemente en ratones A/J antes de comenzar este estudio. Esta parte del estudio se centra en resolver el problema de la supervivencia a corto plazo después de un tratamiento diferido, y la vigilancia se limitó al período de 18 días después de la infección.

20

Resultados: el ántrax se encuentra pocas veces en la práctica médica habitual, y su diagnóstico y su tratamiento tienen una alta probabilidad de ser aplazados. En este estudio, los tratamientos únicos (tratamiento de cinco días con ciprofloxacina a una dosis de 50 mg/kg/día o una dosis única de 10 mg/kg de la IgG 35PA83) se aplazaron 12 horas después de la infección con 1000 LD₅₀ de esporas de Sterne, y los tratamientos combinados (ciprofloxacina combinada con IgG 35PA83) se aplazaron 12, 24 y 48 horas después de la misma infección (**Figura 9**) y se analizaron para determinar su eficacia. Los ratones tratados con ciprofloxacina sola no sobrevivieron, y el tratamiento con la IgG 35PA83 sola permitió la supervivencia de uno de cada 10 ratones del ensayo (no significativo). No obstante, el 80 % de los ratones tratados al mismo tiempo con ciprofloxacina y la IgG 35PA83 sobrevivieron cuando el tratamiento se aplazó durante 12 horas (significativo con respecto al testigo no tratado, p=0,0007), y el 60 % de los ratones sobrevivieron cuando el tratamiento se aplazó 24 horas (significativo con respecto al testigo no tratado, p=0,003). En la 48ª hora después de la infección sin tratamiento, solamente dos de los diez ratones habían sobrevivido, pero murieron poco después, a pesar de la administración del tratamiento combinado. Dieciocho días después de la infección, se tomaron muestras de los catorce ratones supervivientes, reunidos en combinados, se almacenaron y posteriormente se analizaron mediante ELISA. El título de anticuerpos anti-IgG PA era de 32000 y el título de anticuerpos anti-IgG LF era de 8000.

35

Ejemplo 11: Comparación entre los tratamientos contra el ántrax profiláctico pasivos y activos

Un tratamiento contra el ántrax profiláctico pasivo consiste en un tratamiento con la IgG 35PA83. Un tratamiento contra el ántrax profiláctico activo consiste en un tratamiento mediante inmunización con el antígeno PA.

40

Para comparar entre la inmunoprotección activa y pasiva, un grupo de diez ratones se inmunizaron por vía subcutánea con 5 µg de PA83 en adyuvante completo de Freund y se infectaron por vía intraperitoneal con 10000 LD₅₀, un mes después. Otro grupo de diez ratones se inmunizaron de forma idéntica, pero recibieron una inmunización de recuerdo cuatro semanas después con 5 µg de PA83 en adyuvante incompleto de Freund y se infectaron un mes después de la segunda inyección. En paralelo, se evaluó la protección pasiva con la IgG 35PA83 contra la misma infección. Todos los animales infectados se observaron durante un mes, y se compararon los resultados de los dos tipos de profilaxia.

45

Resultados: La vacunación basada en la inyección de PA es actualmente el medio profiláctico más utilizado contra el ántrax, y su eficacia se correlaciona con los títulos de anticuerpos contra el ántrax (Grunow et al., 2007, Vaccine, Vol. 25: 3679-3683). Se inmunizaron ratones A/J con PA, para obtener títulos anti-PA con un valor equivalente al observado en los seres humanos vacunados, para comparar la eficacia de dicha vacunación con la protección proporcionada por la IgG 35PA83. Los ratones inmunizados con una única inyección de PA83 tenían títulos de anticuerpos anti-PA de 25 000 a 50 000, un mes después de la inmunización. Los ratones se infectaron con 10 000 DL₅₀ de esporas Sterne, y seis de los diez ratones sobrevivieron (comparación con respecto a los ratones testigos sin tratamiento significativo, p=0,01). Diez ratones inmunizados con dos inyecciones de PA83 tenían títulos de anticuerpos anti-PA83 de 160 000 y 640 000 y los diez animales sobrevivieron a una infección similar, un mes después del final del tratamiento de inmunización, lo que demuestra un mayor nivel de protección significativo (p=0,02) con un tratamiento con dos inyecciones, con respecto a un tratamiento con una inyección. En paralelo, se evaluó la protección pasiva con la IgG 35PA83, a dosis de 2 o 5 mg/kg. Seis de los diez ratones protegidos con 2 mg/kg de la IgG 35PA83 sobrevivieron (protección significativa en comparación con los ratones sin tratar, p<0,0001, **Figura 10**), y todos los ratones que recibieron las inyecciones profilácticas de 5 mg/kg de la IgG 35PA83 sobrevivieron. En este estudio, la protección completa que se ha conseguido mediante inyección de 5 mg/kg de la IgG 35PA83 ha sido equivalente, por tanto, a la protección completa conseguida con dos inmunizaciones con PA83, que por sí misma era mejor que la protección proporcionada por una sola inyección de PA83.

65

Los ratones que han sobrevivido después del tratamiento profiláctico pasivo mediante la IgG 35PA83 sola se estudiaron además un mes después de la infección inicial. En una prueba ELISA que utilizaba PA83 como antígeno y el conjugado de anti-IgG humana, no se detectado ninguna señal en los sueros correspondientes, y se ha concluido la ausencia de la IgG 35PA83 en los ratones un mes después de la inyección, lo que concuerda con el

- 5 valor del tiempo de vida media de la IgG 35PA83. No obstante, con el conjugado de anti-IgG de ratón, se detectaron IgG murinos dirigidos contra el PA en un título de 64 000 a 128 000, y de IGG murinos dirigidos contra LF a un título de 32 000 a 64 000, independientemente de la dosis de la IgG 35PA83 administrada. Todos los animales sobrevivieron a una reinfección con 10 000 DL₅₀ de esporas Sterne, un mes después de la infección inicial.
- 10 La tabla 7 siguiente resume los resultados de los títulos de anticuerpos de IgG anti-PA e IgG anti-LF observados, en las cuatro condiciones experimentales.

Tabla 7

Condiciones experimentales	Título IgG anti-PA	Título IgG anti-LF
Profilaxia mediante doxiciclina e IgG 35PA83 (2 mg/kg): combinación de 10 sueros, recogidos un mes después de la infección	64 000	32 000
Tratamiento curativo con ciprofloxacina y la IgG 35PA83: combinación de 14 sueros, recogidos 18 días después de la infección	64 000 a 12 000	32 000 a 64 000
Inmunización con PA83: una inyección, suero recogidos un mes después de la inyección	25 000 a 50 000	NP*
Inmunización con PA83: dos inyecciones, sueros recogidos un mes después de la segunda inyección (inyección de recuerdo)	160 000 a 640 000	NP
* NP = No pertinente		

- 15 Estadísticas de los estudios in vivo:

Una prueba de rango logarítmico de comparación de un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier se realizó mediante un programa informático Graph Prism 4.0 (GraphPad software, San Diego, CA).

- 20 Referencias bibliográficas

Albrecht, M. T., H. Li, E. D. Williamson, C. S. Lebutt, H. C. Flick-Smith, C. P. Quinn, H. Westra, D. Galloway, A. Mateczun, S. Goldman, H. Groen, and L. W. Baillie. 2007. Human monoclonal antibodies against anthrax lethal factor and protective antigen act independently to protect against *Bacillus anthracis* infection and enhance endogenous immunity to anthrax. *Infect Immun*.

25 Andris-Widhopf, J., C. Rader, P. Steinberger, R. Fuller, and C. F. Barbas, 3rd. 2000. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. *J Immunol Methods* 242:159-181.

Andris-Widhopf, J., P. Steinberger, R. Fuller, C. Rader, and C. F. Barbas, 3rd. 2001. Generation of antibody libraries: PCR amplification and assembly of light - and heavy-chain coding sequences. In C. F. Barbas, 3rd, D. R. Burton, J. K. Scott, and G. J. Silverman (ed.), *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

30 Carter, P., H. Bedouelle, and G. Winter. 1985. Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Res* 13:4431-43.

Ezzell, J. W., B. E. Ivins, and S. H. Leppla. 1984. Immuno-electrophoretic analysis, toxicity, and kinetics of in vitro production of the protective antigen and lethal factor components of *Bacillus anthracis* toxin. *Infect Immun* 45:761-7.

35 Karlsson, R., A. Michaelsson, and L. Mattsson. 1991. Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J Immunol Methods* 145:229-40).

Laffly, « Selection of a macaque Fab with framework regions like those in humans, high affinity, and ability to neutralise the protective antigen (PA) of *Bacillus anthracis* by binding to segment of PA between residues 686 and 694 », *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Aug. 2005, p. 3414-3420.

40 Little, S. F., S. H. Leppla, and A. M. Friedlander. 1990. Production and characterization of monoclonal antibodies against the lethal factor component of *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Infect Immun* 58:1606-13.

Schuck, P., and A. P. Minton. 1996. Analysis of mass transport-limited binding kinetics in evanescent wave biosensors. *Anal Biochem* 240:262-72.

45

Tabla 4: obtención de transformantes en la línea YB/0

ETAPAS	CONTROLES
<p>1 criotubo YB2/0 ATTC</p> <p>↓</p> <p>descongelación</p> <p>Medio de cultivo EMS+5% SVF</p> <p>↓</p> <p>Expansión celular por dilución a $1,10^5$ células/ml, 2 veces/semana</p> <p>↓</p>	
<p>Electrotampón+ vector HK558-12</p> <p>↓</p> <p>Transformación por electroporación (D0)</p> <p>↓</p> <p>Dilución</p> <p>Reparto en</p> <p>Medio de cultivo*</p> <p>↓</p>	<p>Numeración celular</p> <p>Viabilidad celular</p> <p>Tiempo de</p>
<p>Selección (D+3) de transformantes</p> <p>↓</p> <p>Medio de cultivo* selectivo + G418 (0,5 o 1 g/l) +/-MTX 25 nM</p> <p>↓</p>	<p>Numeración celular en D+3 en medio no selectivo</p> <p>Tasa de</p> <p>Controles al microscopio 3</p> <p>Número total de proliferaciones después semana</p> <p><u>Combinaciones de 8 pocillos:</u></p> <p>Numeración celular</p> <p>Viabilidad celular</p> <p>Producción máxima (D+7)</p> <p>Producción IgG en</p>
<p>Selección de 27 clones más productores por RD Biotech</p> <p>↓</p> <p>Medio de cultivo* selectivo + G418 0,5 g/l +/-MTX 25 nM</p> <p>Selección de 27 clones por LFB</p> <p>↓</p> <p>*RPMI + 5% SVF dializado</p>	<p>Numeración celular (D+3)</p> <p>Viabilidad (D+3)</p> <p>Productividad (D+3)</p> <p>Producción máxima IgG</p> <p>Fucosa en producción (D+3)</p> <p>Fucosa en producción máxima</p>

Tabla 4 (continuación)

ETAPAS	CONTROLES
<p>Medio de cultivo*selectivo + G418 (0,5 o 1 g/l) +/-MTX 25 nM</p> <p>Expansión celular</p>	<p>En el almacenamiento de los cloides: Ensayo de micoplasmas Viabilidad celular</p>
<p>Selección del cloide DD12 por LFB</p> <p>RPMI+5% SVF agotado en Ig bovina+G418 0,5 g/l</p> <p>Producción en cilindros (19l)</p>	<p>Cantidad de anticuerpos producida</p>
<p>Medio de cultivo*selectivo + G418 (0,5 o 1 g/l) +/-MTX 25 nM</p> <p>Selección de 3 cloides DD12, FH2 y GA11 por LFB</p>	
<p>Medio de cultivo DMEM% SVF</p> <p>Clonación por dilución límite</p>	<p>Observación al microscopio 2 veces/semana entre D10 y D20 Número total de pocillos con proliferación después de 3 semanas Producción IgG en P96</p>
<p>Selección de 24 clones (8 clones/cloide) medios productores por RD Biotech</p>	<p>Numeración celular (D+3) Viabilidad (D+3) Productividad (D+3) Producción máxima IgG</p>
<p>Selección de 15 clones (5 clones/cloide) medios productores por LFB</p>	
<p>Medio de cultivo EMS+5% SVF</p> <p>Expansión celular</p>	<p>Ensayo de micoplasmas</p>
<p>Almacenamiento celular en nitrógeno líquido</p> <p>*RPMI + 5% SVF dializado</p>	

Tabla 5: obtención de transformantes en la línea CHO

ETAPAS	CONTROLES
<p style="text-align: center;">1 criotubo CHO</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Descongelación</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Medio de cultivo* +5% SVF +HT1x</p> <p style="text-align: center;">Expansión celular por dilución a 5.10³ células/ml, 1 veces/semana</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p>Numeración celular Viabilidad celular Tiempo de generación</p>
<p>Electrotampón+ vector HK558-12</p> <p style="text-align: center;">Transformación por electroporación (D0)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Dilución Reparto en P96</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Medio de cultivo* +5% SVF dializado +HT1x</p> <p style="text-align: center;">Selección (D+3) de transformantes</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p>Numeración celular en D+3 en medio no selectivo Controles al microscopio 3 veces/semana Registro de pozos con proliferación 2 veces/semana a partir de D12 Número total de pozos con proliferaciones después de 5 semanas</p>
<p>Medio de cultivo* selectivo + G418 (0,5 o 1 g/l) +/-MTX 25 nM</p> <p style="text-align: center;">Selección de 30 clones más productores por RD Biotech</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Selección de 15 clones por LFB</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p>Numeración celular (D+4) Viabilidad (D+4) Productividad (D+4) Producción máxima IgG (D+7)</p>
<p>Medio de cultivo*selectivo + G418 0,5 g/l +/-MTX 25 nM</p>	<p>Fucosa en producción máxima (D+7)</p>

*Alfa MEM (sin ribonucleósidos ni desoxirribonucleósidos)

Tabla 5 (continuación)

ETAPAS	CONTROLES
<p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Expansión celular</p> <p>Medio de cultivo*selectivo + G418 (0,5 o 1 g/l) +/-MTX (5 a 80 nM o 40 a 640 nM)</p>	<p>En el almacenamiento de los cloides: Ensayo de micoplasmas Viabilidad celular</p>
<p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Amplificación génica de 3 cloides y de 2 grupos de cloides</p>	<p>Numeración celular (D+4) Viabilidad celular (D+4) Productividad (D+4)</p>
<p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Selección de 2 cloides amplificados 13G8 (MTX 20 nM) y 9D4 (MTX 160 nM) por LFB</p>	
<p>Medio de cultivo*selectivo G418 0,5 g/l MTX (20 o 160 nM)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Expansión celular</p>	<p>En el almacenamiento de los cloides: Ensayo de micoplasmas</p>
<p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Selección del cloide 13G8</p>	<p>Numeración celular (D+4) Viabilidad celular (D+4) Productividad (D+4) Fucosa en sobrenadante e IgG purificadas</p>
<p>Medio de cultivo*selectivo G418 0,5 g/l</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Producción en cilindros (5,51)</p>	<p>Cantidad de anticuerpos producida</p>
<p>*Alfa MEM (sin ribonucleósidos ni desoxirribonucleósidos)</p>	

Tabla 6: Lista de secuencias

Secuencia	Región	Tipo
1	región variable de cadena ligera	péptido
2	región variable de la cadena pesada MUTE AFFINITE (31A, 66, 73)	péptido
3	región constante de la cadena ligera	péptido
4	región constante de la cadena pesada	péptido
5	cadenas ligeras de la IgG	péptido
6	cadenas pesadas de la IgG MUTE AFFINITE (31A, 66, 73)	péptido
7	región variable de cada una de las cadenas ligeras de la IgG	Ácido nucleico
8	región variable de cada una de las cadenas pesadas MUTE AFFINITE (31A, 66, 73)	Ácido nucleico
9	región constante de cada una de las cadenas pesadas de la IgG	Ácido nucleico
10	región constante de cada una de sus cadenas ligeras	Ácido nucleico
11	cadenas ligeras del anticuerpo	Ácido nucleico
12	cadenas pesadas MUTE AFFINITE (31A, 66, 73)	A nucleico
13-37	cebadores	A nucleico

ANEXO desde las páginas 52 a 80

5

Contenido de la solicitud de patente francesa n.º FR 07/06744 presentada el 26 de septiembre de 2007 para "Anticorps contre les toxines du charbon"

(Con el listado de secuencias y sin las figuras)

10

Anexo

Anticuerpos contra las toxinas del ántrax

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

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

25 Una infección por ántrax puede presentarse en tres formas: cutánea, pulmonar o digestiva. La infección pulmonar es la más frecuentemente mortal. En caso de inhalación, las esporas de *B. anthracis* pasan a los alveolos, donde son fagocitadas por macrófagos y células dendríticas, especialmente. Las esporas germinan en estas células y las formas vegetativas se multiplican en los ganglios. En ese momento, las bacterias pasan a la sangre, se reproducen de forma continua y producen toxinas, parcialmente responsables de la letalidad de la enfermedad. Las toxinas del ántrax se componen de tres proteínas distintas: el antígeno protector (PA, 83 kDa antes escisión enzimática intracelular y 63 kDa después de la escisión), el factor letal (LF, 90 kDa) y el factor edematoso (EF, 89 kDa). La toxina letal está compuesta por PA y LF; y la toxina edematosa, cuyo papel en la fisiología de la enfermedad es menor, de PA y EF. La bacteria secreta estas proteínas como monómeros no tóxicos, y se ensamblan en la superficie de las células diana para formar complejos tóxicos.

35 Hasta el momento presente, varios antibióticos, tales como la penicilina, la doxiciclina y fluoroquinonas, se han utilizado para el tratamiento de infecciones por el ántrax. No obstante, es posible que algunos de estos antibióticos no tengan efectos sobre ciertas cepas, resistentes a los antibióticos. En particular, es posible que algunos de estos tratamientos no puedan utilizarse en caso de terrorismo o guerra bacteriológica, cuando cepas resistentes a los antibióticos podrían diseminarse voluntariamente.

40

Además, puesto que los antibióticos no pueden inhibir la acción de la toxina del ántrax, es necesario que estos antibióticos se administren en estados iniciales de la infección, sin embargo, un diagnóstico precoz es difícil de establecer porque los síntomas iniciales son inespecíficos.

45 Se han desarrollado vacunas cuyo componente principal es el antígeno protector PA, pero solamente se utilizan en personas con elevada susceptibilidad de estar en contacto con *B. anthracis*. Además, debido a la necesidad de un

período de varios meses para conseguir una inmunidad suficiente, estas vacunas no pueden utilizarse en situaciones de emergencia. En Francia, actualmente, ninguna de estas vacunas está actualmente autorizada para su uso en seres humanos. Por tanto, es necesario desarrollar nuevos enfoques terapéuticos y preventivos, así como antibióticos.

5 La inmunización pasiva con anticuerpos supone una estrategia eficaz para neutralizar la toxina. Se han realizado varios ensayos para neutralizar la toxina letal del ántrax mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno protector (PA) y el factor letal (LF). La neutralización de la toxina letal del ántrax mediante un anticuerpo puede realizarse por inhibición del enlace entre el PA y su receptor celular, inhibición de la escisión del PA, inhibición de la unión entre PA y LF o también la inhibición de la acción del LF, por ejemplo.

10 El desarrollo de novedosos anticuerpos que permitan neutralizar la toxina del ántrax tiene, por tanto, un interés general para la prevención y 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 de seres humanos por ántrax. A partir de la médula ósea, los inventores amplificaron los genes que codifican los fragmentos de anticuerpos específicos de PA83 y los clonaron para obtener una biblioteca.

15 Un fragmento de elevada afinidad (Kd:3,4 nM) y muy neutralizante (concentración de inhibición del 50 %: 5,6 + I-0,13 nM), designado con el nombre de 35pAg3, se aisló a continuación (Laffly et al., antimicrobial agents and chemotherapy, zoo5, 4g(g): 3414-3420). Los inventores han demostrado que el fragmento de inmunoglobulina 35P483 neutraliza la toxina del ántrax impidiendo la interacción de PA con su receptor celular.

20 Posteriormente, los investigadores han buscado modificar este fragmento de inmunoglobulina para mejorar su calidad con el fin de una utilización médica profiláctica o terapéutica), mejorando su afinidad y tolerancia en seres humanos. Mejorar la afinidad de este fragmento de inmunoglobulina tiene la ventaja de utilizar una cantidad menor de inmunoglobulina para obtener una actividad biológica suficiente y permite también reducir el coste del tratamiento. Mejorar la tolerancia en el ser humano tiene la ventaja de evitar las respuestas inmunitarias dirigidas contra este fragmento de anticuerpo. La presente invención tiene por objeto proporcionar un anticuerpo dirigido contra PA modificado a partir del fragmento de inmunoglobulina 35P483.

25 La presente invención tiene también por objeto una composición que comprende dicho anticuerpo modificado, así como una composición farmacéutica que comprende la IgG. La presente invención tiene también por objeto el uso de dicho anticuerpo modificado en la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento o la prevención de una infección por carbunco.

30 La presente invención también se refiere a un kit para detectar la toxina del ántrax, comprendiendo dicho anticuerpo modificado así como un método de detección de la toxina del ántrax.

35 La presente invención se comprenderá mejor con las definiciones siguientes.

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

45 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 avanzan hacia problemas graves de dificultad respiratoria y choque séptico. La inhalación del ántrax suele ser mortal.

50 La infección cutánea por ántrax se produce cuando la bacteria entra en la piel por una rotura cutánea existente. Esta infección produce en primer lugar una pápula, que se desarrolla en dos-tres días para dar una vesícula, y posteriormente una úlcera de 1--3 cm de diámetro con un área necrosada en el centro. La infección gastrointestinal por ántrax se desarrolla tras el consumo de carne contaminada y se caracteriza por una inflamación aguda del tracto intestinal.

55 El término "aislado" significa "amplificado in vitro por PCR", "producido de forma recombinante mediante la clonación", "purificado mediante separación en gel o escisión" o también "sintetizado por ejemplo por síntesis química".

60 El término "vecteur" se refiere a un ácido nucleico en el que la secuencia de interés se puede insertar mediante restricción y posterior ligadura para el transporte entre distintos entornos genéticos o par la expresión en una célula hospedadora. Los vectores son, por ejemplo, los plásmidos, los cósmidos, los cromosomas artificiales de levadura (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 que se puede replicar en una célula hospedadora y que se caracteriza además 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 mediante restricción

o ligadura de tal forma que se puede replicar o transcribir en ARN. Los vectores pueden contener además uno o varios marcadores de selección o de identificación de las células que se han transformado o transfectado con el vector.

5 El término "anticuerpo humanizado" se refiere a los anticuerpos de origen animal en los que componentes humanos sustituyen algunos de los componentes originales.

La expresión "prevención de una enfermedad" corresponde a la prevención de la aparición de esta enfermedad en un sujeto, en especial un ser humano, en el que la enfermedad no se ha declarado aún.

10 La expresión "tratamiento de una enfermedad" corresponde la inhibición de esta enfermedad, es decir, la detención de su desarrollo, su regresión, o a la desaparición de los síntomas y consecuencias de la enfermedad, o incluso a la separación de las causas de la enfermedad.

15 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad que es suficiente para efectuar el tratamiento cuando se administra a un sujeto que necesita dicho tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz depende del sujeto, de la fase de la enfermedad a tratar y del modo de administración, y puede determinarse de forma rutinaria por el experto en la materia.

20 Como es bien sabido, solamente una parte del anticuerpo, la región variable, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo. Las regiones constantes del anticuerpo activan los efectores inmunitarios, fagocitos o linfocitos citotóxicos, y el complemento; estas regiones constantes no están involucradas en el enlace con el antígeno. Un anticuerpo cuya región constante (Fc) se ha escindido enzimáticamente para conservar la región bisagra se denomina como un fragmento F(ab')₂ y conserva los dos sitios de unión al antígeno.

25 Asimismo, un anticuerpo cuya región constante, comprendida la región bisagra, se ha escindido enzimáticamente, o se ha producido sin esta región, se designa como un 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 forma covalente a una porción de la cadena pesada denominada Fd.

30 En la región variable, se encuentran las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, complementary determining regions), también llamadas regiones hipervariables, que interactúan directamente con el antígeno. Por tanto, la modificación en 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 que se ha producido el anticuerpo. En el fragmento Fd de la cadena pesada y de la cadena ligera, se encuentran cuatro regiones marco (FRI a 4) separadas respectivamente por tres CDR (CDRI a 3).

35 La presente invención tiene por objeto un anticuerpo dirigido contra PA cuya región variable de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°1 y la región variable de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°2, caracterizado por que dicho anticuerpo está modificado mediante al menos una mutación en la región variable de la cadena pesada o en la región variable de la cadena ligera para presentar una afinidad superior a la del anticuerpo no modificado.

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

50 Las regiones variables de estas secuencias 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 aquí SEQ ID N°5 y SEQ ID N°6, son también accesibles en los bancos informatizados, con los números AJ810486 y AJ810487, respectivamente.

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

60 El anticuerpo no modificado (i.e. no mutado) precursor 35P483 presenta una afinidad K_D igual a 3,4 · 10⁻⁹. Esta constante de afinidad se ha calculado a partir de las constantes de asociación y disociación medidos en tiempo real mediante resonancia de plasmón superficial, como se explica en los ejemplos.

65 En una realización de la presente invención, el anticuerpo dirigido contra PA modificado según la invención está modificado mediante al menos una mutación seleccionada entre G/S (31A), R/K (66), K/R (73), D/G (28), G/E (31A), H/L (55), S/G (74), Y/T (113), S/L (117) en la región variable de la cadena pesada, y Q/R (68), Q/R (27), AP (114), Q/L (68), P/S (115), H/R (24), S/E (69), S/R (58) en la región variable de cadena ligera.

La mutación G/S (31A) en la región variable de la cadena pesada significa que el aminoácido G en posición 31A (véase la figura 1 para las posiciones de los aminoácidos) se ha sustituido por el aminoácido S.

5 Este anticuerpo dirigido contra PA modificado con al menos una de las mutaciones mencionadas anteriormente en la región variable de la cadena pesada o en la región variable de la cadena ligera presenta una afinidad por PA mejorada con respecto a la del anticuerpo 35PA83.

10 La presente invención proporciona, por tanto, fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv, scFv y Fd anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención, así como anticuerpos quiméricos en los cuales la parte Fc del anticuerpo proviene de secuencias homólogas humanas o no humanas.

De acuerdo con una realización, la parte Fc del anticuerpo se puede seleccionar para producir IgA, IgM o IgG.

15 Según otra realización, la parte Fc del anticuerpo puede ser una parte Fc procedente de ratones, caballos, ovinos, bovinos u otros mamíferos.

20 De acuerdo con un modo preferido de realización de la invención, el anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención tiene una parte Fc de origen humano. Dichos anticuerpos enteros son preferidos para la administración a seres humanos, ya que presentan una vida media más larga que los fragmentos de anticuerpos tales como los Fab, y están más adaptados a una administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o transdérmica.

25 En determinadas realizaciones de la invención, los fragmentos Fab son preferidos por las razones siguientes: a) como los fragmentos Fab tienen solamente un sitio de unión al antígeno, los complejos inmunitarios de gran tamaño no pueden formarse, b) la ausencia de región Fc impide la aparición de una reacción inflamatoria activada por Fc, tal como la activación de la cascada del complemento, c) la penetración en los tejidos de una molécula Fab pequeña es más fácil, y d) la producción de Fabs se realiza fácilmente de manera económica en bacterias tales como E. coli.

30 De este modo, un objeto de la presente invención es suministrar Fabs del anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención, los fragmentos de este anticuerpo más pequeños o más grandes que los fragmentos Fabs o los péptidos de unión al epítipo, y en particular los péptidos derivados de las regiones hipervariables de anticuerpos dirigidos contra modificados de acuerdo con la invención.

35 En una primera realización de la invención, el anticuerpo dirigido contra PA modificado según la invención se caracteriza porque dicha al menos una mutación seleccionada entre G/S (31A), R/K (66), K/R (73), D/G (28), G/E (31A), H/L (55), S/G (74), Y/T (113), S/L (117) en la región variable de la cadena pesada.

40 En una segunda realización de la invención, el anticuerpo dirigido contra PA modificado según la invención se caracteriza porque dicha al menos una mutación seleccionada entre Q/R (68), Q/R (27), A/P (114), Q/L (68), P/S (115), H/R (24), S/E (69), S/R (58) en la región variable de cadena ligera.

45 En una tercera realización de la invención, el anticuerpo dirigido contra PA modificado según la invención se caracteriza porque dicha al menos una mutación seleccionada entre G/S (31A), R/K (66), K/R (73), D/G (28), G/E (31A), H/L (55), S/G (74), Y/T (113), S/L (117) en la región variable de la cadena pesada y al menos una mutación seleccionada entre Q/R (68), Q/R (27), A/P (114), Q/L (68), P/S (115), H/R(24), S/E (69), S/R (58) en la región variable de cadena ligera.

50 De acuerdo con una realización preferida de la invención, dicho anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención comprende las tres mutaciones siguientes en la región variable de la cadena pesada:

- G/S (31A)
- R/K (66)
- K/R (73).

55 De acuerdo con otra realización preferida de la invención, dicho anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención comprende las dos mutaciones siguientes en la región variable de la cadena pesada:

- H/L (55)
- S/G (74),

60 y la mutación Q/L (68) en la región variable de cadena ligera.

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, dicho anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención comprende la mutación siguiente en la región variable de la cadena pesada:

- 65
- S/L (117)

y la mutación S/R (58) en la región variable de cadena ligera.

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, dicho anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención comprende las dos mutaciones siguientes en la región variable de la cadena ligera:

- 5
- H/R (24) y
 - S/E (69).

10 Un objeto de la presente invención es también proporcionar un anticuerpo dirigido contra PA modificado que tiene una afinidad mejorada con respecto al anticuerpo no mutado 35P483 así como una mejor tolerancia por el sistema inmunitario humano. Un anticuerpo humanizado de ese tipo tiene la ventaja de no inducir o inducir menos respuesta inmunitaria contra sí mismo, y de tener una vida media más prolongada.

15 Por tanto, la presente invención tiene por objeto un anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención y humanizado, caracterizado por que comprende, además de al menos una mutación en la región variable de la cadena pesada seleccionada entre el grupo constituido por:

- 20
- ningún/Q (1)
 - ningún/V (2)
 - ningún/Q (3)
 - ningún/L (4)
 - ningún/Q (5)
 - ningún/E (6)
 - L/V (12)

25

 - A/T (24)
 - S/P (45)
 - R/N (66)
 - K/V (80)
 - L/F (87)

30

 - R/S (92)
 - A/T (122)
 - V/L (123).

35 La mutación ningún/Q (1) significa que un aminoácido Q se añade en la posición 1 (véase la figura 1 para la posición de los aminoácidos).

En otro modo de realización de la invención, el anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención y humanizado, comprende además al menos una mutación en la región variable de la cadena ligera seleccionada entre el grupo constituido por:

- 40
- ningún/A (1)
 - ningún/I (2)
 - ningún/Q (3)
 - ningún/L (4)

45

 - Y/S (14)
 - K/R (18)
 - H/R (24)
 - Y/F (87)
 - S/P (96)

50

 - S/T (101)
 - UV (124).

55 En una realización preferida de la invención, el anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención y humanizado, comprende además de al menos una mutación en la región variable de la cadena pesada tal como se ha descrito anteriormente y al menos una mutación en la región variable de la cadena ligera tal como se ha descrito anteriormente,

Previamente, dicho anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención y humanizado comprende las mutaciones siguientes en la región variable de la cadena pesada:

- 60
- ningún/Q (1)
 - ningún/V (2)
 - ningún/Q (3)
 - ningún/L (4)

65

 - ningún/Q (5)
 - ningún/E (6)

- A/T (122)
- V/L (123),

y las mutaciones siguientes en la región variable de cadena ligera:

- 5
- ningún/A (1)
 - ningún/I (2)
 - ningún/Q (3)
 - ningún/L (4)
- 10
- UV (124).

Según la descripción anterior de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de cadena ligera de los anticuerpos dirigidos contra PA modificados de acuerdo con la invención, el experto en la materia puede sintetizar, o hacer sintetizar, ácidos nucleicos que codifican estas secuencias de aminoácidos.

Por tanto, la presente invención tiene por objeto un ácido nucleico que codifica anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención, que tiene una afinidad mejorada con respecto al anticuerpo q35PA83 no mutado, y que está humanizado o no humanizado.

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

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

La presente invención incluye todos los vectores recombinantes que contienen secuencias codificantes para la transformación, transfección o terapia génica eucariota o procariota. Dichos vectores se pueden preparar según las técnicas convencionales de biología molecular y comprenderán, además, un promotor adecuado, opcionalmente una secuencia señal para la exportación o la secreción, y secuencias reguladoras necesarias para la transcripción de la secuencia nucleotídica.

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 polihistidina que permite la purificación en columnas Ni²⁺, o un ancla de la membrana de fago filamentosos que es especialmente útil para el cribado del banco, según la tecnología de expresión en fago (phage display).

Uno de los vectores adecuado en el marco de la invención es una molécula de ADN recombinante adaptada para recibir y expresar una primera y una segunda secuencia de ADN, de manera que permita la expresión de anticuerpos heterodiméricos tales como un anticuerpo de longitud completa o de fragmentos F(ab')₂ o Fab de acuerdo con la invención. Un vector de ese tipo suministra un sistema para clonar independientemente las dos secuencias de ADN en dos casetes separadas presentes en el vector, de manera que se formes dos cistrones separados para la expresión de un primer y un segundo polipéptido del anticuerpo heterodimérico. Un vector de expresión de ese tipo es un vector dicistrónico.

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

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar una composición que incluya al menos un anticuerpo dirigido contra PA modificado según la invención para mejorar la afinidad, y opcionalmente humanizado.

La presente descripción tiene también por objeto una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención para mejorar la afinidad, y opcionalmente humanizado.

Dicha composición farmacéutica comprende de manera preferida un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo corresponde, en el sentido de la invención, a un material no tóxico, que no interfiera 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 tal como una célula, un cultivo celular, un tejido o un organismo. Las características del vehículo dependerán de la vía de administración.

La presente descripción se refiere al uso de al menos un anticuerpo dirigido contra PA modificado para mejorar la afinidad, y opcionalmente humanizado, de acuerdo con la invención en la preparación de una composición farmacéutica o de un medicamento destinado al tratamiento o la prevención de una infección por *Bacillus anthracis*.

El anticuerpo dirigido contra PA modificado para mejorar la afinidad, y opcionalmente humanizado, de acuerdo con la invención puede estar marcado. Los ejemplos de marcadores incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos

fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes, y compuestos bioluminiscentes. Los métodos de enlace de un marcador a un anticuerpo son bien conocidos del experto en la materia.

5 Otra técnica de marcado consiste en enlazar el anticuerpo con haptenos de bajo peso molecular, pudiendo estar estos haptenos específicamente modificados por medio de una segunda reacción. Ejemplos de haptenos son la biotina, que reacciona con avidina, o el dinitrofenol, piridoxal o fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos específicos contra los haptenos.

10 Un objeto de la presente descripción es suministrar un kit para la detección de una toxina del ántrax que comprende PA. Este kit comprende:

- un recipiente que contiene al menos un anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención para mejorar la afinidad, y opcionalmente humanizado, que puede estar marcado o no marcado,
- opcionalmente, un recipiente que comprende soluciones tampón
- 15 - y opcionalmente un recipiente que comprende medios de detección de dicho anticuerpo dirigido contra PA modificado marcado, tal como una proteína de unión a la biotina, por ejemplo avidina o estreptavidina, unida a una molécula indicadora, como un marcador fluorescente o enzimático. Este recipiente puede comprender también medios de detección de dicho anticuerpo dirigido contra PA modificado no marcado, es decir, básicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

20 El anticuerpo dirigido contra PA modificado para mejorar la afinidad, y opcionalmente humanizado, de la invención se puede utilizar *in vitro*, por ejemplo en ensayos inmunológicos en los que se utilizan en fase líquida o vinculados a un vehículo en fase sólida. Los ejemplos de vehículos bien conocidos son el vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasa, celulosa natural o modificada, poliacrilamida, agarosa o magnetita. Los ejemplos de ensayos inmunológicos que utiliza el anticuerpo dirigido contra PA de la invención son radioinmunoensayos, marcados histoinmunológicos, ELISA, transferencias Western, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de inmunodifusión, ensayos de fijación del complemento, análisis FACS o también análisis con chips de proteínas.

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

- la puesta en contacto de la muestra con al menos un anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención para mejorar la afinidad, y opcionalmente humanizado, y
- 35 - la detección de la unión de dicho anticuerpo como indicador de la presencia de dicha toxina del ántrax.

La muestra biológica puede ser líquida: por ejemplo saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, suero o sangre, o sólido o semisólido, por ejemplo tejidos o materia fecal o un tejido sólido tal como se usa comúnmente en el diagnóstico histológico.

40 La presente descripción tiene también por objeto proporcionar un método de detección *in vivo* de una toxina del ántrax que comprende PA, en la que un anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención para mejorar la afinidad, opcionalmente humanizado, y marcado se administra a un sujeto. La cantidad de anticuerpo modificado marcado administrado debe ser suficiente para permitir la detección de la unión del anticuerpo a la toxina. La cantidad de anticuerpo modificado marcado dependerá de factores como la edad y sexo del sujeto, así como de la fase 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 entre 0,1 mg/kg y 2 mg/kg.

50 Para realizar el diagnóstico *in vivo*, el anticuerpo dirigido contra PA modificado de la descripción debe estar unida a un radioisótopo directa o indirectamente a través de grupos funcionales. Los grupos funcionales comúnmente utilizados son, por ejemplo, ácido dietileno-triamina-pentaacético (DTPA) y el ácido etileno-diamina-tetraacético (EDTA). Los ejemplos de iones metálicos radioisótopos son ¹¹¹In, ⁹⁷Ru, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ⁸⁹Zr y ²⁰¹Tl.

55 Los anticuerpos dirigidos contra PA modificados de la descripción pueden estar marcadas también con un isótopo paramagnético para el diagnóstico por imagen de resonancia magnética (IRM) o por resonancia de spin electrónico (ESR). También se pueden usar radioisótopos gamma emisores de positrones, tales como ¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ¹⁶²Dy, ⁶⁸Ga, ⁵²Cr, y ⁵⁶Fe.

60 Los anticuerpos dirigidos contra PA modificados para mejorar la afinidad, y opcionalmente humanizados, de la invención también se pueden utilizar *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 de las toxinas del ántrax o de los cambios en la concentración de la toxina PA en una muestra biológica.

65 La presente descripción tiene por objeto describe un método de tratamiento de un sujeto, preferentemente un ser humano, que se puede infectar con *Bacillus anthracis*, en la que una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención para mejorar la afinidad, y opcionalmente

humanizado, se administra a dicho sujeto.

Una cantidad terapéuticamente eficaz corresponde a una cantidad suficiente para reducir los síntomas de la enfermedad y la evolución de la infección. Esta cantidad puede variar con la edad, el sexo del sujeto y la fase de la enfermedad y se determinará 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 et. 2 mg/kg, en una o varias administraciones diarias, durante uno o varios días.

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

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

La presente descripción tiene también por objeto un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo dirigido contra PA modificado de acuerdo con la invención para mejorar la afinidad, opcionalmente humanizado, y unido, de manera directa o indirecta, a un agente terapéutico.

Dichos agentes terapéuticos incluyen agentes químicos, radionucleidos, agentes inmunoterapéuticos, citoquinas, quimioquinas, toxinas o inhibidores de enzima. Los ejemplos de toxinas son la cadena de la difteria, la cadena A de la exotoxina, la cadena A del ricino, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeccina, la alfa-sarcina, las proteínas Aleurites fordii, las proteínas diantinas, las proteínas Phytolaca americana, el inhibidor momordica charantia, curcina, crotina, el inhibidor sapaonaria officinalis, gelonina, 1a mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos. Los ejemplos de radionucleidos son ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re .

La presente descripción se comprenderá mejor gracias al complemento de la descripción siguiente, que se refiere a los ejemplos de obtención de los anticuerpos dirigidos contra PA.

En los ejemplos siguientes, que se proporcionan a título ilustrativo, se hará referencia las figuras del anexo:

Figura 1: esquema en forma de collar de perlas de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 35P483.

La representación IMGT en collar de perlas se realizó según la numeración IMGT. Los puntos indican las diferencias entre los genes humanos más similares a 35P483 y 35P483. Los círculos rayados corresponden a las posiciones que faltan según la numeración IMGT.

Figura 2: alineación de secuencia entre 3 anticuerpos dirigidos contra PA modificados de acuerdo con la invención (6.20, V2 y J24-7) y el anticuerpo precursor 35PA83.

El posicionamiento de las CDR sigue la definición de IMGT (en gris claro) o la definición de Kabat (en gris oscuro, Wu y Kabat 1970). Los residuos sujetos a mutación se muestran en negrita. Todos los restos se han numerado según la numeración IMGT.

Materiales y métodos

Cepas E. coli

Se usaron las siguientes cepas de E. coli:

- XLI (Stratagène, La Jolla, CA):recA1, endAI, gyrA96 thi-1 hsdR17 sup E44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10(Tetr)]
- SURE (Stratagène): el4(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, utilizadas para la expresión de Fabs solubles.

Toxinas

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

Construcción de la biblioteca de mutantes 35P483

Se generó una biblioteca de anticuerpos mutantes derivados del gen 35PA83 mediante mutagénesis Massive® (Biomethodes, Evry, Francia). Las mutaciones se introdujeron en las CDR de las cadenas pesada y ligera utilizando los codones NNS. Las regiones CDR se definieron según Kabat et al. (Wu y Kabat 1970) e IMGT (Lefranc, Pommie et al. 2003).

La biblioteca de ADN se utilizó para transformar células SURE por electroporación. Tras adición de medio SB enriquecido en carfecilina al medio de cultivo e incubación durante 1 h a 37 °C, 1 ml del fago auxiliar VCSM13 (aproximadamente 10^{12} ufp) se añadió al cultivo. Tras la incubación durante 2 h, se añadieron 70 µg/ml de kanamicina, y el cultivo se puso en agitación durante la noche a 37°C.

5

Selección de anticuerpos mediante fagos

Las partículas de fagos-Fab se purificaron y se concentraron a partir de 50 ml de cultivo mediante precipitación con PEG, y resuspendidas en 3 ml de PBS-BSA 1 %-azida 0,02 % y filtradas con un filtro de 0,45 µm. El título de esta preparación de fagos era de aproximadamente $5 \cdot 10^{10}$ ufp/ml. Los fagos-Fab se sometieron a tres ciclos de infección-selección con recuperación, como se ha descrito anteriormente (Andris-Widhopf, Rader et al. 2000). Algunos fagos se analizaron, o se sometieron a uno o a otro de los procesos descritos a continuación:

10

Selección por elución con concentración muy baja de antígeno

15

La biblioteca se cribó usando concentraciones decrecientes de PA83 biotinilado (100 nM, 10 nm, 1 nm, 0,1 nm, 0,01 nm, 0,001 nM) y cuentas magnéticas revestidas de estreptavidina µMACS (Milteny Biotech). Diferentes mezclas de fagos y antígeno biotinilado, a diferentes concentraciones, se incubados durante 30 min a 37°C en tubos de vidrio. Los fagos unidos al PA83 biotinilado se capturaron usando 100 µl de cuentas magnéticas revestidas de estreptavidina µMACS (5 min a temperatura ambiente). Tras la captura de los fagos, las cuentas se lavaron 5 veces con PBS y una vez con TPBS (PBS que contenía Tween 20 al 0.1 %). Los fagos unidos se eluyeron a continuación para incubación con 100 µl de tripsina (10 µg/ml). El eluato se utilizó para infectar bacterias E. coli SURE en fase de crecimiento exponencial.

20

Selección por incubación prolongada

Aproximadamente 10^9 - 10^{10} fagos por pocillo (50 µl) se cribaron según enlace a la placa (Nunc Maxisorp) revestida con 5 µg/ml de PA83 en PBS y se bloqueó con MPBS al 5 %. La placa PA83 se incubó con los fagos-Fab durante 2 h a 37°C y se lavó 5 veces en 0,1 % Tween 20-PBS y 2 veces en PBS. A continuación, los fagos se incubaron a 4°C con 50 µg/ml de PA83 soluble durante tiempos dados (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 10 µg/ml (Sigma) antes de la reinfección de las bacterias E. coli SURE en fase exponencial.

30

Expresión de Fab soluble, extracción periplásmica y purificación

35

Cada variante de ADN se transformó en bacterias de la cepa de E. coli denominada HB2151, convertidas en 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 0,1 % de glucosa. Cuando el cultivo alcanzó una A_{600} de 1,5, se realizó una inducción con IPTG 1 mM durante 18 h a 22°C.

40

Los Fabs se extrajeron con sulfato de polimixina B (Sigma) y se purificaron en una columna de níquel (Ni-NTA spin column, QIAGEN, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y posteriormente se dializaron con PBS 1X a 4°C durante 3 h.

Cuantificación del Fab soluble

45

La pureza del Fab se analizó mediante SDS-PAGE y su concentración se determinó mediante el programa informático Quantity One® (Biorad).

Medida en tiempo real mediante resonancia de plasmón superficial (SPR)

50

Las constantes de la cinética de la interacción entre PA83 y las variantes 35PA83 se determinaron utilizando el sistema Biacore X SPR (BIAcore, Uppsala, Suecia). El PA83 se inmovilizó sobre un chip sensible CM5 usando un procedimiento de acoplamiento de aminas por inyección de 30 µl de 2 µg/ml de PA83 en 10 mM de acetato de sodio pH 4,5. Para minimizar la probabilidad de segundo enlace, la K_D se midió usando un caudal elevado (30 µl/min) y una cantidad mínima de antígeno acoplado (aproximadamente 500 UR, unidades de resonancia). El índice de unión de diferentes concentraciones de Fab comprendidas de 5 a 400 nM en PBS se determinó a un caudal de 30 µl/min. Los datos de enlace se introdujeron en un modelo de langmuir 1:1 del programa informático de evaluación BIA. Las constantes de asociación y disociación (k_{on} y k_{off} respectivamente) para el enlace del Fab al PA83 se determinaron a 35°C.

60

Análisis de las 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 IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

65

Resultados

Construcción de la biblioteca mutante de Fab (35PA83)

5 Se realizó una maduración por afinidad in vitro para generar nuevas variantes que presenten una mayor afinidad. Con este fin, se generó una biblioteca de variantes mediante mutación exclusiva de los restos de 6 CDR, es decir, en 73 posiciones. El tamaño de la biblioteca es de 5,410⁸ transformantes. 45 clones plasmídicos independientes se secuenciaron (tabla 1) para determinar la diversidad y la tasa de mutación. La tasa de mutación experimental es de 3 mutaciones por fragmento (V_H+V_L), lo que permite una selección directa de las combinaciones de mutación que
10 aumentan la afinidad a PA.

El examen de la frecuencia de mutaciones para cada posición de la CDR diana en la biblioteca no seleccionada, comparada con la biblioteca seleccionada (tabla 1) mostró de determinadas posiciones (en gris) no son tolerantes a la variación. De este modo, los restos que se encuentran en estas posiciones parecen ser los restos claves para el
15 enlace con el antígeno, conservando la integridad del sitio de unión con el antígeno. En particular, los restos (H31-H40) de CDR1 se definen como los restos de contacto con el antígeno.

Parece que tuvo lugar una presión de selección notable durante el proceso de selección, ya que la biblioteca no seleccionada presenta una mayor diversidad en comparación con las secuencias seleccionadas, en particular en L-
20 CDR1 y H-CDR1.

Dos posiciones (en negro) suelen estar frecuentemente mutadas en la biblioteca seleccionada: H117 y L27. Con la excepción del mutante J24-I5, las mutaciones del resto serina H117 no han afectado a las propiedades de unión al antígeno de los Fab (tabla 2). Sin embargo, las mutaciones en los restos Glutamina L27 parecen desfavorables porque reducen la afinidad el Fab (mutante 6.7) o alteran la eficacia de expresión del Fab (datos no mostraron).
25

Fragmento Fd

H-CDR1	G	D	S	I	S	G	G	Y	Y	W	S
% Frecuencia de mutaciones para la biblioteca seleccionada	0	5.5	1.8	0	0	3.7	0	0	0	0	0
% Frecuencia de mutaciones para 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
% Frecuencia de mutaciones para 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
% Frecuencia de mutaciones para 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
% Frecuencia de mutaciones para la biblioteca seleccionada	0	0	1.8	0	0	0	1.8	0	1.8	1.8	5.5	0	1.8	0	22
% Frecuencia de mutaciones para 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
% Frecuencia de mutaciones para la biblioteca seleccionada	3.7	0	0	11	0	0	1.8	0	3.7	3.7	0
% Frecuencia de mutaciones para la biblioteca no seleccionada	11	11	2	4	4	4	8	0	9	9	4

L-CDR2	K	A	S	S	L	Q	S
% Frecuencia de mutaciones para la biblioteca seleccionada	5.3	0	3.7	5.5	11	14	15
% Frecuencia de mutaciones para la biblioteca no seleccionada	6	0	8	13	6	12	10

L-CDR3	Q	Y	D	S	A	P	L	A
% Frecuencia de mutaciones para la biblioteca seleccionada	0	0	1.8	0	7.4	3.7	1.8	3.7
% Frecuencia de mutaciones para la biblioteca no seleccionada	0	4	2	0	6	4	19	17

Tabla 1: Frecuencias de mutaciones en las posiciones CDR diana

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

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

Clon precursor	Secuencia H	Secuencia L	K_D (M)	K_{on} (M⁻¹.s⁻¹)	K_{off}(s⁻¹)
35PA83	precursor	precursor	3,4 10 ⁻⁹	9,3 10 ⁴	3,2 10 ⁻⁵
Clones con afinidades netamente mejoradas					
v2	G>S (31A)	precursor	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	precursor	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 degradadas					
v3	precursor	L>R (67)	2,27 10 ⁻⁸	8,98 10 ³	2 10 ⁻⁴
5.20	precursor	S>R (69)	1,22 10 ⁻⁸	2,4 10 ⁴	2,91 10 ⁻⁴
6.7	precursor	Q>V (27)	8,11 10 ⁻⁹	1,9 10 ⁴	1,5 10 ⁻⁴
		S>L (66)			
6.40	precursor	H>R (24)	1.10-8	1,9 10 ⁴	2 10 ⁻⁴
Clones con afinidades estables o poco mejoradas					
v8	L>F (115)	A>S (117)	2,54 10 ⁻⁹	9,2 10 ⁴	2,3 10 ⁻⁴
3.5	precursor	Q>R (27)	1,9 10 ⁻⁹	0,8 10 ⁵	1,5 10 ⁻⁴
		A>P (114)			
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)	Precursor	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	precursor	Q>r (68)	2 10 ⁻⁹	4,5 10 ⁴	9 10 ⁻⁵

5.39	G>E (31A)	Precursor	1.71 10 ⁻⁹	0.63 10 ⁵	1.08 10 ⁻⁴
	D>G (28)				
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)				
6.49	P>G (69)	Precursor	1.55 10 ⁻⁹	9.6 10 ⁴	1.5 10 ⁻⁴
	S>T (111.2)				
J24-3	P>G (69)	Precursor	1.5 10 ⁻⁹	2 10 ⁵	2.9 10 ⁻⁴
J24-12	precursor	A>D (114)	3.5 10 ⁻⁹	7.8 10 ⁴	2.8 10 ⁻⁴
J24-13	precursor	D>E (108)	1.5 10 ⁻⁹	1.2 10 ⁵	1.86 10 ⁻⁴
J24-14	D>G (28)	precursor	3.3 10 ⁻⁹	6.14 10 ⁵	2.03 10 ⁻⁴
	G>E (33)				
	S>L (117)				

Las constantes de asociación (K_{on}) y de disociación (K_{off}) se determinaron mediante resonancia de plasmón superficial (BIAcore) y se calculó K_D como igual al cociente K_{off}/K_{on} .

5 Cribado de las variantes

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

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

El triple mutante V2 mostró una constante de disociación más baja ($K_{off} = 8,1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$) y una constante de asociación un poco más rápida ($K_{on} = 1,22 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) que 35PA83, dando como resultado un aumento en la afinidad de 5,15 veces. Este mutante presenta 3 mutaciones en el dominio variable de la cadena pesada: una mutación (G31A_S) en H-CDR1 y dos mutaciones en H-CDR2 (R66K, K73R).

Después del tercer ciclo, los fagos se seleccionaron en dos procesos adicionales de selección: expansión en pocillos recubiertos con el antígeno e incubación prolongada ("selección por incubación prolongada") o también usando el antígeno biotinilado soluble a concentración muy baja ("selección por elución con concentración muy baja del antígeno soluble").

Selección por elución con 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 eluidos (x 10 ³)	250	192	55	10	8.8	3.4	1	0.7	0.9

La biblioteca R3 se seleccionó usando concentraciones decrecientes de PA83 biotinilado, comprendidas de 100 nM a 0,01 pM. 1 pM representa la concentración más baja que permite eluir más clones que el control negativo. Los clones individuales, obtenidos a partir de la condición 6, se analizaron en un primer momento por las secuencias de cadenas pesadas y ligeras. Aproximadamente un 35 % de estas presentaban secuencias no manipuladas.

Condición 6

43 secuencias H+L	15 precursores	35 %		
	28 variantes	65 %	Clones expresados	47 %

			Clones no expresados	63 %
--	--	--	----------------------	------

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

Selección por incubación prolongada

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

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

Entre los 18 clones eluidos el día 24, 14 fueron totalmente secuenciados (V_H y V_L) y solamente 3 estaban sin manipular. 6 variantes se expresaron lo suficiente para determinar sus constantes cinéticas. Los mutantes dobles J24-7 ($K_D = 7,8 \cdot 10^{-10}$ M) y J24-15 ($K_D = 8,8 \cdot 10^{-10}$ M) mostraron una afinidad de unión aumentada en un factor de 4,35 y 3,96 respectivamente.

Humanización de las variantes

Los anticuerpos inyectados a un ser humano se toleran muy bien si son humanos. Por el contrario, los anticuerpos de origen animal pueden causar efectos secundarios perjudiciales y son eliminados rápidamente. Las regiones hipervariables de los anticuerpos quedan tan mutados durante la maduración de afinidad que es difícil, solamente con el mero análisis de sus secuencias, determinar el origen. Como los Fab no contienen región constante, las regiones marco son las únicas regiones involucradas en su tolerancia.

Para mejorar la tolerancia del Fab 35PA83, y de las moléculas que se derivan del mismo, este Fab se ha humanizado. Se realizó un análisis automático en el servidor IMGT (<http://imgt.cines.fr>) que permitió localizar, en las regiones marco del Fab 35PA83, restos diferentes a los codificados mediante genes de la estirpe germinal humana, que codifican las secuencias más próximas a las de 35P483. Síntesis o mutaciones puntuales han permitido obtener secuencias nucleotídicas que codifican las variantes del Fab 35PA83 y que contienen una, o un pequeño número, de mutaciones que aumentan la homología con las secuencias humanas. Las mutaciones que no causen ningún deterioro significativo de la afinidad, con respecto a 35PA83, se encuentran en las tablas 3 y 4. El conjunto de estas mutaciones se ha asociado en un nuevo gen sintético que codifica un Fab cuyas regiones marco son idénticas en un 97,75 % a las regiones marco codificadas mediante genes de la estirpe germinal humana, con 88,69 % para el Fab precursor 35PA83. No obstante, la afinidad de esta variante totalmente humanizada ($K_D = 9 \cdot 10^{-9}$ M) se degradó en un factor de aproximadamente 3 con respecto al Fab 35PA83.

Tabla 3: mutaciones en las regiones marco de la cadena pesada que no alteren la afinidad de 35PA83

N.º de resto	35PA83	
1	ninguna	Q
2	ninguna	V
3	ninguna	Q
4	ninguna	L
5	ninguna	Q
6	ninguna	E
12	L	V
24	A	T
45	S	P
66	R	N
80	K	V

ES 2 649 565 T3

87	L	F
92	R	S
122	A	T
123	V	L

Tabla 4: mutaciones en las regiones marco de la cadena ligera que no alteren la afinidad de 35PA83.

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

5 Descripción de las secuencias de la solicitud de patente anterior FR 07 06744

<160> 6
<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1
<211> 119
<212> PRT
<213> *Macaca fascicularis*

15 <400> 1

```

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
    
```

ES 2 649 565 T3

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

5
<400> 2

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

10 <210> 3
<211> 223
<212> PRT
<213> *Macaca fascicularis*

15 <400> 3

ES 2 649 565 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

 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
- 5 <212> PRT
- <213> *Macaca fascicularis*
- <400> 4

ES 2 649 565 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 Arg Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe
 100 105 110
 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

- <210> 5
- <211> 670
- 5 <212> ADN
- <213> *Macaca fascicularis*
- <400> 5

ES 2 649 565 T3

cgggccagg actgctgaag cctcggaaa cectgtccct cacctgcct gtctctggtg
60
actccatcag cggtggttac tactggagct ggatcccca gtccccagg aaggggtg
120
agtggattgg gcatactat ggtagtactg cggacaccag gtacaacccc tccctcaaga
180
gtcggagtcac catttcaaaa gacacgtcca agaaccagct ctccctgcaa ctgaggtctg
240
tgaccgccgc ggacaaggcc gtgtattatt gtgcgagatc gggttacaat ttttgagtg
300
gtgaatatta cggtttgat tcttggggc aaggggctgt cgtcacctc tctcagcct
360
ccaccaaggc cccatcggtc tccccctgg cgcctctctc caggagacc tccgagagca
420
cagcggcctt gggctgcctg gtcaaggact acttcccrca acccgtgacc gtgtcgtgga
480
actcaggctc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgcctacag tctcagggc
540
tctactcctt cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctag
600
tctgcaacgt aaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagatt gagatcaaaa
660
catgtggtgg
670

- <210> 6
- <211> 634
- 5 <212> ADN
- <213> *Macaca fascicularis*
- <400> 6

ES 2 649 565 T3

accagctctc catcgtccct gctctcatat gtgggagaca aagtcaccat cacttgccat
60
gccagtcagg gtattaacag ttggtagcc tggatcagc agaaaccagg gaaagccct
120
aaacttctga tctataaggc gtccagtttg caaagtgagg tcccatcaag gttcagcggc
180
agtggatctg ggacagatta tactctcacc atcagcagct tgcagtctga agactttgct
240
tcttattact gctacaata tgacagtgcc ccattggctt tcggccccgg gaccaagctg
300
gatatcaaac gggctgtggc tccaccatct gtcttcactt tcccgccatc tgaagatcag
360
gtgacatctg gaactgtctc tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc
420
agcgtaaagt ggaaggtgga tgggtccctc aaaacgggta actcccagga gagtgtcaca
480
gagcaggaca gcaaggacaa cacctacagc ctgagcagca ccctgacgct gagcagcaca
540
gagtaccaga gtcacaaagt ctatgectgc gaagtcaccc atcagggcct gatttcgccc
600
gtcacaaga gcttcaacag gggagagtgt taat
634

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> LFB Biotechnologies
<120> IgG 35PA83
<130> Referencia
10 <160> 37
<170> PatentIn versión 3.3
15 <210> 1
<211> 103
<212> PRT
<213> *Macaca fascicularis*
20 <400> 1

ES 2 649 565 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> 2
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> *Macaca fascicularis*
 <400> 2

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 Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
 20 25 30

10 Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Gly

ES 2 649 565 T3

35 40 45

Ser Thr Ala Asp Thr Lys Tyr Asn Pro Ser Leu Arg 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

5 <210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

10 <210> 4
<211> 330
<212> PRT
15 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

ES 2 649 565 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

ES 2 649 565 T3

245

250

255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

- <210> 5
- <211> 210
- 5 <212> PRT
- <213> Construcción quimérica
- <400> 5

ES 2 649 565 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 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 100 105 110
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 115 120 125
 Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
 130 135 140
 Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
 145 150 155 160
 Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 165 170 175
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys 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 Cys
 210

<210> 6
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Construcción química

5

ES 2 649 565 T3

<400> 6

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 Ser 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 Lys Tyr Asn Pro Ser Leu Arg 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 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

ES 2 649 565 T3

130																	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp		
145					150					155					160		
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu		
				165					170					175			
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser		
			180					185					190				
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro		
		195					200					205					
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys		
	210					215					220						
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro		
225					230					235					240		
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser		
				245					250					255			
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		
			260					265					270				
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		
		275					280					285					
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val		
	290					295					300						
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu		
305					310					315					320		
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys		
				325					330					335			
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr		
			340					345					350				
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr		
		355					360					365					
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu		
	370					375					380						

ES 2 649 565 T3

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

5 <210> 7
<211> 309
<212> ADN
<213> *Macaca fascicularis*

<400> 7

5 acccagtctc catcgtcct gtctgcatat gtgggagaca aagtcacat cacttgccat 60
gccagtcagg gtattaacag ttggttagcc tggatcagc agaaaccagg gaaagcccct 120
aaacttctga tctataaggc gtccagttg caaagtggg tccatcaag gttcagcggc 180
agtggatctg ggacagatta tactctcacc atcagcagct tgcagtctga agactttgct 240
tcttattact gtctacaata tgacagtgcc ccattggctt tcggccccgg gaccaagctg 300
10 gatatcaaa 309

15 <210> 8
<211> 363
<212> ADN
<213> *Macaca fascicularis*

<400> 8

15 caggagtcgg gaccaggact gctgaagcct tcggaaacce tgtccctcac ctgcgctgtc 60
tctggtgact ccatcagcag cggttactac tggagctgga tccgccagtc ccagggaag 120
gggctggagt ggattgggca tatctatggt agtactgogg acaccaagta caaccctcc 180
ctcaggagtc gagtcacat ttcaaaagac acgtccaaga accagctctc cctgcaactg 240
aggtctgtga ccgcccgga cacggccgtg tattattgtg cgagatcggg ttacaathtt 300
tggagtggtg aatattacgg tttggattcc tggggccaag gggcgcgtgt caccgtctcc 360
20 tca 363

25 <210> 9
<211> 990
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

ES 2 649 565 T3

<400> 9

gcctccacca agggcccata ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagttt tctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 420
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

5 <210> 10
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 10

cgaactgtgg ctgcaccaag tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcaciaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

15 <210> 11
 <211> 630
 <212> ADN
 <213> Construcción quimérica

20 <400> 11

ES 2 649 565 T3

acccagtctc catcgccct gtctgcatat gtgggagaca aagtcacccat cacttgccat 60
 gccagtcagg gtattaacag ttggttagcc tggtatcagc agaaaccagg gaaagcccct 120
 aaacttctga tctataaggc gtccagtttg caaagtgggg tcccatcaag gttcagcggc 180
 agtggatctg ggacagatta tactctcacc atcagcagct tgcagtctga agactttgct 240
 tcttattact gtctacaata tgacagtgcc ccattggctt tcggccccgg gaccaagctg 300
 gatatcaaac gaactgtggc tgcaccaagt gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag 360
 ttgaaatctg gaactgcctc tgttggtgct ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc 420
 aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca 480
 gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca 540
 gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc 600
 gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 630

<210> 12
 <211> 1353
 <212> ADN
 <213> Construcción quimérica

5

<400> 12

ES 2 649 565 T3

caggagtogg gaccaggact gctgaagcct tcggaaaccc tgtccctcac ctgogctgtc 60
 tctggtgact ccatacagcag cggttactac tggagctgga tccgccagtc cccaggggaag 120
 gggctggagt ggattgggca tatctatggt agtactgcgg acaccaagta caaccctcc 180
 ctgaggagtc gagtcacat ttcaaaagac acgtccaaga accagctctc cctgcaactg 240
 aggtctgtga ccgccgcgga cacggccgtg tattattgtg cgagatcggg ttacaatfff 300
 tggagtgggtg aatattacgg tttggattcc tggggccaag gggccgtcgt caccgtctcc 360
 tcagcctcca ccaagggccc atcgggtctc cccctggcac cctcctcca gagcacctct 420
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720
 ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 900
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020

 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgggat 1080
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgca aagctteta tcccagcgac 1140
 atcgcctggg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctgca caaccactac 1320
 acgcagaaga gcctctcct gtctccgggt aaa 1353

<210> 13
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial: cebador

5

<400> 13

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60

10

agatgtgcca tccagttg 78

<210> 14
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial: cebador

15

ES 2 649 565 T3

<400> 14
ctcagtacta gtgccgccac catggacatg aggggtccccg ctcagct 47

5 <210> 15
<211> 44
<212> ADN
<213> secuencia artificial: cebador

10 <400> 15
acctgggagc cagagcagca gaagccccag gagctgagcg ggga 44

15 <210> 16
<211> 43
<212> ADN
<213> secuencia artificial: cebador

20 <400> 16
tgctctggct cccaggtgcc agatgtgcca tccagtgac cca 43

25 <210> 17
<211> 45
<212> ADN
<213> secuencia artificial: cebador

30 <400> 17
ctccacata tgcagacagg gacgatggag actgggtcaa ctgga 45

35 <210> 18
<211> 47
<212> ADN
<213> secuencia artificial: cebador

40 <400> 18
ctcagtacta gtgccgccac catggacatg aggggtccccg ctcagct 47

45 <210> 19
<211> 45
<212> ADN
<213> secuencia artificial: cebador

50 <400> 19
ctccacata tgcagacagg gacgatggag actgggtcaa ctgga 45

55 <210> 20
<211> 25
<212> ADN
<213> secuencia artificial: cebador

60 <400> 20
tcgtccctgt ctgcatatgt gggag 25

65 <210> 21
<211> 42
<212> ADN
<213> secuencia artificial: cebador

70 <400> 21
gatgaagaca cttgggcag ccacagttcg tttgatatcc ag 42

75 <210> 22
<211> 47
<212> ADN
<213> secuencia artificial: cebador

80 <400> 22
ctcagtacta gtgccgccac catggacatg aggggtccccg ctcagct 47

ES 2 649 565 T3

<210> 23
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial: cebador
 5
 <400> 23
 gatgaagaca cttggtgcag ccacagttcg tttgatatcc ag 42
 10
 <210> 24
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial: cebador
 15
 <400> 24
atgaaacatc tgtggttctt ccttctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctgc aggagt 76
 20
 <210> 25
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial: cebador
 25
 <400> 25
 ctcagtgcta ggcggccac catgaaacat ctgtggttct tccttct 47
 30
 <210> 26
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial: cebador
 35
 <400> 26
 cccatctggg agctgccacc aggagaagga agaaccaca 39
 40
 <210> 27
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial: cebador
 45
 <400> 27
 tggcagctcc cagatgggtc ctgtcccagg tgcagctgca gg 42
 50
 <210> 28
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial: cebador
 55
 <400> 28
 cagtctggt cccgactct gcagctgcac ctggg 35
 60
 <210> 29
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial: cebador
 65
 <400> 29
 ctcagtgcta ggcggccac catgaaacat ctgtggttct tccttct 47
 70
 <210> 30
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial: cebador
 <400> 30

ES 2 649 565 T3

	cagtcctggt cccgactcct gcagctgcac ctggg	35
5	<210> 31 <211> 27 <212> ADN <213> secuencia artificial: cebador	
10	<400> 31 cagctgcagg agtcgggacc aggactg	27
15	<210> 32 <211> 38 <212> ADN <213> secuencia artificial: cebador	
20	<400> 32 accgatgggc ccttggtgga ggctgaggag acggtgac 38	
25	<210> 33 <211> 47 <212> ADN <213> secuencia artificial: cebador	
30	<400> 33 ctcagtgcta ggcgccac catgaaacat ctgtggttct tcctct 47	
35	<210> 34 <211> 38 <212> ADN <213> secuencia artificial: cebador	
40	<400> 34 accgatgggc ccttggtgga ggctgaggag acggtgac 38	
45	<210> 35 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial: cebador	
50	<400> 35 gctcgataca ataaacgcca	20
55	<210> 36 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial: cebador	
60	<400> 36 tctgggatag aagttattca g	21
65	<210> 37 <211> 23 <212> ADN <213> Construcción quimérica	
70	<400> 37 ggaagtagtc cttgaccagg cag	23

REIVINDICACIONES

1. Inmunoglobulina de clase G (IgG) dirigida contra el antígeno protector (PA) de la toxina del ántrax, que comprende:

5 - una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N° 1 o que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N° 1 y que comprende además al menos una mutación seleccionada entre:

10 - ningún/A (1) en la que un aminoácido A se ha añadido en la posición -4 de la secuencia SEQ ID N° 1, es decir, inmediatamente antes del resto N.º-3 si existe, y de forma predeterminada inmediatamente antes del resto N.º-2, y por defecto inmediatamente antes del resto N.º-1, y por defecto inmediatamente antes del resto N.º-1

15 - ningún/I (2) en la que un aminoácido I se ha añadido en la posición -3 de la secuencia SEQ ID N° 1, bien inmediatamente antes del resto N.º-2 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º1

- ningún/Q (3) en la que un aminoácido Q se ha añadido en la posición -2 de la secuencia SEQ ID N°1, bien inmediatamente antes del resto N.º-1 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º1

20 - ningún/L (4) en la que un aminoácido L se ha añadido en la posición -1 de la secuencia SEQ ID N° 1, bien inmediatamente antes del resto N.º1

- Y/S, en la que el aminoácido Y en la posición 10 de la secuencia SEQ ID N° 1 se ha sustituido por el aminoácido S

25 - K/R, en la que el aminoácido K en la posición 14 de la secuencia SEQ ID N° 1 se ha sustituido por el aminoácido R

- H/R, en la que el aminoácido H en la posición 20 de la secuencia SEQ ID N° 1 se ha sustituido por el aminoácido R

30 - L/V, en la que el aminoácido L en la posición 100 de la secuencia SEQ ID N° 1 se ha sustituido por el aminoácido V

- una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N° 2, o que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N° 2 y que comprende además al menos una mutación seleccionada entre las mutaciones siguientes:

35 - ningún/Q (1) en la que un aminoácido Q se ha añadido en la posición -6 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N.º-5 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-4, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-3, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-2, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º1

40 - ningún/V (2) en la que un aminoácido V se ha añadido en la posición -5 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N.º-4 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-3, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-2, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º1

45 - ningún/Q (3) en la que un aminoácido Q se ha añadido en la posición -4 de la secuencia SEQ ID N° 2, es decir, inmediatamente antes del resto N.º-3 si existe, y de forma predeterminada inmediatamente antes del resto N.º-2, y por defecto inmediatamente antes del resto N.º-1, y por defecto inmediatamente antes del resto N.º1

50 - ningún/L (4) en la que un aminoácido L se ha añadido en la posición -3 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N.º-2 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º1

- ningún/Q (5) en la que un aminoácido Q se ha añadido en la posición -2 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N.º-1 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N.º1

55 - ningún/E (6) en la que un aminoácido E se ha añadido en la posición -1 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N.º1

- L/V, en la que el aminoácido L en la posición 5 de la secuencia SEQ ID N° 2 se ha sustituido por el aminoácido V

60 - A/T, en la que el aminoácido A en la posición 17 de la secuencia SEQ ID N° 2 se ha sustituido por el aminoácido T

- A/T, en la que el aminoácido A en la posición 113 de la secuencia SEQ ID N° 2 se ha sustituido por el aminoácido T

65 - V/L, en la que el aminoácido V en la posición 114 de la secuencia SEQ ID N° 2 se ha sustituido por el aminoácido L

siendo dicha inmunoglobulina una IgG1 o una IgG2.

2. Inmunoglobulina de clase G (IgG) de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** comprende:

- 5 - una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N° 1, y
 - una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N° 2

10 3. IgG de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la región variable de cadena ligera (SEQ ID N°1) comprende las mutaciones siguientes:

- 15 - ningún/A (1) en la que un aminoácido A se ha añadido en la posición -4 de la secuencia SEQ ID N° 1, es decir, inmediatamente antes del resto N.º-3 si existe, y de forma predeterminada inmediatamente antes del resto N.º-2, y por defecto inmediatamente antes del resto N.º-1, y por defecto inmediatamente antes del resto N.º1
 - ningún/I (2) en la que un aminoácido I se ha añadido en la posición -3 de la secuencia SEQ ID N° 1, bien inmediatamente antes del resto N°-2 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1
 20 - ningún/Q (3) en la que un aminoácido Q se ha añadido en la posición -2 de la secuencia SEQ ID N° 1, bien inmediatamente antes del resto N°-1 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1
 - ningún/L (4) en la que un aminoácido L se ha añadido en la posición -1 de la secuencia SEQ ID N° 1, bien inmediatamente antes del resto N°1

- 25 - Y/S, en la que el aminoácido Y en la posición 10 de la secuencia SEQ ID N° 1 se ha sustituido por el aminoácido S
 - K/R, en la que el aminoácido Ken position 14 de la secuencia SEQ ID N° -1 se ha sustituido por el aminoácido R
 - H/R, en la que el aminoácido H en la posición 20 de la secuencia SEQ ID N° 1 se ha sustituido por el aminoácido R
 30 - L/V', en la que el aminoácido L en la posición 100 de la secuencia SEQ ID N° 1 se ha sustituido por el aminoácido V.

4. IgG de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 3, **caracterizada por que** la región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°2 comprende las mutaciones siguientes:

- 35 - ningún/Q (1) en la que un aminoácido Q se ha añadido en la posición -6 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N°-5 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-4, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-3, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-2, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1
 40 - ningún/V (2) en la que un aminoácido V se ha añadido en la posición -5 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N°-4 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-3, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-2, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1
 45 - ningún/Q (3) en la que un aminoácido Q se ha añadido en la posición -4 de la secuencia SEQ ID N° 2, es decir, inmediatamente antes del resto N.º-3 si existe, y de forma predeterminada inmediatamente antes del resto N.º-2, y por defecto inmediatamente antes del resto N.º-1, y por defecto inmediatamente antes del resto N.º1
 50 - ningún/L (4) en la que un aminoácido L se ha añadido en la posición -3 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N°-2 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°-1, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1
 - ningún/Q (5) en la que un aminoácido Q se ha añadido en la posición -2 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N°-1 si existe, y de forma predeterminada, inmediatamente antes del resto N°1
 55 - ningún/E (6) en la que un aminoácido E se ha añadido en la posición -1 de la secuencia SEQ ID N° 2, bien inmediatamente antes del resto N°1

- 60 - L/V, en la que el aminoácido L en la posición 5 de la secuencia SEQ ID N° 2 se ha sustituido por el aminoácido V
 - A/T, en la que el aminoácido A en la posición 17 de la secuencia SEQ ID N° 2 se ha sustituido por el aminoácido T
 - A/T, en la que el aminoácido A en la posición 113 de la secuencia SEQ ID N° 2 se ha sustituido por el aminoácido T
 - V/L, en la que el aminoácido V en la posición 114 de la secuencia SEQ ID N° 2 se ha sustituido por el aminoácido L.

65 5. IgG de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la región constante

de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°3, y la región constante de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°4.

5 6. IgG de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la región constante de cada una de sus cadenas pesadas es de tipo $\gamma 1$, y preferentemente **por que**:

- la región constante de cada una de sus cadenas pesadas comprende la secuencia de aminoácidos codificada mediante la secuencia SEQ ID N°9 y **por que** la región constante de cada una de sus cadenas ligera comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia SEQ ID N°10, o

10 - cada una de sus cadenas ligeras comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia SEQ ID N°11 y **por que** cada uno de sus cadenas pesadas comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia SEQ ID N°12.

15 7. Ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7.

9. Célula hospedadora que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 8.

20 10. Composición, preferentemente una composición farmacéutica, que comprende al menos una IgG humana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

11. Uso de una IgG humana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o a la prevención de una infección por *Bacillus anthracis*.

25 12. Kit para la detección de una toxina del ántrax que comprende PA, comprendiendo dicho kit:

- un recipiente que comprende al menos una IgG humana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 marcada, y

30 - un recipiente que comprende medios de detección de esta IgG marcada.

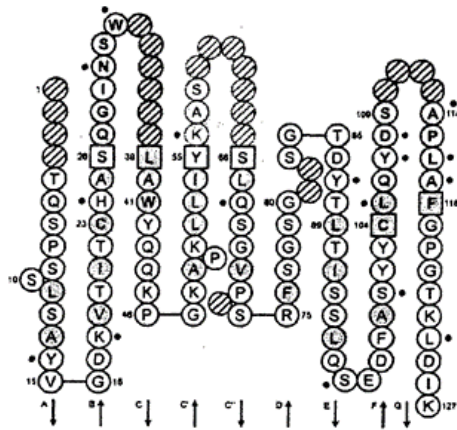
13. Método para la detección in vitro de una toxina del ántrax que comprende PA en una muestra biológica, que comprende:

35 - la puesta en contacto de la muestra con al menos una IgG de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y

- la detección de la unión de dicha IgG como indicador de la presencia de dicha toxina del ántrax.

40 14. Inmunoconjugado que comprende una IgG de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 unida a un agente terapéutico.

Figura 1 de la solicitud de
patente anterior
FR 07 06 744



35H

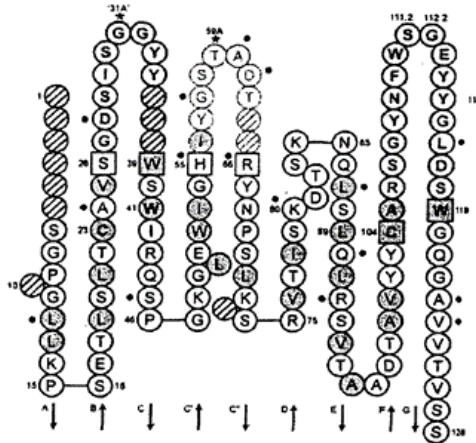


Figura 1 de la solicitud de patente anterior
FR 07 06 744

Cadenaligera

		10	20	30	40	50	60	70	
		L-CDR1				L-CDR2			
35PA83	...	TQSPS	SLSAYVODRY	TITCHASQGI	NSW.....L	AWYQKFOKA	FKLLIYKASSLQS	QVP-SRFSOS
6.20
v2
J24.7

		90	95	100	110	120
		L-CDR3				
35PA83	G	-SOTDYTL	TISLQSEDF	ASYYLQYDSAPLAPG	POTKLDKRA
6.20
v2
J24.7

Cadenapesada

		10	20	30	40	50	60	70	
		H-CDR1				H-CDR2			
35PA83	SOP	.OLLKPSETL	SLTCAVSGDS	ISGCYY...W	SWIRQSPOKO	LEWIGIYGS	YADT...RYNF	SLK-SRYTIS
6.20
v2
J24.7

		90	95	100	110	120
		H-CDR3				
35PA83	KDTSKNQLSL	QLRSYTAADT	AVYYCARSCY	NSWSEYYGLDSWG	QOAVVTYSS	
6.20
v2
J24.7

Numeración H-CDR3
110 111 112 113 114
CARSGYNF W S G E Y Y GLDSWG
112 113



Figura 1 (inicio)

-Nde I-
gcttccctgtctgcatatgtggag -VK de l V2ctggatatcaaacgaaactgtggctgcaccaagtgtcttcac
agcaggacagacgtatacacccctc-----gaactatagtttgcttgacacgacggtgggttcacagaagtag
←-----Amplificación 4 327 bases-----→

Figura 1 (continuación 2)

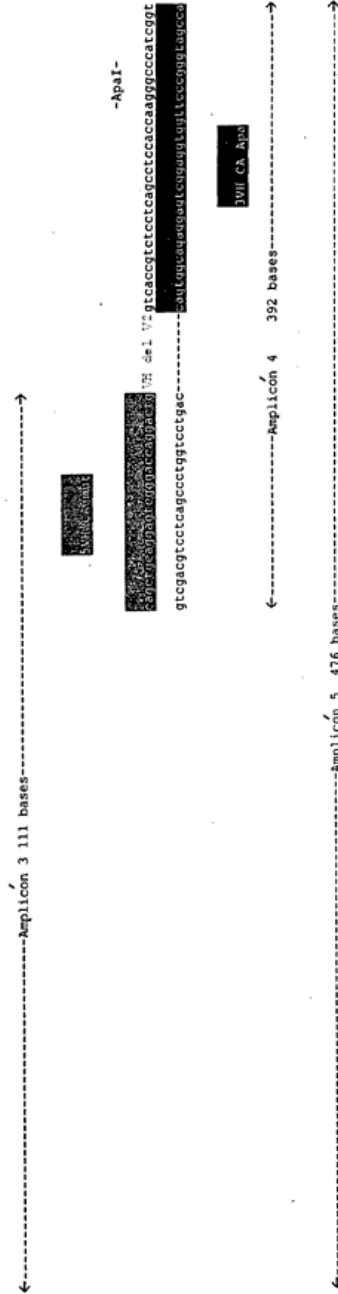


Figura 2 (continuación)

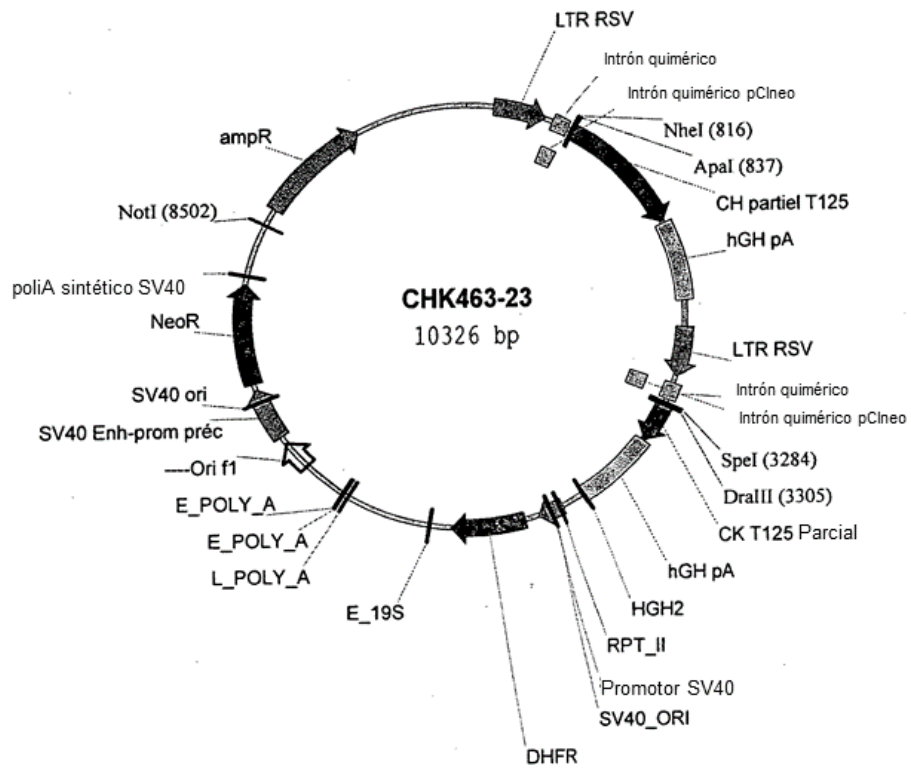


Figura 3

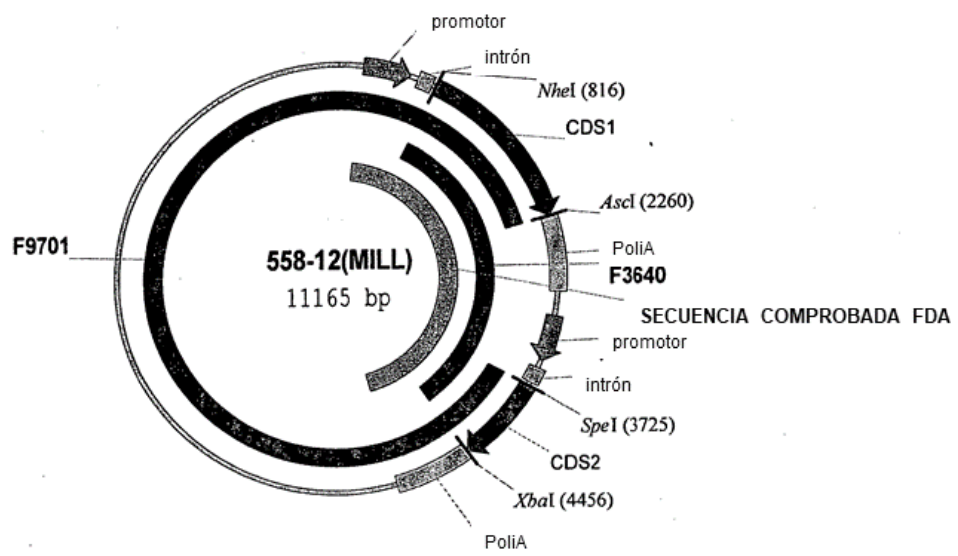


Figura 4

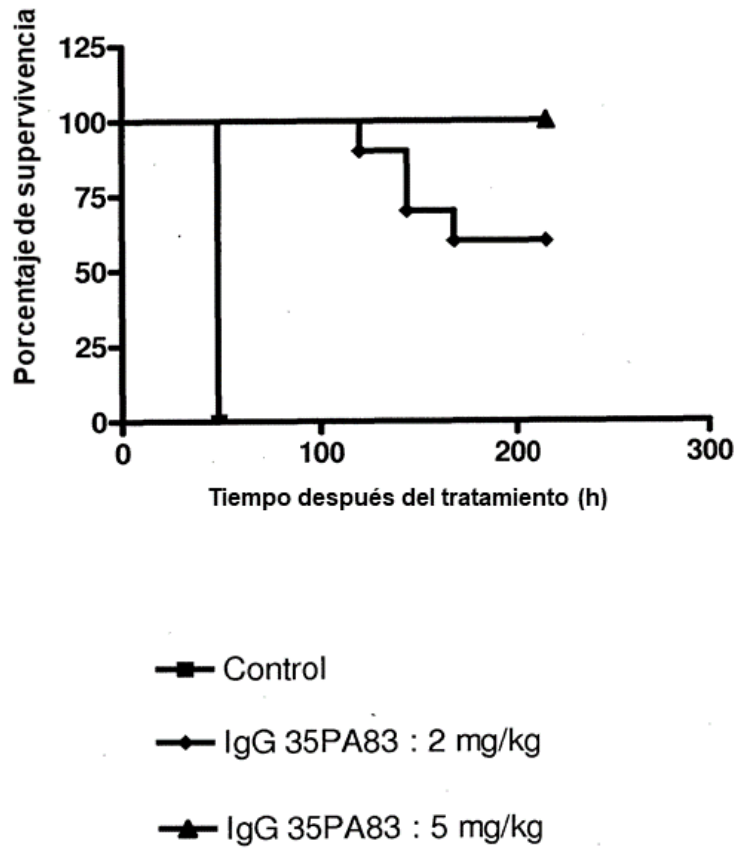


Figura 5

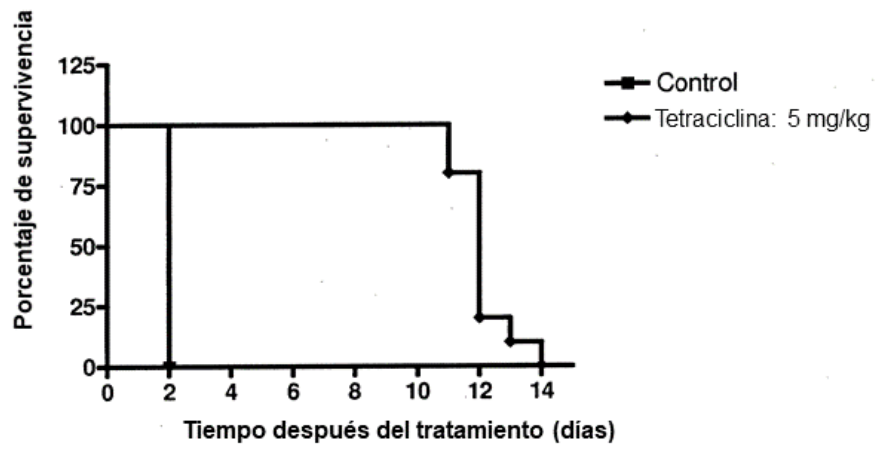


Figura 6

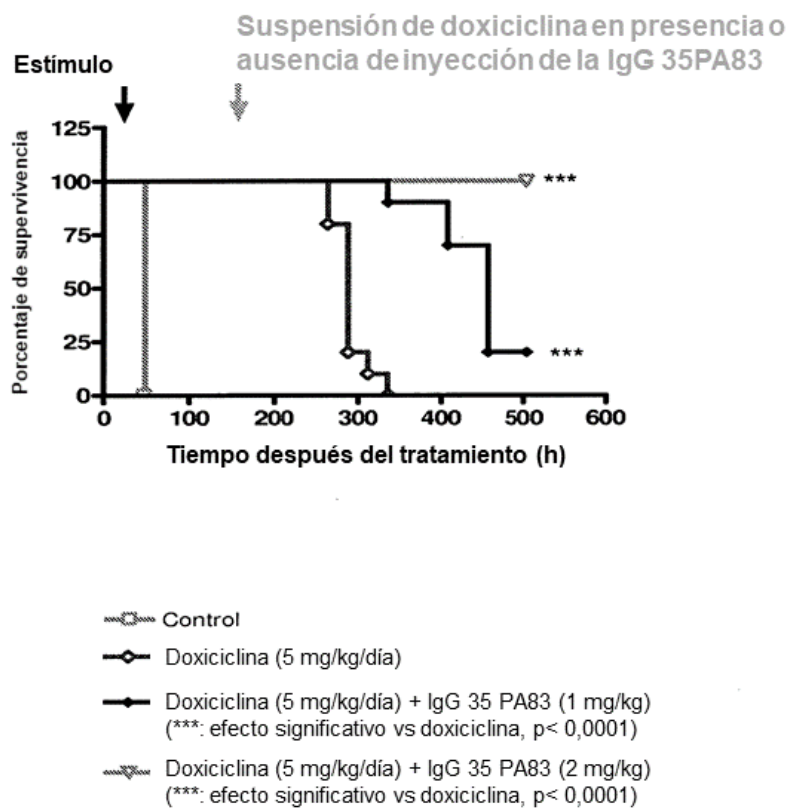
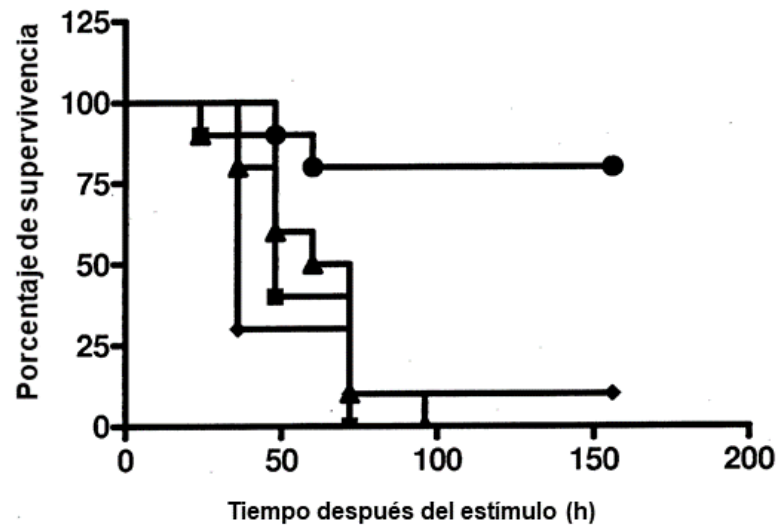
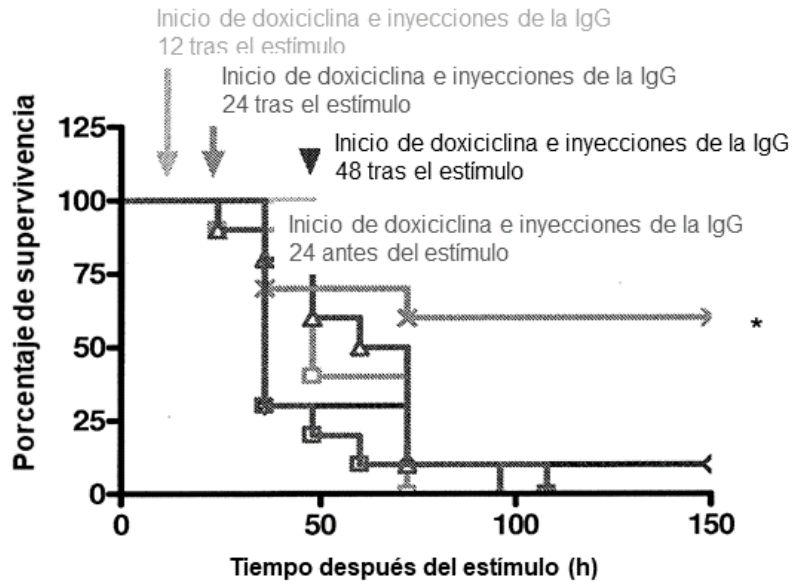


Figura 7



- Control
- ◆ IgG 35PA83 : 10 mg/kg
- ▲ Ciprofloxacina: 50 mg/kg
- IgG 35PA83+ ciprofloxacina

Figura 8



- Control
- ◇ IgG 35PA83 : 10 mg/kg (NS vs control)
- △ Ciprofloxacina: 25 mg/kg dos veces al día (NS vs control)
- IgG 35PA83 + ciprofloxacina iniciada a las 12 h
 (**: efecto significativo vs control, p=0,0007)
- × IgG 35PA83 + ciprofloxacina iniciada a las 24 h
 (*: efecto significativo vs control, p=0,03)
- IgG 35PA83 + ciprofloxacina iniciada a las 48 h
 (NS vs control)

Figura 9

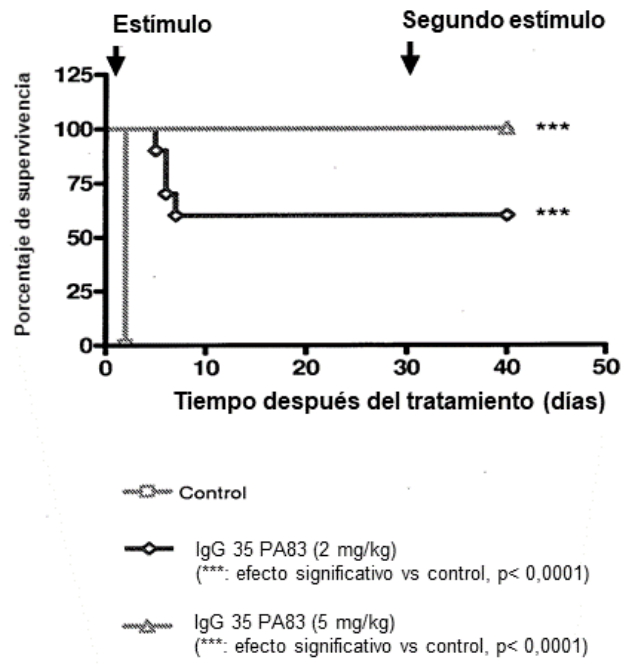


Figura 10

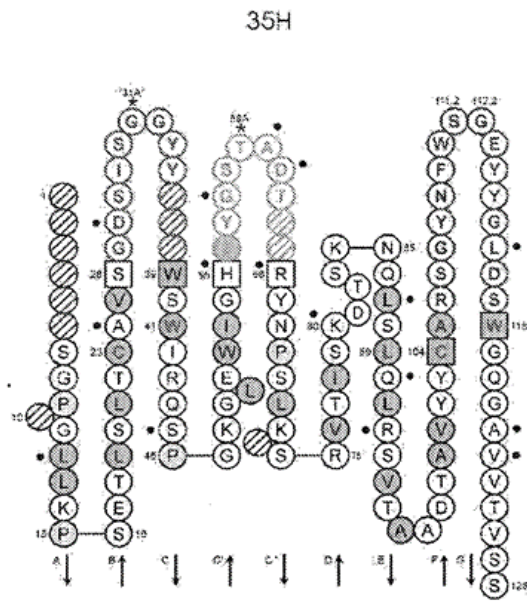
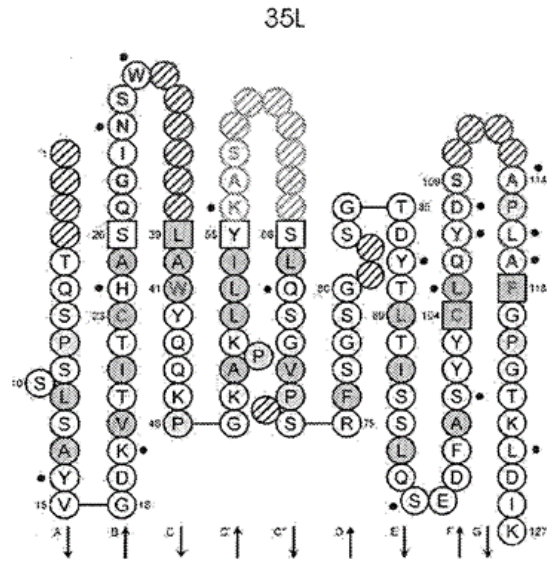


Figura 11