

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 646**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 47/42 (2007.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2015 PCT/FR2015/050113**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15107307**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2015 E 15704054 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3094645**

54 Título: **Inmunoglobulina contra la toxina del carbunco**

30 Prioridad:

17.01.2014 FR 1450405

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2020

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(50.0%)
ZA de Courtaboeuf, 3, avenue des Tropiques
91940 Les Ulis, FR y
ETAT FRANÇAIS REPRÉSENTÉ PAR LE
DIRECTEUR CENTRAL DU SERVICE DE SANTÉ
DES ARMÉES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BEHRENS, CHRISTIAN;
KLEIN, PHILIPPE y
HOGUET, DENIS**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 749 646 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 contra la toxina del carbunco

- 5 [0001] La presente invención se refiere a una inmunoglobulina dirigida contra el antígeno protector de la toxina del carbunco.
- [0002] El carbunco es una enfermedad infecciosa causada por una bacteria grampositiva, *Bacillus anthracis*. Esta bacteria es inmóvil y forma esporas altamente resistentes que germinan en una forma vegetativa cuando se encuentran en entornos tales como la sangre o los tejidos de humanos o de animales. A pesar de su alta resistencia, las esporas no se reproducen, pero pueden sobrevivir decenas de años en el suelo.
- 10 [0003] Una infección por el carbunco puede adoptar tres formas: cutánea, pulmonar o digestiva. La infección pulmonar es la que es mortal con mayor frecuencia. En caso de inhalación, las esporas de *B. Anthracis* entran en los alvéolos, donde son fagocitadas por los macrófagos y las células dendríticas, en particular. Las esporas germinan en estas células y las formas vegetativas se multiplican en los ganglios. Las bacterias pasan entonces al torrente sanguíneo, se reproducen de manera continua y producen toxinas, responsables en parte de la letalidad de la enfermedad.
- 15 [0004] Las toxinas del carbunco están compuestas por tres proteínas distintas: el antígeno protector (PA, 83 kDa antes de la escisión enzimática y 63 kDa después de la escisión), el factor letal (LF, 90 kDa) y el factor edematógeno (EF, 89 kDa). La toxina letal, que desempeña una función preponderante en la patogenicidad, está formada por PA y LF; y la toxina edematógena, cuya función en la fisiología de la enfermedad es menor, por PA y EF. Estas proteínas se secretan por la bacteria como monómeros no tóxicos, y se adhieren a la superficie de las células a las que atacan para formar complejos tóxicos.
- 20 [0005] Hasta ahora, varios antibióticos, tales como la penicilina, la doxiciclina y las fluoroquinolonas (por ejemplo, la ciprofloxacina), se han utilizado para el tratamiento de las infecciones por carbunco. Sin embargo, algunos de estos antibióticos pueden no tener efecto sobre determinadas cepas de *B. Anthracis*, resistentes a los antibióticos. Además, los antibióticos que no tienen acción inhibitoria frente a las toxinas del carbunco se deben administrar necesariamente en estadios muy precoces de la infección; sin embargo, los diagnósticos precoces son difíciles de establecer porque los síntomas iniciales son inespecíficos.
- 30 [0006] Se han desarrollado vacunas cuyo principal componente es el antígeno protector PA, pero solo se utilizan para personas susceptibles de entrar en contacto con *B. Anthracis*. Además, debido a la necesidad de un período de varios meses para adquirir una inmunidad suficiente, estas vacunas no se pueden utilizar en situaciones de urgencia. En Francia, actualmente, ninguna de estas vacunas está autorizada para el uso humano. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos enfoques terapéuticos y preventivos que no sean antibióticos.
- 35 [0007] La inmunización pasiva con anticuerpos representa una estrategia eficaz para neutralizar la toxina. Se han realizado varias pruebas para neutralizar la toxina letal del carbunco con ayuda de anticuerpos monoclonales contra el antígeno protector (PA) y el factor letal (LF). La neutralización de la toxina letal del carbunco con ayuda de un anticuerpo puede tener lugar mediante la inhibición de la unión de PA a su receptor celular, la inhibición de la escisión de PA, la inhibición de la unión entre PA y LF o incluso la inhibición de la acción de LF, por ejemplo. El desarrollo de nuevos anticuerpos que permitan neutralizar la toxina del carbunco, por lo tanto, es de interés general para una prevención y un tratamiento eficaz del carbunco.
- 40 [0008] En un trabajo reciente, se inmunizó a un macaco con el antígeno protector PA83 para obtener el anticuerpo destinado a tratar la infección humana por el carbunco. A partir de la médula ósea, los genes que codifican los fragmentos de anticuerpos Fab que reconocen específicamente PA83 se amplificaron y se clonaron para obtener una colección de fragmentos.
- 50 [0009] Un fragmento de alta afinidad ($K_d=3,4$ nM) y que neutraliza de manera eficaz la toxina letal (concentración de inhibición al 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 y Laffly et al., Journal of molecular biology, 2008, 378(5): 1094-1103). El fragmento de inmunoglobulina 35PA83 neutraliza la toxina del carbunco al impedir la interacción de PA con su receptor celular.
- 55 [0010] Una inmunoglobulina quimérica de 35PA83 llamada "v2", cuyas regiones variables son derivadas del fragmento 35PA83, se preparó y se describió en la solicitud internacional WO 2009/071860 y WO 2009/050388.
- 60 [0011] Sin embargo, el aumento de la afinidad de este fragmento de inmunoglobulina frente al antígeno PA presentaría la doble ventaja de reducir la cantidad de inmunoglobulina que se ha de administrar al paciente y de reducir el coste del tratamiento, y también la de permitir una mejor detección de la toxina del carbunco.
- 65

[0012] Por lo tanto, uno de los objetivos de la invención es proporcionar una inmunoglobulina que presente una alta afinidad frente al antígeno PA de la toxina del carbunco, y que permita una detección muy precisa de la toxina del carbunco. Otro objetivo de la invención es proporcionar una inmunoglobulina que permita el tratamiento o la prevención de patologías asociadas a la toxina del carbunco. Otro objetivo de la invención es proporcionar un método de detección de la toxina del carbunco. Otro objetivo de la invención también es proporcionar un kit de detección de la toxina del carbunco.

[0013] La presente invención, por lo tanto, tiene como objetivo una inmunoglobulina de clase G dirigida contra el antígeno protector de la toxina del carbunco, en la cual:

- cada una de las cadenas pesadas comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N°: 5, y
- cada una de las cadenas ligeras comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N°: 6.

[0014] La presente solicitud describe una inmunoglobulina de clase G dirigida contra el antígeno protector de la toxina del carbunco, o uno de sus fragmentos, incluyendo al menos:

- una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que posee al menos un 90% de identidad con la secuencia SEQ ID N°: 1, entendiéndose que comprende los aminoácidos Leucina en la posición 51 y Glicina en la posición 67, y/o
- una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que posee al menos un 90% de identidad con la secuencia SEQ ID N°: 2, entendiéndose que comprende el ácido aminado Leucina en la posición 55.

[0015] La secuencia SEQ ID N°: 1 comprende una leucina en la posición 51 y una glicina en la posición 67. La secuencia SEQ ID N°: 2 comprende una leucina en la posición 55. Las secuencias según la invención presentan al menos 90% de identidad con la SEQ ID N°: 1 o 2, pero contienen necesariamente, según el caso, la leucina en la posición 51 y la glicina en la posición 67 (SEQ ID N°: 1), o la leucina en la posición 55 (SEQ ID N°: 2).

[0016] Preferiblemente, la inmunoglobulina o uno de sus fragmentos según la invención tiene una afinidad para el antígeno protector de la toxina del carbunco inferior a $2 \cdot 10^{-9}$ M, preferiblemente inferior a $1 \cdot 10^{-9}$ M, preferiblemente inferior o igual a $3,3 \cdot 10^{-11}$ M.

[0017] El término "inmunoglobulina" es equivalente al término "anticuerpo", es decir, que hace referencia a una proteína multimérica constituida por 4 cadenas que participan en la respuesta inmunitaria adquirida.

[0018] Por "fragmento de inmunoglobulina", se entiende un fragmento que tiene la capacidad de unirse al antígeno PA. Preferiblemente, tal fragmento comprende al menos:

- una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°: 1, y/o
- una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°: 2.

[0019] Así, por una parte, se puede utilizar una inmunoglobulina de la invención, a saber una molécula de inmunoglobulina entera, es decir, una inmunoglobulina constituida por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras completas. Por otra parte, se puede utilizar un fragmento de inmunoglobulina según la invención. Algunos fragmentos de inmunoglobulina ampliamente conocidos son, por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv, scFv y Fd.

[0020] 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 la posición N-terminal, 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) específico del antígeno contra el que se dirige la inmunoglobulina y, en la posición C-terminal, por 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.

[0021] La asociación de los dominios variables y los dominios CH1 y CL de las cadenas pesadas y ligeras forma las partes Fab, que están conectadas a la región Fc por una región bisagra muy flexible que permite a cada Fab fijarse a su objetivo antigénico, mientras que la región Fc, mediadora de las propiedades efectoras del anticuerpo, permanece accesible a los efectores inmunitarios, fagocitos o células asesinas, y el complemento; estas regiones constantes no están implicadas en la unión al antígeno.

[0022] La región Fc, constituida por los 2 dominios globulares CH2 y CH3, se glucosila al nivel del dominio CH2 con la presencia, en cada una de las 2 cadenas, de un N-glucano biantenarico, unido a la asparaguina en la posición 297 de la secuencia de cadena pesada del anticuerpo según la numeración EU numbering (Asn 297 - cf Edelman, G.M. Et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63,78-85 (1969), y sitio web IMGT http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html). En la presente solicitud, por "Asn 297", se entiende en realidad la asparaguina en la posición 305 de la secuencia SEQ ID N° :5.

[0023] La región variable está, en sí misma, implicada en la unión de la inmunoglobulina a su epítipo.

[0024] Una inmunoglobulina cuya región constante (Fc) ha sido escindida enzimáticamente, de manera que conserva la región bisagra, se designa como un fragmento F(ab')₂ y conserva los dos sitios de unión al antígeno. Igualmente, una inmunoglobulina cuya región constante, incluyendo la región bisagra, ha sido escindida enzimáticamente, o que ha sido producida sin esta región, se designa como un fragmento Fab y conserva uno de los dos sitios de unión al antígeno.

[0025] El fragmento Fd está formado por las regiones VH y CH1.

[0026] En la región variable se encuentran las regiones determinantes de complementariedad (CDR, del inglés *complementary determining regions*), también llamadas regiones hipervariables, que interactúan directamente con el antígeno y, por lo tanto, tienen un impacto determinante para la afinidad de un anticuerpo para su objetivo antigénico.

[0027] En la región variable se encuentra un segundo tipo de regiones, llamadas regiones estructurales (FR, del inglés *frameworks*), que mantienen la estructura terciaria de las CDR. Estas regiones estructurales son relativamente específicas de la especie donde se ha producido la inmunoglobulina. En el fragmento Fd de la cadena pesada y en la cadena ligera se encuentran cuatro regiones estructurales (FR1 a 4) separadas respectivamente por tres CDR (CDR1 a 3).

[0028] Según la invención, una secuencia que posee al menos un 90% de identidad con una secuencia de referencia, posee al menos un 90%, preferiblemente al menos un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, de identidad de aminoácidos con dicha secuencia de referencia.

[0029] El "porcentaje de identidad" entre dos secuencias, en el sentido de la presente invención, se determina comparando las dos secuencias alineadas de manera óptima, a través de una ventana de comparación. La parte de la secuencia de aminoácidos que está dentro de la ventana de comparación puede comprender de este modo adiciones o deleciones (por ejemplo, "huecos" o "gaps") con respecto a la secuencia de referencia (que no comprendería estas adiciones o estas deleciones) para obtener una alineación óptima entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula mediante la determinación del número de posiciones para las cuales un residuo de aminoácido es idéntico en las dos secuencias comparadas, y luego mediante la división del número de posiciones para las cuales hay identidad entre los dos residuos de aminoácidos por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y luego mediante la multiplicación del resultado por cien con el fin de obtener el porcentaje de identidad de aminoácidos de las dos secuencias entre sí.

[0030] La invención se basa en la observación sorprendente hecha por los inventores de que la combinación de una doble mutación específica de la cadena pesada (que tiene como resultado una leucina en la posición 51 y una glicina en la posición 67 de la SEQ ID N° :1) y una mutación específica de la cadena ligera (que tiene como resultado una leucina en la posición 55 de la SEQ ID N° :2) conlleva una mejor afinidad de la inmunoglobulina 35PA83 frente a la toxina del carbunco con respecto a las inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas del estado de la técnica.

[0031] La presencia de un residuo de leucina en la posición 51 de la SEQ ID N°: 1 corresponde a la leucina en la posición 54 de la figura 2A. La presencia de un residuo de glicina en la posición 67 de la SEQ ID N°: 1 corresponde a la glicina en la posición 74 de la figura 2A. La presencia de un residuo de leucina en la posición 55 de la SEQ ID N°: 2 corresponde a la leucina en la posición 68 de la figura 2B.

[0032] Preferiblemente, la invención se refiere a una inmunoglobulina de clase G (IgG) dirigida contra el antígeno protector (PA) de la toxina del carbunco, o uno de sus fragmentos, que comprende:

- una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID N°: 1, y/o
- una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia SEQ ID N°: 2.

[0033] Las constantes cinéticas de la interacción entre la inmunoglobulina de la invención y el antígeno PA, entre ellas la constante de afinidad (K_D), se pueden determinar mediante las técnicas convencionales conocidas por un experto, particularmente según el método descrito en el ejemplo 4.

[0034] En una forma de realización particular, la invención se refiere a una inmunoglobulina o a uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes, en la cual:

- 5 – la región constante de dicha cadena pesada comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°: 3, y
- la región constante de cadena ligera comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°: 4.

[0035] La invención se refiere a una inmunoglobulina tal y como se ha definido antes, en la cual:

- 10 – cada una de las cadenas pesadas comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N°: 5, y
- cada una de las cadenas ligeras comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N°: 6. Tal inmunoglobulina es llamada 35PA83 "6.20" en la presente solicitud.

[0036] En una forma de realización, la invención se refiere a una inmunoglobulina o a uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes, en la cual dicha cadena pesada y/o dicha cadena ligera está unida a un péptido señal.

[0037] Se debe señalar que el péptido señal utilizado en la invención puede ser diferente del péptido señal asociado de manera natural a una proteína determinada. El uso de un péptido señal permite aumentar los índices de secreción de un polipéptido de interés.

[0038] Un tal péptido señal se puede optimizar, por ejemplo, para aumentar los índices de secreción de la inmunoglobulina de la invención.

[0039] De este modo, se puede utilizar un péptido señal conocido por el experto, como por ejemplo un péptido señal como el que se describe en el documento WO2011/114063.

[0040] En una forma de realización particular, el péptido señal consiste en la secuencia de aminoácidos siguiente: MRWSWIFLLLLSITSANA (SEQ ID N°: 19).

[0041] En una forma de realización ventajosa, la invención se refiere a una inmunoglobulina tal y como se ha definido antes, en la cual:

- 35 – cada una de las cadenas pesadas comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N°: 7, y
- cada una de las cadenas ligeras comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N°: 8.

40 [0042] Las secuencias de referencia de las cadenas, o fragmentos de cadenas, pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de la invención se presentan en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1. El péptido señal está sombreado. La región variable se indica en cursiva.

SEQ ID N°: 1 región variable de la cadena pesada	<i>QVQLQESGPGLLKPSSETLSLTCAVSGDSISGGYYWSWIRQSPGKG LEWIGLIYGSTADTRYNPSLKGRTISKDTSKNQLSLQLRSVTAADT AVYYCARSGYNFWSGEYYGLDSWGQGA VVTVSS</i>
SEQ ID N°: 2 región variable de la cadena ligera	<i>AIQLTQSPSSLSAYVGDKVTITCHASQGINSWLAWYQQKPGKAPK LLIYKASSLLSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQSEDFASYCLQYDS APLAFGPGTKLDIK</i>

<p>SEQ ID Nº: 3 región constante de la cadena pesada</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID Nº: 4 región constante de la cadena ligera</p>	<p>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>SEQ ID Nº: 5 cadena pesada completa sin péptido señal</p>	<p><i>QVQLQESGPGLLKPSSETLSLTCAVSGDSISGGYYWSWIRQSPGKG LEWIGLIYGSTADTRYNPSLKGRTISKDTSKNQLSLQLRVTAADT AVYYCARSGYNFWSGEYYGLDSWGQGAVVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i></p>
<p>SEQ ID Nº: 6 cadena ligera completa sin péptido señal</p>	<p><i>AIQLTQSPSSLSAYVGDKVTITCHASQGINSWLAWYQQKPGKAPK LLIYKASSLLSGVPSRFSGSGGTDTLTISLQSEDFASYCLQYDS APLAFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</i></p>

<p>SEQ ID N°: 7 cadena pesada con péptido señal</p>	<p><i>MRWSWIFLLLSIISANAQVQLQESGPGLLKPSSETLSLTCAVSG DSISGGYYWSWIRQSPGKGLEWIGLIYGSTADTRYNPSLKGRVTIS KDTSKNQLSLQLRSVTAADTAVYYCARSGYNFWSGEYYGLDSWG QGAVVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K</i></p>
<p>SEQ ID N°: 8 cadena ligera con péptido señal</p>	<p><i>MRWSWIFLLLSIISANAIIQLTQSPSSLSAYVGDKVTITCHASQ GINSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLLSGVPSRFSGSGSGTDYTL TISSLQSEDFASYCYCLQYDSAPLAFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC</i></p>

[0043] Las regiones constantes de cada una de las cadenas ligeras y de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo utilizado en la invención pueden ser regiones constantes humanas.

Esta forma de realización de la invención permite disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo en humanos y, con ello, mejorar su eficacia en cuanto a su administración terapéutica a humanos. Además, las regiones constantes humanas permiten asegurar una mayor semivida en humanos, a través de la interacción con los receptores FcRn. De manera preferida, las regiones constantes de cada una de las cadenas ligeras de la inmunoglobulina de la invención son de tipo K.

Alternativamente, la región constante de cada una de las cadenas ligeras de la inmunoglobulina de la invención es de tipo λ .

[0044] En una forma de realización particular, y particularmente cuando las regiones constantes de cada una de las cadenas ligeras y de cada una de las cadenas pesadas de la inmunoglobulina de la invención son regiones humanas, 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, o incluso de tipo γ 4.

[0045] En una forma de realización preferida, la invención se refiere a una inmunoglobulina o a uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes, en la cual la región constante de cada una de las cadenas pesadas es de tipo γ 1.

[0046] En una forma de realización, la invención se refiere a una inmunoglobulina o a uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes, que posee en su sitio de glucosilación Asn297, N-glucanos cuyo índice de fucosilación es inferior al 65%, preferiblemente inferior al 50%, más preferiblemente inferior al 40%.

[0047] En una forma de realización, la presente invención se refiere a una inmunoglobulina de clase G (IgG) dirigida contra el antígeno protector (PA) de la toxina del carbunco, o a uno de sus fragmentos, que comprende:

- una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que posee al menos un 90% de identidad de aminoácidos con la secuencia SEQ ID N°: 1, preferiblemente que comprende la secuencia SEQ ID N°: 2, entendiéndose que comprende los aminoácidos Leucina en la posición 51 y Glicina en la posición 67, y
- una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que posee al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia SEQ ID N°: 2, preferiblemente que comprende la secuencia SEQ ID N°: 2, entendiéndose que comprende Leucina en la posición 55,

donde dicha inmunoglobulina o uno de sus fragmentos posee una constante de afinidad (K_D) frente a dicho antígeno protector de la toxina del carbunco inferior a $2.10^{-9}M$, preferiblemente inferior o igual a $3,3.10^{-11}M$, donde dicha inmunoglobulina posee, en su sitio de glucosilación Asn297, N-glucanos cuyos índice de fucosilación es inferior al 65%, preferiblemente inferior al 50%, más preferiblemente inferior al 40%.

5

[0048] En una forma de realización particular, la invención se refiere a una inmunoglobulina o a uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes, en la que:

10

- la región constante de dicha cadena pesada comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°: 3, y
- la región constante de cadena ligera comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°: 4,

15

donde dicha inmunoglobulina o uno de sus fragmentos posee una constante de afinidad (K_D) frente a dicho antígeno protector de la toxina del carbunco inferior a $2.10^{-9}M$, preferiblemente inferior o igual a $3,3.10^{-11}M$, donde dicha inmunoglobulina posee, en su sitio de glucosilación Asn297, N-glucanos cuyo índice de fucosilación es inferior al 65%, preferiblemente inferior al 50%, más preferiblemente inferior al 40%.

20

[0049] En una forma de realización particular, la invención se refiere a una inmunoglobulina tal y como se ha definido antes, en la cual:

25

- cada una de las cadenas pesadas comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N°: 5, y
- cada una de las cadenas ligeras comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N°: 6, donde dicha inmunoglobulina posee una constante de afinidad (K_D) frente a dicho antígeno protector de la toxina del carbunco inferior a $2.10^{-9}M$, preferiblemente inferior o igual a $33.10^{-11}M$,

30

donde dicha inmunoglobulina posee, en su sitio de glucosilación Asn297, N-glucanos cuyo índice de fucosilación es inferior al 65%, preferiblemente inferior al 50%, más preferiblemente inferior al 40%.

35

[0050] En una forma de realización particular, la invención se refiere a una inmunoglobulina tal y como se ha definido antes, en la cual:

40

- cada una de las cadenas pesadas comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N°: 7, y
- cada una de las cadenas ligeras comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N°: 8,

45

donde dicha inmunoglobulina posee una constante de afinidad (K_D) frente a dicho antígeno protector de la toxina del carbunco inferior a $2.10^{-9}M$, preferiblemente inferior o igual a $3,3.10^{-11}M$, donde dicha inmunoglobulina posee, en su sitio de glucosilación Asn297, N-glucanos cuyo índice de fucosilación es inferior al 65%, preferiblemente inferior al 50%, más preferiblemente inferior al 40%.

50

[0051] Por lo tanto, las inmunoglobulinas de la invención se distinguen particularmente de las inmunoglobulinas antitoxina del carbunco ya conocidas por sus bajos índices de fucosilación.

[0052] Además, las inmunoglobulinas de la invención también presentan un perfil de N-glucosilación particular.

55

[0053] En una forma de realización particular, la invención se refiere a una inmunoglobulina o a uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes, que posee, en su sitio de glucosilación Asn297, una estructura glucánica de tipo biantenaria, con cadenas cortas, una débil sialilación, que presenta manosas terminales y/o N-acetilglucosaminas terminales no intercaladas.

[0054] Las formas glucosiladas previsibles para las inmunoglobulinas según la invención se presentan en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2.

Símbolo	Forma glucosilada
G0	Complejo biantenaria con estructura agalactosilada
G1	Complejo biantenaria con una estructura que comprende una sola galactosa
G0F	Complejo biantenaria con estructura agalactosilada (G0), en el cual el núcleo pentasacárido está sustituido por una fucosa
G1F	Complejo biantenaria con una estructura que comprende una sola galactosa (G1), en el cual el núcleo pentasacárido está sustituido por una fucosa

[0055] En una forma de realización, la invención se refiere a una inmunoglobulina o a uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes, que presenta un contenido superior al 60 % para las formas G0+G1+G0F+G1F, donde el contenido de las formas G0F+G1F es inferior al 50 %.

5

[0056] En una forma de realización, la invención se refiere a una inmunoglobulina o a uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes, que presenta un contenido superior al 60 % para las formas G0+G1+G0F+G1F, donde el contenido de fucosa es inferior al 65 %.

10

[0057] En una forma de realización, la invención se refiere a una inmunoglobulina o a uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes, que presenta un contenido inferior al 40% para las formas G0F+G1F.

[0058] Otro aspecto de la invención es un polinucleótido que codifica la inmunoglobulina de la invención o uno de sus fragmentos.

15

[0059] De este modo, otro aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido que incluye al menos una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o la cadena ligera de una inmunoglobulina o de uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes.

20

[0060] En una forma de realización particular, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende al menos una secuencia de nucleótidos elegida entre la SEQ ID N°: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

Tabla 3. Las secuencias codificantes se indican en **negrita**. Las secuencias que codifican el péptido señal están **sombreadas**. Las secuencias de Kozak están subrayadas. Los codones de terminación están en *cursiva* y subrayados.

25

<p>SEQ ID NO: 9 Secuencia de nucleótidos que codifica la parte variable de la cadena pesada</p>	<p>caggtgcagctgcaggaatctggcctggcctgctgaagcccagcgagacac tgtctctgacctgcgccgtgtccggcgactctatcagcggcggtactactggt cttggatcaggcagagccccggcaagggcctggaatggatcggcctgatcta cggcagcaccgacaccagatacaaccccagcctgaagggcagagtga ccatcagcaaggacaccagcaagaaccagctgtctctgcagctgagaagcg tgaccgctgccgacaccgccgtgtactactgtgccagaagcggctacaactt tggagcggcgagtactacggcctggactcttggggacagggcgctgtcgtga cagtgccagc</p>
<p>SEQ ID NO: 10 Secuencia de nucleótidos que codifica la parte variable de la cadena ligera</p>	<p>gccatccagctgaccagagccctagctctctgagcgcctacgtgggcgaca aagtgaccatcacctgtcacgccagccagggcatcaacagctggctggcctg gtatcagcagaagcccggcaagggccccaagctgctgatctacaaggccag cagcctgtgagcggcgtgccagcagattcagcggctctggetctggcacc gactaacacctgaccatcagctccctgcagagcgaggacttcgccagctacta ctgcctgcagtacgacagcggccctctggccttcggccttggaaacaagctgg acatcaag</p>

<p>SEQ ID NO: 11 Secuencia de nucleótidos que codifica la parte constante de la cadena pesada</p>	<p>gcctetaccaagggcccaagecgtgttccctctggcccctagcagcaagtctac ctctggcggaacagccgccctgggctgcctcgtgaaggactacttcccgagc ccgtgaccgtgtcctggaactctggcgctctgacaageggcgtgcacacctc cctgccgtgctgcagtctagcggcctgtacagcctgagcagcgtcgtgactgt gccctctagctctctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaaccacaagc ccagcaacaccaaggtggacaagaaggtggaacccaagagctgcgacaag acccacacctgtcctcctgtcctgcccctgaactgtgggcggaaccttccgtg ttctgttcccccaaagcctaaggacacctgatgatcagcaggacccccga agtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggacctgaagtgaagtca attggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagag aggaacagtacaacagcacctacaggggtggtgtctgtgctgacagtgtgca ccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgaaggtgtccaacaaggc cctgccagccccatcgaaaagaccatctccaaggccaagggacagcctcg cgagccccagggtgtacacactgcctcccagcagggacgagctgacaagaa tcagggttccctgacctgtctcgtgaaaggcttctaccccagcgacattgccgt ggaatgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccaccccc ctgtgctggacagcgacggctcatttctgtactccaagctgaccgtggaca agtccaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgtccgtgatgcacgaggc cctgcacaaccactacaccagaagtcctgagcctgagcctggcaag</p>
<p>SEQ ID NO: 12 Secuencia de nucleótidos que codifica la parte constante de la cadena ligera</p>	<p>aggaccgtggccgcaccaagtgttttatcttcccaccagcgacgagcagct gaagtccggcacagcttccgtcgtgtgcctgctgaacaacttctaccctaggg aagccaaggtgcagtggaaaggtggacaacgccctgcagtccggcaactccc aggaaagcgtgaccgagcaggacagcaaggactccacctacagcctgagc agcacctgacactgagcaaggccgactacgagaaacataaggtgtacgcc tgcgaagtgaccaccagggcctgtctagccccgtgaccaagagcttcaaca ggggcgagtgc</p>

SEQ ID NO: 13
 Secuencia de
 nucleótidos que codifica
 la cadena pesada

caggtgcagctgcaggaatctggccctggcctgctgaagcccagcgcagacac
 tgtctctgacctgcgccgtgtccggcgactctatcagcggcggtactactggt
 cttggatcaggcagagccccggcaagggcctggaatggatcggcctgatcta
 cggcagcaccgccgacaccagatacaaccccagcctgaagggcagagtga
 ccatcagcaaggacaccagcaagaaccagctgtctctgcagctgagaagcg
 tgaccgtgccgacaccgccgtgtactactgtgccagaagcggctacaacttt
 tggagcggcgagtactacggcctggactcttggggacagggcgctgtcgtga
 cagtgtccagcgccttaccgaagggcccaagcgtgttccctctggcccctagc
 agcaagtctacctctggcggaacagccgccctgggctgcctcgtgaaggact
 actttcccagcccgtgaccgtgtcctggaaactctggcgctctgacaagcggc
 gtgcacaccttccctgccgtgctgcagtctagcggcctgtacagcctgagcag
 cgtcgtgactgtgccctctagctctctgggcacccagacctacatctgcaacgt
 gaaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaggtggaacccaaga
 gctgcgacaagaccacacctgtcctcctgtcctgccctgaactgctgggc
 ggaccttccgtgttctgttcccccaaaagcctaaggacaccctgatgatcagc
 aggacccccgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggaccctg
 aagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaaga
 ccaagcctagagaggaacagtacaacagcacctacaggggtggtgtctgtct
 gacagtgtgcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggt
 gtccaacaaggccctgccagccccatcgaaaagaccatctccaaggccaa
 gggacagcctcgcgagccccagggtgtacacactgcctcccagcagggacga
 gctgacaaagaatcaggtgtcctgacctgtctcgtgaaaggcttctaccca
 gcgacattgccgtggaatgggagagcaacggccagcccagagaacaactaca
 agaccacccccctgtgctggacagcgcagggctcattcttctgtactccaag
 ctgaccgtggacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgctccg
 tgatgcacgagggcctgcacaaccctacaccagaagtccctgagcctgag
 ccctggcaag

<p>SEQ ID NO: 14 Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera</p>	<p>gcatccagctgaccagagccctagctctctgagcgcctacgtgggcgaca aagtgaccatcacctgtcacgccagccagggcatcaacagctggctggcctg gtatcagcagaagcccggcaaggcccccaagctgctgatctacaaggccag cagcctgctgagcggcgtgccagcagattcagcggctctggetctggcacc gactacacctgaccatcagctccctgcagagcgaggacttcgccagctacta ctgectgcagtacgacagcgcccctctggccttcggccctggaacaaagctgg acatcaagaggaccgtggccgcaccaagtgtctttatcttcccaccagcgac gagcagctgaagtccggcacagcttccgtcgtgtgectgctgaacaactcta ccctaggggaagccaaggtgcagtgggaaggtggacaacgccctgcagtccgg caactcccaggaaagcgtgaccgagcaggacagcaaggactccacctacag cctgagcagcacctgacactgagcaaggccgactacgagaaacataaggt gtacgcctgcgaagtgaccaccaggccctgtctagccccgtgaccaagagc ttcaacaggggcgagtgc</p>
<p>SEQ ID NO: 15 Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada que comprende un péptido señal en el N-terminal</p>	<p>atgcatggctcctggatcttctgctgctgctgagcctaccagegccaacgct caggtgcagctgcaggaatctggccctggcctgctgaagcccagcagacac tgtctctgacctgcgccgtgtccggcgactctatcagcggcggctactactggt cttggatcaggcagagccccggcaaggccctggaatggatcggcctgatcta</p>

	<p> eggcagcaccgcegcacaccagatacaaccccagcctgaagggcagagtga ccatcagcaaggacaccagcaagaaccagctgtctctgcagctgagaagcg tgaccgctgcegcacaccgccgtgtactactgtgccagaagcggtacaacttt tggagcggcgagtaactaeggcctggactcttggggacagggcgctgtcgtga cagtgtccagcgccttaccaggggcccaagecgtgttccctctggcccctage agcaagtctacctctggcggaacagccgccctgggctgcctcgtgaaggact actttcccagcccgtgaccgtgtcctggaactctggcgctctgacaagcggc gtgcacaccttccctgcccgtgtcgtcagcttagcggcctgtacagcctgagcag cgctcgtgactgtgccctctagctctctgggcacccagacctacatctgcaactg gaaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaggtggaacccaaga gctgcgacaagaccacacctgtcctccctgtcctgcccctgaactgctgggc ggaccttccgtgttctgttcccccaaaagcctaaggacaccctgatgatcagc aggacccccgaagtgacctgctggtggtggatgtgtcccacgaggacctg aagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgacaacgccaaga ccaagcctagagaggaacagtacaacagcacctacaggggtggtgtctgtct gacagtgtgcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgaaggt gtccaacaaggccctgccagccccatcgaaaagaccatctccaaggccaa gggacagcctcgcgagccccaggtgtacacaactgctcccagcagggacga gctgacaagaatcaggtgtccctgacctgtctcgtgaaaggcttctaccca gcgacattgccgtggaatgggagagcaacggccagcccagagaacaactaca agaccacccccctgtgtcgtggacagcagcggctcattctctgactccaag ctgaccgtggacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgctccg tgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgagcctgag cctggcaag </p>
<p> SEQ ID NO: 16 Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera que comprende un péptido señal en el N-terminal </p>	<p> atgcgatggctctggatcttctgtctgtctgagcaccagcggccaacgc egccatccagctgaccagagccctagctctctgagcgcctacgtgggcgac aaagtgaccatcactgtcagccagccagggcatcaacagctggctggcct ggtatcagcagaagcccggcaaggcccccaagctgtgatctacaaggcca gcagcctgctgagcggcgtgccagcagattcagcggctctggctctggcac cgactacacctgaccatcagctccctgcagagcagaggacttcgccagctact actgcctgcagtacgacagcggccctctggccttcggccctggaacaaagctg gacatcaagaggaccgtggccgcaccaagtgtcttattctcccaccagcga cgagcagctgaagtccggcacagcttccgtcgtgtgctgctgaacaactct accctagggaaagccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtcg gcaactcccaggaaagcgtgaccgagcaggacagcaaggactccacctaca gctgagcagcaccctgacactgagcaaggccgactacgagaacataagg tgtacgcctgcgaagtgaccaccaggccctgtctagccccgtgaccaagag cttcaacaggggcgagtg </p>

SEQ ID NO: 17
 Secuencia de
 nucleótidos que codifica
 la cadena pesada como
 se sintetiza

gctagcgccgccaccatgcatggctcctggatcttctgctgctgctgagcacc
 accagcgccaacgctcaggtgcagctgcaggaatctggcctggcctgctga
 agcccagcgagacactgtctctgacctgcgcccgtgtccggcgactctatcagc
 ggcggctactactggctcttgatcaggcagagccccggcaagggcctggaat
 ggatcggcctgatctacggcagcaccgccgacaccagatacaaccccagcct
 gaagggcagagtgaccatcagcaaggacaccagcaagaaccagctgtctct
 gcagctgagaagcgtgaccgctgccgacaccgccgtgtactactgtgccaga
 agcggctacaacttttggagcggcgagtactacggcctggactcttggggac
 agggcgctgtcgtgacagtgtccagcgcctctaccaagggcccaagcgtgttc
 cctctggcccctagcagcaagtctacctctggcggaaacagccgcccctgggctg
 cctcgtgaaggactactttcccagcccgtgaccgtgtcctggaactctggcg
 ctctgacaagcggcgtgcacacctccctgccgtgtgcagcttagcggcctgt
 acagcctgagcagcgtcgtgactgtgcctctagctctctgggcaccagacc
 tacatctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaag
 gtggaaccaagagctgcgacaagaccacacctgtcctccctgtcctgcccc
 tgaactgctgggcggaccttccgtgttctgttcccccaagcctaaggaca
 cctgatgatcagcaggacccccgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcc
 cacgaggacctgaagtgaagtcaattggtacgtggacggcgtggaagtgc
 acaacgccaagaccaagcctagagaggaacagtacaacagcacctacagg
 gtggtgtctgtgctgacagtgtgcaccaggactggctgaacggcaaagagt
 acaagtgaaggtgtccaacaaggcccctgccagcccccaatcgaaaagacca
 tctccaaggccaagggacagcctcgcgagccccaggtgtacacactgcctcc
 cagcagggacgagctgacaaagaatcaggtgtcctgacctgtctcgtgaaa
 ggcttctaccccagcgacattgccgtggaatgggagagcaacggccagcccc
 agaacaactacaagaccacccccctgtgtgtggacagcgcagggctcattctc
 ctgtactccaagctgaccgtggacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgt
 tcagctgctccgtgatgcacgagggcccctgcacaaccactacaccagaagtc
 cctgagcctgagcccctggcaagtgatagggcgcgcc

<p>SEQ ID NO: 18 Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera como se sintetiza</p>	<p>actagtgccgccaccatgcatggctcctggatcttctctgetgetgetgagca ccagegccaaacggccatccagctgaccagagccctagctctctgagcgc ctactgtgggcgacaaagtgaccatcacctgtcacgccagccagggcatcaac agctggctggcctggtatcagcagaagcccggcaaggcccccaagctgctga tctacaaggccagcagcctgctgagcggcgtgccagcagattcagcggctc tggctctggcaccgactacacctgaccatcagctcctgcagagcagggact tcgccagctactactgctgcagtacgacagcggccctctggcctcggccctg gaacaaagctggacatcaagaggaccgtggccgaccaagtgtctttatcttc ccaccagcagcagcagctgaagtccggcacagcttcctgctgtgctgctgct gaacaacttctaccctagggaaagccaaggtgcagtggaaaggtggacaacgc cctgcagtcggcaactcccaggaaagcgtgaccgagcaggacagcaagg actccacctacagcctgagcagcacctgacactgagcaaggccgactacga gaaacataaggtgtacgctgcgaagtgaccaccagggcctgtctagcccc gtgaccaagagcttcaacaggggagtgctagtgaactctaga</p>
--	--

[0061] Tales polinucleótidos se pueden insertar en un vector recombinante para la clonación o para la expresión de las inmunoglobulinas de la invención.

5 [0062] Otro aspecto de la invención es, por lo tanto, un vector que comprende un polinucleótido que codifica la inmunoglobulina de la invención o uno de sus fragmentos.

10 [0063] El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico en la que una secuencia de interés se puede insertar por digestión con una endonucleasa de restricción, y luego por unión, para el transporte entre diferentes entornos genéticos o para la expresión en una célula hospedadora. Los vectores son, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales de levaduras (YAC), cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y cromosomas artificiales derivados del bacteriófago P1 (PAC), vectores derivados de virus.

15 [0064] Un vector de clonación es un vector capaz de replicarse en una célula hospedadora y que, además, se caracteriza por la presencia de uno o varios sitios de restricción. Un vector de expresión es un vector en el que la secuencia de ADN de interés se puede insertar por digestión con una endonucleasa de restricción y unión de tal manera que se pueda replicar y/o transcribir en ARN. Los vectores pueden contener además uno o varios marcadores de selección o de identificación de las células que han sido transformadas o transfectadas con el vector.

20 [0065] La presente invención incluye todos los vectores recombinantes que contienen secuencias codificantes para la transformación, transfección o terapia génica eucariota o procariota. Tales vectores se podrán preparar según las técnicas convencionales de biología molecular y comprenderán además un promotor apropiado, opcionalmente una secuencia señal para la exportación o la secreción, y secuencias reguladoras necesarias para la transcripción de la secuencia de nucleótidos.

25 [0066] El vector de la invención puede contener las secuencias que codifican la cadena pesada y/o la cadena ligera de la inmunoglobulina de la invención.

30 [0067] Una forma de realización de la invención se refiere, por lo tanto, a un vector que incluye al menos un polinucleótido como se ha definido antes que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o la cadena ligera de una inmunoglobulina tal y como se ha definido antes.

35 [0068] Otra forma de realización de la invención se refiere a un vector que comprende al menos un polinucleótido como se ha definido antes que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada y una secuencia que codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina tal y como se ha definido antes.

40 [0069] Uno de los vectores apropiados en el campo de la invención es una molécula de ácido nucleico recombinante adaptada para recibir y expresar un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido, de manera que permita la expresión de anticuerpos heterodiméricos como un anticuerpo de longitud completa o fragmentos F(ab')₂ o Fab según la invención. Un tal vector proporciona un sistema para clonar independientemente los dos

polinucleótidos en dos casetes separados presentes en el vector, de manera que se forman dos cistrones separados para la expresión de un primer y de un segundo polipéptido del anticuerpo heterodimérico. Dicho vector de expresión se denomina vector bicistrónico

5 [0070] En una forma de realización particular, el vector es una molécula de ácido nucleico en la que se han insertado un polinucleótido que codifica la región variable de cada una de las cadenas ligeras de la inmunoglobulina y un polinucleótido que codifica la región constante de cada una de las cadenas ligeras de la inmunoglobulina, con el fin de introducirlas y de mantenerlas en una célula hospedadora. Dicho vector permite la expresión de estos polinucleótidos en la célula hospedadora porque posee secuencias indispensables (promotor, secuencia de poliadenilación, gen de selección) para esta expresión. Tales vectores son ampliamente conocidos por los expertos en la materia, y pueden ser un adenovirus, un retrovirus, un plásmido o un bacteriófago, sin que esta lista sea limitativa.

15 [0071] Además, es posible introducir en dicho vector unidades de transcripción, es decir, polinucleótidos que contienen los elementos reguladores necesarios para la transcripción de un ácido nucleico de interés en ARN.

[0072] Se pueden utilizar unidades de transcripción conocidas por los expertos, como por ejemplo las descritas en el documento WO2013/061010.

20 [0073] La célula hospedadora productora de la inmunoglobulina es una característica importante porque confiere a la inmunoglobulina algunas de sus propiedades particulares. En efecto, el medio de expresión de las inmunoglobulinas es, al principio, modificaciones post-traduccionales, particularmente modificaciones de la glucosilación, que pueden variar de una línea celular a otra, y así conferir propiedades funcionales diferentes a inmunoglobulinas que, sin embargo, tienen estructuras primarias idénticas.

25 [0074] Otro aspecto de la invención se refiere, por lo tanto, a una célula hospedadora que comprende un vector como se ha definido antes.

30 [0075] Dicha célula hospedadora puede ser una célula procarionta o eucariota. Las inmunoglobulinas de la presente invención pueden ser producidas particularmente en células eucariotas, tales como células YB2/0, CHO o hibridomas humanos o murinos, así como en células vegetales y animales transgénicas.

35 [0076] En una forma de realización particular, la invención se refiere a una célula hospedadora tal como se ha definido antes, caracterizada por el hecho de que se trata de una célula elegida entre: SP2/0, YB2/0; IR983F, el mieloma humano Namalwa, PERC6, las líneas CHO, particularmente CHO-K-1, CHO-LED O, CHO-LED, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7,293-HEK, BHK, K6H6, NSO, SP2/0-Ag 14 y P3X63Ag8.653.

40 [0077] En otra forma de realización preferida, la inmunoglobulina se produce en el hibridoma de rata YB2/0 (célula YB2/3HL. P2. G11.16Ag.20, depositada en la American Type Culture Collection con el número ATCC n° CRL-1662).

45 [0078] Preferiblemente, la línea celular estable que expresa una inmunoglobulina según la invención, y particularmente elegida del grupo previamente descrito, integra el (o los) vector(es) de expresión de la cadena pesada y de la cadena ligera tal como se ha descrito previamente.

[0079] Los expertos conocen otros métodos para producir inmunoglobulinas débilmente fucosiladas, y se pueden utilizar para la preparación de las inmunoglobulinas de la invención.

50 [0080] De manera no exhaustiva, puede tratarse, por ejemplo, de métodos de preparación de anticuerpos en células cultivadas en presencia de kifunensina, tal y como se describe, por ejemplo, en el documento US 7,700,321.

[0081] También se pueden introducir análogos de fucosa en el medio de cultivo de células productoras de anticuerpos como se describe en el documento US 2009/0317869.

55 [0082] Otro medio de producción del anticuerpo puede ser el uso, por ejemplo, de células para las cuales la vía de producción de GDP-fucosa se inhibe, por ejemplo, por inhibición de por lo menos una de las enzimas del ciclo de producción de fucosa, tal y como se describe, por ejemplo, en el documento US 2010/291628 o US 2009/0228994, en el documento EP 1,500,698, en el documento EP 1,792,987 o incluso en el documento US 7,846,725, sin que esta lista sea limitativa.

60 [0083] También es posible utilizar ARN interferente (ARNi) que inhiba la 1,6-fucosiltransferasa, como se describe en el documento US 7,393,683 o el documento WO 2006/133148.

[0084] También puede tratarse de métodos de preparación de anticuerpos en animales transgénicos, tal y como se describe en el documento WO 2007/48077. También puede tratarse de métodos de preparación de anticuerpos en levaduras, tal y como se describe, por ejemplo, en el documento WO 02/00879.

5 [0085] En caso de que la región Fc del anticuerpo posea un 100% de oligosacáridos no fucosilados, es decir, cuando la región Fc del anticuerpo está totalmente desprovista de fucosa, es posible utilizar los métodos de preparación conocidos por los expertos, como por ejemplo los descritos en los documentos EP 1,176,195, US 7,214,775, US 6,994,292, US 7,425,449, US 2010/223686, WO 2007/099,988, EP 1,705,251, sin que esta lista sea limitativa. Puede tratarse, por ejemplo, de un método que utiliza una célula hospedadora que expresa al menos
10 un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la invención, y cuya glucosilación se modifica por delección del gen que codifica la 1,6-fucosiltransferasa o por adición de una mutación de este gen para eliminar la actividad de α 1,6-fucosiltransferasa, y expresando como tal un anticuerpo desprovisto de fucosa. También puede tratarse de un método que comprende la mutación de los aminoácidos de la parte Fc.

15 [0086] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición, particularmente farmacéutica, que incluye al menos una inmunoglobulina, preferiblemente humana, o uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes.

[0087] Dicha composición farmacéutica comprende preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo corresponde, en el contexto de la invención, a un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos de la composición.
20

[0088] El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, un cultivo celular, un tejido o un organismo. Las características del vehículo dependerán del modo de administración.
25

[0089] En otro aspecto, la invención se refiere a una inmunoglobulina, preferiblemente humana, o a uno de sus fragmentos tal como se ha definido antes, para su uso como medicamento.

[0090] En otro aspecto, la invención se refiere a una inmunoglobulina, preferiblemente humana, o a uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes, para su uso en el tratamiento o la prevención de patologías asociadas a las toxinas del carbunco.
30

[0091] El término "prevención" corresponde a la prevención de la aparición de la enfermedad en un sujeto, en particular un humano, cuya enfermedad todavía no se ha manifestado.
35

[0092] El término "tratamiento" corresponde a la inhibición de esta enfermedad, a saber, la interrupción de su desarrollo, su regresión, o la desaparición de los síntomas y consecuencias de la enfermedad, o incluso la desaparición de las causas de la enfermedad.

[0093] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la detección *in vitro* de una toxina del carbunco que comprende el antígeno protector (PA) en una muestra biológica, que comprende:
40

- la puesta en contacto de la muestra con al menos una inmunoglobulina o uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes, y
- la detección de la unión de dicha inmunoglobulina o uno de sus fragmentos como indicador de la presencia de dicha toxina del carbunco.
45

La muestra biológica puede ser líquida, por ejemplo saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, suero o sangre, o sólida o semisólida, por ejemplo tejidos o materias fecales o un tejido sólido como el que se utiliza normalmente para el diagnóstico histológico.
50

[0094] La inmunoglobulina de la invención se puede utilizar *in vitro*, por ejemplo en pruebas inmunológicas en las que se utilizan en fase líquida o ligadas a un vehículo en fase sólida. Algunos ejemplos de vehículos ampliamente conocidos son el vidrio, el poliestireno, el polipropileno, el polietileno, el dextrano, el nylon, la amilasa, la celulosa natural o modificada, la poliacrilamida, la agarosa o la magnetita. Algunos ejemplos de pruebas inmunológicas que utiliza la inmunoglobulina anti-Pa de la invención son los radioinmunoensayos, los marcados histoimmunológicos, los ELISA, los Western blot, las pruebas de inmunoprecipitación, las pruebas de inmunodifusión, las pruebas de fijación del complemento, los análisis por citometría de flujo (FACS) o incluso los análisis por chips de proteínas.
55

[0095] La inmunoglobulina de la invención se puede marcar. Algunos ejemplos de marcadores comprenden las enzimas, los radioisótopos, los compuestos fluorescentes, los metales coloides, los compuestos quimioluminiscentes y los compuestos bioluminescentes. Los métodos de unión de un marcador a una inmunoglobulina son ampliamente conocidos por la persona experta.
60

[0096] Otra técnica de marcado consiste en unir la inmunoglobulina a haptenos de bajo peso molecular, estos haptenos pudiendo ser específicamente modificados a través de una segunda reacción. Los ejemplos de haptenos
65

son la biotina, que reacciona con la avidina, o el dinitrofenol, el piridoxal o la fluoresceína, que pueden reaccionar con inmunoglobulinas específicas antihaptenos.

5 [0097] En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para la detección de una toxina del carbunco que comprende el antígeno protector (PA), donde dicho kit comprende:

- un recipiente que comprende al menos una inmunoglobulina anti-Pa o uno de sus fragmentos de la invención y que puede estar marcada o no,
- opcionalmente, un recipiente que incluye soluciones tampón
- 10 – y, opcionalmente, un recipiente que comprende medios de detección de la inmunoglobulina o de uno de sus fragmentos marcados, tal como una proteína de unión a la biotina, por ejemplo, avidina o estreptavidina, unida a una molécula transportadora, tal como un marcador fluorescente o enzimático.

15 Este recipiente puede también comprender medios de detección de la inmunoglobulina o de uno de sus fragmentos no marcados, ya sean esencialmente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

[0098] En una forma de realización, la invención se refiere a un kit para la detección de una toxina del carbunco que comprende el antígeno protector (PA) como se ha definido antes, donde dicho kit comprende:

- 20 – un recipiente que comprende al menos una inmunoglobulina o uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes, marcado, y
- un recipiente que comprende medios de detección de dicha inmunoglobulina o de uno de sus fragmentos marcados.

25 [0099] La cantidad de inmunoglobulina marcada administrada debe ser suficiente para permitir la detección de la unión de la inmunoglobulina a la toxina. La cantidad de inmunoglobulina marcada administrada dependerá de factores tales como la edad y el sexo del sujeto, así como del estadio de la enfermedad. La cantidad administrada puede variar entre 0,01 mg/kg y 50 mg/kg, preferiblemente entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg, y más preferiblemente entre 0,1 mg/kg y 2 mg/kg.

30 [0100] La inmunoglobulina de la invención se puede unir a un radioisótopo de manera directa, o indirecta, por medio de grupos funcionales. Los grupos funcionales normalmente utilizados son, por ejemplo, el ácido dietiltri-aminopentaacético (DTPA) y el ácido etilendi-aminotetraacético (EDTA). Los ejemplos de iones metálicos radioisótopos son ^{111}In , ^{97}Ru , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr y ^{201}Tl . Las inmunoglobulinas de la invención también se pueden marcar con un isótopo paramagnético para el diagnóstico por imagen por resonancia magnética (RM) o por resonancia de espín electrónico (ESR). También se pueden utilizar radioisótopos gamma emisores de positrones, tales como ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{68}Ga , ^{52}Cr y ^{56}Fe .

35 [0101] Las inmunoglobulinas o uno de sus fragmentos de la invención también se pueden utilizar *in vitro* o *in vivo* para seguir la evolución del tratamiento de la enfermedad, por ejemplo mediante la determinación del aumento o la disminución del número de células atacadas por las toxinas del carbunco o los cambios en la concentración de la toxina PA en una muestra biológica.

40 [0102] En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método de tratamiento de un sujeto, preferiblemente un humano, susceptible de ser infectado por *Bacillus anthracis*, en el que una cantidad terapéuticamente eficaz de una inmunoglobulina según la invención se administra a dicho sujeto.

45 [0103] El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad que es suficiente para efectuar el tratamiento cuando ésta se administra a un sujeto que lo necesita. La cantidad terapéutica efectiva depende del sujeto, del estadio de la enfermedad que se desea tratar y del modo de administración, y se puede determinar mediante operaciones rutinarias por el experto en la materia.

50 [0104] El término "carbunco" se refiere a cualquier enfermedad causada, directa o indirectamente, por una infección por *Bacillus anthracis*.

55 [0105] Los síntomas iniciales de una infección por inhalación se asemejan a los de un resfriado o de una gripe (fiebre, dolores musculares). Después de varios días, estos síntomas progresan hacia problemas graves de dificultad respiratoria y de choque séptico. Sin ningún tratamiento, la inhalación de esporas de *Bacillus anthracis* suele ser fatal. La infección cutánea por el carbunco tiene lugar cuando la bacteria entra en la piel por una brecha cutánea preexistente. Esta infección da lugar en primer lugar a una pápula, que en los siguientes dos a tres días se desarrolla hasta convertirse en una vesícula y luego en una úlcera de 1 a 3 centímetros de diámetro que presenta un área necrótica en el centro. La infección gastrointestinal por el carbunco se desarrolla tras el consumo de carne contaminada y se caracteriza por una inflamación aguda del tubo digestivo.

60

[0106] Una cantidad terapéuticamente eficaz corresponde a una cantidad suficiente para disminuir los síntomas de la enfermedad y la evolución de la infección. Esta cantidad puede variar con la edad, el sexo del sujeto y el nivel de la enfermedad, y la determinará una persona experta en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar entre 0,01 mg/kg y 50 mg/kg, preferiblemente entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg, y más preferiblemente entre 0,1 mg/kg y 2 mg/kg, en una o varias administraciones diarias, durante uno o varios días, preferiblemente en una o dos administraciones en total. El modo de administración puede ser por inyección o por perfusión gradual. La inyección puede ser intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o transdérmica. Los preparados para administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones o emulsiones. Algunos ejemplos de solventes no acuosos son el propilenglicol, el polietilenglicol, los aceites vegetales, tal y como el aceite de oliva, o los ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Los vehículos acuosos comprenden el agua, las soluciones alcohol/agua, las emulsiones o las suspensiones.

[0107] En otro aspecto, la invención se refiere a un inmunoconjugado que comprende una inmunoglobulina, o uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes, unida a un agente terapéutico.

[0108] En una forma de realización, la invención se refiere a un inmunoconjugado que comprende una inmunoglobulina, o uno de sus fragmentos tal y como se ha definido antes, unida de manera directa o indirecta a un agente terapéutico.

[0109] Tales agentes terapéuticos comprenden agentes químicos, radionucleidos, agentes inmunoterapéuticos, citocinas, quimiocinas, toxinas o inhibidores de enzimas. Algunos ejemplos de toxinas son la cadena A de la difteria, la cadena A de la exotoxina, la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeccina, la alfa-sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas diantinas, las proteínas *Phytolaca americana*, el inhibidor *Momordica charantia*, la curcina, la crotina, el inhibidor *Saponaria officinalis*, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y los tricotecenos. Algunos ejemplos de radionucleidos son ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

[0110] Ventajosamente, la inmunoglobulina de la invención o uno de sus fragmentos se asocia en un tratamiento profiláctico con la tetraciclina. La inmunoglobulina de la invención permite acortar la profilaxis en función de la tetraciclina, parando, de manera segura, después de un riesgo de exposición, mediante un tratamiento rápido ("tratamiento corto") de tetraciclina seguido de una inyección de la inmunoglobulina de la invención.

[0111] Ventajosamente, la inmunoglobulina de la invención se asocia a un tratamiento curativo con ciprofloxacina.

[0112] La presente invención se comprenderá mejor con ayuda de las figuras y los ejemplos siguientes.

Leyendas de las figuras

[0113]

Figura 1.

Esquema en forma de collar de perlas de la región variable de la cadena pesada (A) y de la cadena ligera (B) de la inmunoglobulina 35PA83.

La representación según el sistema IMGT en forma de collar de perlas está hecha según la numeración IMGT. Los círculos con rayas corresponden a las posiciones que faltan de la numeración IMGT.

Figura 2.

Esquema en forma de collar de perlas de la región variable de la cadena pesada (A) y de la cadena ligera (B) de la inmunoglobulina 35PA83 "6.20".

La representación según el sistema IMGT en forma de collar de perlas está hecha según la numeración IMGT. Los círculos con rayas corresponden a las posiciones que faltan de la numeración IMGT.

Figura 3.

Perfil HILIC-UPLC-FD de los N-glucanos del anticuerpo 35PA83 "6.20" liberados después de un tratamiento con ayuda de peptidil-n-glucosidasa F (PNGasa F).

El eje de las abscisas corresponde al tiempo de elución en minutos. El eje de las ordenadas indica la intensidad elevada para cada compuesto identificado en unidades de emisión.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: construcción del vector que codifica la inmunoglobulina 35PA83 "6.20"

- Cepas de *Escherichia coli*

[0114] Se utilizaron las siguientes cepas de *E. coli*:

- XL1 (Stratagène, La jolla, CA): recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 sup E44 relA1 lac[F'proAB proAB lacIqZAM15 Tn10(Tetr)].
- SURE (Stratagène): e14(McrA) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endAI supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kanr) uvrC [F'proAB proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]
- 5 - HB2151 (Carte et al., 1985), utilizada para la expresión de Fab solubles
- TOP10 (Invitrogen): utilizada para la construcción del vector de expresión eucariota.

Toxinas

10 [0115] Las toxinas del carbunco (PA83, LF y EF) se compraron a List laboratories.

Construcción de mutantes de Fab a partir de 35PA83

15 [0116] En primer lugar se construyó una variante con el fin de humanizar el fragmento de inmunoglobulina 35PA83. EstA variante se obtuvo realizando las mutaciones descritas en las tablas siguientes:

Tabla 4: mutaciones para la humanización de la cadena pesada de 35PA83

Posición del aminoácido	35PA83	Hu35PA83
1	Ninguno	Q
2	Ninguno	V
3	Ninguno	Q
4	Ninguno	L
5	Ninguno	Q
6	Ninguno	E
7	Ninguno	S

Tabla 5: mutaciones para la humanización de la cadena ligera de 35PA83

Posición del aminoácido	35PA83	Hu35PA83
1	Ninguno	A
2	Ninguno	I
3	Ninguno	Q
4	Ninguno	L

20 [0117] A partir de esta variante humanizada, se generaron secuencias mutantes derivadas del gen 35PA83 por mutagenesis masiva o Massive mutageneses® (Biomethodes, Evry, France). Las mutaciones se introdujeron en las CDR de las cadenas pesadas y ligeras utilizando codones NNS (N codifica A, T, G, o C y S codifica G o C). Las regiones CDR se definieron según Kabat et al. (Wu and Kabat, 1970) e IMGT (Lefranc, Pommie et al., 2003).
 25 El ADN obtenido se utilizó para transformar las células SURE por electroporación. Después de la adición de medio SB complementado con carbenicilina al cultivo e incubación durante 1h a 37°C, se agregó al cultivo 1 ml de phage helper VC5M13 (Andris-Widhopf et al., 2001) (aproximadamente 1012 pfu). Después de incubación durante 2h, se añadieron 70 µg/ml de canamicina y el cultivo se sometió a agitación durante la noche.

30 Selección de inmunoglobulinas por fago

[0118] Las partículas de fagos-inmunoglobulinas purificaron y se concentraron a partir de 50 ml de cultivo por precipitación en polietilenglicol (PEG), luego se volvieron a suspender en 3 ml de PBS-BSA al 1 %- azida al 0,02% y se filtraron en un filtro de 0,45 µm. El contenido de esta preparación de fagos era de aproximadamente 1010 pfu/ml. Las fagos-inmunoglobulinas se sometieron a tres ciclos de infección-selección-recuperación, correspondientes a 5, 10 y 15 lavados respectivamente, como se ha descrito previamente (Andris-Widhopf, Rader et al., 2000).

Expresión, extracción periplásmica y purificación de Fab mutantes solubles

40 [0119] Cada variante de ADN se transformó en bacterias de la cepa de *E. coli* HB2151, hechas 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 1 mM de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) durante 18h a 22°C. Los fragmentos de
 45 inmunoglobulinas se extrajeron con sulfato de polimixina B (Sigma) y se purificaron en columna de níquel (Ni-NTA spin column, QIAGEN, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante, y luego diálisis con PBS 1 X a 4°C durante 3h.

Cuantificación del Fab soluble

50 [0120] La pureza del Fab se evaluó mediante SDS-PAGE y su concentración se determinó con ayuda del software Quantity One(R) (Biorad).

Medición en tiempo real de la resonancia por plasmones de superficie (SPR)

5 [0121] Las constantes cinéticas de la interacción entre PA83 y las variantes 35PA83 se determinaron utilizando el sistema Biacore X SPR (BIAcore, Uppsala, Sweden). El PA83 se inmovilizó sobre un chip sensible CM5 (Biacore) utilizando un procedimiento de acoplamiento de los aminoácidos por inyección de 30 μ l de 2 μ g/ml de PA83 en 10 mM de sodio acetato pH 4,5. Para minimizar la probabilidad de que se produjeran uniones de nuevo, se midió la K_D utilizando una velocidad elevada (30 μ l/min) y una cantidad mínima de antígeno acoplado (aproximadamente 500 RU, unidades de resonancia). Los índices de unión de diferentes concentraciones de Fab que iban de 5 a 10 400 nM en PBS se determinaron a una velocidad de 30 μ l/min. Los datos de unión se introdujeron en un modelo de Langmuir 1:1 del software de evaluación BIA (Biacore). Las constantes de asociación y de disociación (k_{on} y k_{off} respectivamente) para la unión del Fab a PA83 se determinaron a 35°C.

Análisis de secuencias

15 [0122] Las secuencias de las cadenas pesada y ligera de los clones seleccionados se determinaron mediante Génome Express (Meylan, Francia) utilizando los cebadores ompseq y newpelseq (Andris-Widhopf, Rader et al., 2000). Las secuencias analizaron en línea, utilizando el sistema IMG T.

20 [0123] Entre los clones seleccionados, se identificó la variante 35PA83 "6.20". La región variable de la cadena pesada (VH) de la variante "6.20" (SEQ ID N°: 1) presenta 2 mutaciones en comparación con la del Fab 35PA83 humanizado: H→L (residuo 54 según la nomenclatura del IMG T) y S→G (residuo 74 según la nomenclatura del IMG T). La región variable de la cadena ligera (VL) de la variante "6.20" (SEQ ID N°: 2) presenta 1 mutación en comparación con la del Fab 35PA83 humanizado: Q→L (residuo 68 según la nomenclatura del IMG T). 25

Construcción del vector de expresión ATH-GA para la expresión de la inmunoglobulina 35PA83 "6.20"

30 [0124] Una secuencia que codifica el péptido señal optimizado MB7 (SEQ ID NO:19, **MRWSWIFLLLLSITSANA**) se añadió al extremo N-terminal de las dos secuencias que codifican respectivamente las partes variables de la cadena pesada y la cadena ligera de la variante 35PA83 "6.20" (SEQ ID NO: 7 y 8). Estas secuencias se optimizaron y sintetizaron por GeneArt (Regensburg, Germany).

35 [0125] A continuación se clonaron las secuencias de las cadenas pesada y ligera de la variante en el vector *HK gen EFss* para obtener el vector ATH-GA.

La secuenciación del vector ATH-GA se realizó según la técnica de Sanger (o método de los terminadores de cadena, Ref. : Sanger F. y al, 1977, PNAS 74: 5463).

40 Las secuenciaciones se realizaron mediante Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania) según el nivel de calidad reglamentario "GLP". Se trata del nivel de calidad máximo, con cubierta bicatenaria de la secuencia de ADN, un mínimo de redundancia de 2 veces, una precisión superior al 99,999%, instrumentos específicos, la edición de una relación de calidad y el archivo de los documentos generados.

La preparación del vector ATH-GA se conservó en tampón TE (10 mM Tris pH 8 y 1 mM EDTA) a -20°C antes del ajuste a la concentración de 1 μ g/ μ l para la transfección en las líneas celulares YB2/0.

Ejemplo 2: obtención de transformantes productores de la inmunoglobulina 35PA83 "6.20"

45 [0126] El anticuerpo 35PA83 "6.20" se produjo en las líneas YB2/0. Para los experimentos siguientes, la técnica ELISA aplicada se hizo según las condiciones siguientes:

50 Se cubren placas de 96 pocillos de microtitulación (maxisorp, Nunc, Dinamarca) con PA diluido en PBS (5 μ g/ml, 100 μ l por pocillos), durante la noche a 4°C. Las placas se bloquean por adición de 200 μ l de PBS-BSA 5% a 37°C durante 1 hora, y se incuban sueros diluidos en serie en PBS-Tween 20 0,1% - BSA 1%(100 μ l por pocillo) a 37°C durante 2 horas. Se incuban una fosfatasa alcalina anti-IgG de ratón conjugada o un conjugado "anti-human IgG alkaline phosphatase conjugate" (Sigma) (1/10 000) a 37°C durante 1 hora. Luego se incuban un substrato de P-Nitrofenil fosfato durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los resultados se determinan por medición de la absorbancia a 405 nm con un lector automatizado de microplacas (iEMS reader MF, Labsystems, Helsinki, Finlandia). El último punto de dilución cuya reversión determina el contenido del suero se determina como que proporciona una señal inferior o igual a 2 veces el suero sin tratar utilizado para el control negativo.

a. Índice de transformación

60 [0127] ► El vector ATH-GA se introdujo por electroporación en la línea celular hospedadora YB2/0. Después de ponerlos en medio selectivo (con el agente selectivo G418), se obtuvieron conjuntos de transfectantes y se extendieron en medio semisólido en presencia de anticuerpos anti-IgG humanos fluorescentes y en condiciones que permitían el crecimiento de colonias aisladas. La intensidad de fluorescencia de las colonias, proporcional a su capacidad de producción, se analizó mediante la máquina automática ClonePixFL (CPFL) y las colonias que presentan la fluorescencia más importante se recuperaron por la máquina automática. 65

b. Selección de los transformantes

► Índice de producción: primera detección de los transformantes más fuertes productores

5 [0128] La producción de IgG humanas se determinó mediante la técnica ELISA sobre los sobrenadantes de los pocillos de P96 en doble selección que contenían células con el fin de realizar una primera jerarquización de clóides sobre sus capacidades de producción. Se realizaron tres detecciones sucesivas (cada 2-3 días) y se seleccionaron los 10 mejores productores de cada detección. De 528 transformantes, 27 se siguieron y se mantuvieron en P24 y se realizó en paralelo un estudio de su productividad en D+3 y de su producción máxima (D+7).

10 ► Productividad a D+3 y producción máxima (D+7)

[0129] Los mejores clones productores seleccionados con una productividad en mayoría superior a 5 pcd y una producción máxima superior a 10 µg/ml se amplificaron celularmente en medio selectivo (doble selección) para su preservación en nitrógeno líquido.

15

c. Selección de un clon y producción de la inmunoglobulina 35PA83 "6.20" en biorreactor

[0130] Se retuvo un clon para la producción de la inmunoglobulina 35PA83 "6.20" en biorreactor (10L) en función de sus características de crecimiento y productividad. la inmunoglobulina 35PA83 se produjo, se concentró y se purificó.

20

Ejemplo 3: perfil de N-glicosilación de 35PA83 "6.20"

25 [0131] La determinación del nivel de fucosa en los sobrenadantes de los clóides seleccionados a D+3 y D+7 se realizó mediante la técnica ELISA. Para determinar el perfil de N-glicosilación de las inmunoglobulinas 35PA83 "6.20", estas se trataron enzimáticamente con peptidil-N-glicosidasa (PNGasa F). El perfil cuantitativo de la mezcla de N-glucanos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución en modo HILIC (UPLC/FD).

30 [0132] Resultados: La figura 3 muestra el perfil de N-glicosilación de las inmunoglobulinas 35PA83 "6.20". En la Tabla 6 se enumeran las principales especies identificadas, afectadas por su razón molar relativa (RMR, %), los índices de fucosilación (Fuc), de GlcNAc intercalada (Bis-GlcNAc) y de sialilación, así como el índice de galactosilación (Gal).

Abreviaturas	Estructuras glucánicas
G0-Gn	0,7
G0F-Gn	0,7
G0	26,4
G0B	10,7
G0F	26,2
Man5	0,0
G0FB	15,8
G1(1,6)	2,7
G1(1,3)	1,5
G1(1,6)B	1,4
G1(1,3)B	0,0
G1(1,6)F	4,4
G1(1,3)F	1,9
G1(1,6)FB	3,3
G1(1,3)FB	0,3
G2	0,0
G2B	0,2
G2F	0,6
G2FB	1,5
G1(1,3)NeuAc1	0,0
G1(1,3)FNeuAc1	0,3
G1(1,3)FBNeuAc1	0,3
G2(1,3)NeuAc1	0,0
G2(1,3)BNeuAc1	0,0
G2F(1,3)NeuAc1	0,0
G2FB(1,3)NeuAc1	0,4
G2NeuAc2	0,0
G2BNeuAc2	0,0
G2FNeuAc2	0,0
G2FBNeuAc2	0,0
No identificado	0,6
Índice de fucosilación (%)	40
Índice de galactosilación (%)	22
Índice de Bis-GlcNac (%)	34

Tabla 6

[0133] La inmunoglobulina 35PA83 se caracteriza por un perfil de glucosilación complejo estrictamente biantenarico con estructuras predominantemente agalactosiladas de tipo G0 ($\approx 80\%$) cuyo núcleo pentasacárido es sustituido o no por un residuo de fucosa (G0F), un residuo de GlcNac intercalado (G0B), o ambos (G0FB). Estructuras mono y bigalactosiladas de tipo G1,2(F)(B) sialiladas o no se observan también en baja abundancia ($\approx 80\%$), con un índice de galactosilación de los N-glucanos del 22%. El índice de fucosilación de los N-glucanos es del 40%, mientras que el índice de estructuras de GlcNac intercalada es del 34%.

5 **Ejemplo 4: medición de las constantes cinéticas de la inmunoglobulina 35PA83 “6.20”**

10

[0134] Después de la producción de inmunoglobulina 35PA83 "6.20" en células YB2/0, el sobrenadante del cultivo celular se recupera, se concentra 15 veces y luego se somete a cromatografía de afinidad utilizando una proteína recombinante A-Sefarosa. Un segundo paso de purificación se lleva a cabo utilizando la columna de intercambio catiónico HiPrep 16/10 SP FF. La integridad de la inmunoglobulina purificada y la ausencia de contaminantes son controladas por SDS-PAGE y ELISA para su unión a PA83 recombinante. Las constantes de afinidad se miden por resonancia de plasmones de superficie (SPR) utilizando BIAcore(TM) (Biacore Uppsala, Suecia). Se inmoviliza el PA83 (List biological laboratories, Campbell, CA) a un máximo de 210 RU en un chip CM5 (Biacore) mediante un enlace amina, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Durante la medición se mantiene un flujo de 30 µl/min. Para cada medición, se prueban un mínimo de 6 diluciones de inmunoglobulina en tampón HBS-EP (Biacore), con concentraciones que oscilan entre 10 y 0,1 µg/ml, durante 1900 segundos. Después de cada dilución de inmunoglobulina, el chip se regenera con glicina pH 1,5 (Biacore), con un flujo de 10 µl/min durante 30 segundos. Las constantes de afinidad se calculan utilizando un método de analito bivalente (Karlsson et al. 1991), y se verifican con pruebas internas de coherencia (Schuck et al. 1996).

[0135] Resultados: la inmunoglobulina 35PA83 "6.20" presenta, frente al antígeno PA83, una constante de asociación (K_a) de $2,93 \cdot 10^5$ M, una constante de disociación (K_d) de $9,70 \cdot 10^{-6}$ M y una constante de afinidad (KD) de $3,3 \cdot 10^{-11}$ M.

Ejemplo 5: medición del efecto neutralizante de 35PA83 "6.20"

[0136] La prueba de neutralización *in vitro* se realiza según el protocolo descrito por Little et al (Little et al., 1990). La línea celular de macrófagos de ratón J774A.1 (ATCC-TIB67) se cultiva en frascos de cultivo no tratados para que se desarrollen en suspensión. Las células se trasplantan dos veces por semana a medio IMDM 10% FCS a $0,3 \times 10^6$ células/mL. La actividad tóxica se obtiene mediante la mezcla extemporánea de PA (List laboratories) y LF (List laboratories). Una suspensión celular IMDM de 5×10^5 células/mL sin rojo de fenol que contiene 5% de FCS se distribuye en una microplaca de fondo redondo a razón de 200% µL/pocillo. Después de 16 horas a 37°C, 5% de CO₂, las células adheridas forman un estrato de células monocapa.

D0:

[0137]

- Eliminación del medio de cultivo (eliminación de la LDH liberada espontáneamente durante el cultivo)
- Preparación de las gamas de concentración constante de PA 100ng/mL + LF concentración variable (100-50-25-12,5-6,25-3,12-1,6-0,78 ng/mL)
- Preparación de las gamas de concentración de LF 100ng/mL constante + PA concentración variable (100-50-25-12,5-6,25-3,12-1,6-0,78 ng/mL)
- Se distribuyen 200µL de cada una de las concentraciones de la mezcla de toxinas por pocillo, la placa se incuba durante 4 horas a 37°C
- Para comprobar el poder neutralizante del anticuerpo antiPA se elige una concentración fija de mezcla tóxica que se incuba previamente durante 1 hora a 37°C con una serie de diluciones del anticuerpo, y luego se distribuye en la placa.
- Una gama de lisis celular inducida por 1% Triton X100 y que representa 100-75-50-50-50-25-12,5-6,25 y 0% de lisis.

Las muestras se depositan por triplicado.

D0+4h:

[0138] La concentración de LDH liberada por la lisis de las células se mide según las instrucciones del kit Cyto Tox 96 Non-radioactive Cytotoxic Assay de Proméga.

[0139] Las concentraciones óptimas de PA y LF se determinan realizando un ensayo de efecto-dosis de PA en presencia de una concentración fija de LF y un ensayo de efecto-dosis de LF en presencia de una concentración fija de PA.

Los valores de EC50 son, para PA, de 31 y 32 ng/mL en presencia de 100 ng/mL de LF y, para LF, de 6,5 y 6,2ng/mL en presencia de 100 ng/mL de PA.

La combinación de 100ng/mL de PA con 100ng/mL de LF permite obtener una lisis celular máxima cercana al 80%. La actividad neutralizante del anticuerpo antiPA está determinada por su capacidad de unirse a la AF y bloquear así la unión de la AF a los receptores celulares.

La toxina, que consiste en la mezcla de 100 ng/mL de PA y 100ng/mL de LF, se incuba en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpos antiPA durante 1 hora a 37°C. 200µL de la mezcla se depositan en forma de triplicado en los pocillos que contienen las células J774A.1.

[0140] Resultados: El efecto neutralizante del anticuerpo 35PA83 "6.20" se evaluó en dos series de pruebas bajo las siguientes condiciones:

Serie 1: Concentración de anticuerpos antiPA: 50-10-2-2-0,4-0,08-0,016-0,0032-0ng/mL

Serie 2: Concentración de anticuerpos antiPA: 50-15,01-4,51-1,35-0,406-0,1220-0,037-0ng/mL

Bajo estas condiciones, el anti-PA neutraliza el efecto de la toxina de PA/LF de una manera dependiente de la dosis e inhibe completamente la mortalidad celular a concentraciones superiores a 10 ng/mL. El valor de neutralización del 50% (EC₅₀) se determina para la inmunoglobulina 35PA83 "6.20"; es de alrededor de 4-5ng/mL.

Ejemplo 6: Estudios farmacocinéticos

[0141] Para evaluar el tiempo de semivida de la inmunoglobulina 35PA83 "6.20", seis ratones A/J de seis semanas de edad (Harlan, Gannat, Francia) se dividieron en dos subgrupos de igual tamaño. Todos los ratones recibieron inmunoglobulina 35PA83 "6.20", administrada mediante una sola inyección subcutánea a una dosis de 10 mg/kg. La sangre se recolectó mediante punción retroorbital diaria, desde el día 1 hasta el día 6 después de la inyección, luego desde el día 8 hasta el día 10 después de la inyección, usando los ratones alternativamente en cada día separado. El tiempo de semivida de la inmunoglobulina 35PA83 "6.20" se estableció a partir de los resultados de las pruebas ELISA realizadas en conjuntos de muestras de suero, tras la extrapolación lineal de los valores obtenidos. Para realizar las pruebas ELISA, los pocillos de la placa de microtitulación de 96 pocillos se incubaron con antígeno PA83 o antígeno LF (List Laboratories) diluido en tampón PBS (5 µg/ml, 100 µl por pocillo) durante la noche a 4°C. Los sitios libres de los pocillos de las microplacas se bloquearon mediante incubación con un volumen de 200 µl de una solución de albúmina bovina sérica (BSA) al 5% en tampón de PBS durante 1 hora a 37°C. Los sueros se diluyeron en serie en un tampón de PBS al 0,1% de Tween®, 20,1% de BSA y se incubaron en las placas (100 µl/pocillo) durante 2 horas a 37°C. A continuación, los pocillos de las placas se incubaron con un conjugado IgG/ fosfatasa alcalina anti-ratón o un conjugado IgG antihumano/ fosfatasa alcalina diluido a 1:10 000 (Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) durante 1 hora a 37°C. Se añadió sustrato de P-nitrofenil fosfato (Sigma) y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia a 405 nm se determinó utilizando un lector automático de microplacas (lector iEMS MF, Labsystems, Helsinki, Finlandia). El punto límite de dilución, cuyo valor recíproco corresponde al contenido de anticuerpos del suero, se definió como el punto en el que el valor de la señal era igual al doble del valor de la señal medido para el suero de ratón sin tratar. El suero de ratón sin tratar se utiliza como control negativo.

Ejemplo 7: Estudios de protección pasiva en ratas

[0142] Para las pruebas *in vivo*, se inyecta a ratas Fischer (250 a 300 g) (C. River, L'Abresle, Francia) 40 µg de PA (List biological laboratories, Campbell, CA) y 8 µg de LF por 250 g de rata, como se describe en Ezzel et al. (Ezzel et al., 1984), excepto en que se utiliza la vena caudal. Se utilizan 4 animales por grupo y para la evaluación de la inmunoglobulina 35PA83 "6.20" se añade inmunoglobulina a PA y LF antes de la inyección. Las ratas se observan dos veces al día durante 10 días. Todas las pruebas *in vivo* presentadas en este estudio están aprobadas por el comité local de ética para la experimentación y el cuidado de los animales.

Preparación y uso de esporas Sterne:

[0143] Se preparan esporas de *B. anthracis* Sterne (colección Pasteur) como se expone en Albrecht et al (Albrecht et al., 2007), y se mantienen congeladas (-20°C). Las esporas se cuentan por conteo de la placa viable después de la congelación/descongelación y el conteo se verifica cuando se usa cada tubo en este estudio. La DL₅₀ de estas esporas administradas por vía intravenosa en ratones A/J macho (Harlan, Gannat, Francia), de 9 semanas de edad, con un peso de 20-25 g, se establece en 1.10⁴, lo que lleva a la muerte en 48 a 72 horas, cerca de un valor de 2,10(4) utilizado en otro estudio (Albrecht et al., 2007).

Ejemplo 8: Profilaxis con inmunoglobulina 35PA83 "6.20", tratamiento corto con tetraciclina, o ambos

[0144] Para los estudios de un régimen profiláctico de 35PA83 inmunoglobulina "6.20" o tetraciclina solamente, las inmunoglobulinas se inyectan en grupos de 10 ratones A/J por vía subcutánea 12 horas antes de la infección (una inyección de 5 mg/kg o 2 mg/kg). El provocador se administra como 10 000 DL₅₀ o 1.10⁸ esporas y se observa a los ratones dos veces al día durante 2 semanas, luego 5 veces a la semana durante 2 semanas adicionales. Los ratones supervivientes se vuelven a examinar para detectar infecciones un mes después, con la misma cantidad de esporas, y se les observa durante un mes más. Para los estudios de un régimen profiláctico que incluye tanto tetraciclina como inmunoglobulina 35PA83 "6.20", se tratan grupos de 10 ratones con tetraciclina como en el régimen que incluye tetraciclina sola pero, además, se inyecta inmunoglobulina 35PA83 "6.20" 12 horas antes del provocador. Para estudios de protección activa, se inyecta a 10 ratones 5 µg de PA por ratón por vía subcutánea, en adyuvante completo de Freund. Un segundo grupo recibe la misma inyección y luego, 1 mes después, se estimula la respuesta inmune de este grupo con la misma dosis de PA en adyuvante incompleto de Freund.

Ejemplo 9: Profilaxis con inmunoglobulina 35PA83 "6.20", tratamiento corto con doxiciclina, o ambos

[0145] El estudio de la profilaxis con doxiciclina, con o sin inmunoglobulina 35PA83 "6.20", se llevó a cabo con grupos de ratones A/J de 10 semanas de edad (Harlan, Gannat, Francia), a los que se les inyectó el antibiótico de forma profiláctica por vía intraperitoneal, en la dosis diaria de 5 mg/kg. La quimioprofilaxis comenzó 12 horas antes de la infección y se realizó durante 7 días, lo que representa una reducción de 9/10 de la duración estándar de 60 días.

[0146] Se eligió una dosis de doxiciclina que es aproximadamente el doble de la dosis estándar para humanos (dosis diaria de 3 mg/kg para un humano adulto), y se ha demostrado que las dosis más pequeñas son 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 utilizaron dosis más grandes (Heine et al., 2007, Antimicrob Chemother Agents, Vol. 51: 1373-1379); sin embargo, se ha observado que una dosis de 50 mg/kg parecía ser mal tolerada en ratones A/J, que presentaron abdomen hinchado y pelo erizado. Para complementar el tratamiento con doxiciclina con la inmunoglobulina 35PA83 "6.20", se inyectó una dosis única de este anticuerpo (1 o 2 mg/kg) de manera o no concomitante con la última dosis de doxiciclina. La infección utilizó 1.10^8 esporas inyectadas intraperitonealmente, lo que representa 10 000 DL₅₀. Los ratones se observaron dos veces al día durante las dos primeras semanas y cinco veces por semana durante las dos semanas adicionales.

Ejemplo 10: Terapia con inmunoglobulina 35PA83 "6.20", tratamiento corto con ciprofloxacina o ambos

[0147] Para los estudios sobre el régimen de tratamiento, los grupos de 10 ratones A/J son provocados con una dosis de 1000 DL₅₀ o 1.10^7 esporas. Después de 12 horas, se inyecta por separado la inmunoglobulina 35PA83 "6.20" (vía subcutánea, 1 inyección de 10 mg/kg) o la ciprofloxacina (vía subcutánea, 50 mg/kg dos veces al día durante 5 días) o la ciprofloxacina y la inmunoglobulina 35PA83 "6.20" se inyectan el primer día, y la ciprofloxacina sola sigue inyectándose durante 4 días adicionales.

Ejemplo 11: Tratamiento con inmunoglobulina 35PA83 "6.20", tratamiento corto con ciprofloxacina o ambos (otro ensayo)

[0148] Para estudios de tratamiento curativo, se infectan grupos de 10 ratones A/J con una dosis de 1000 DL₅₀ o 1.10^7 esporas. Después de 12 horas, se trató a los ratones con ciprofloxacina (subcutáneamente, con una inyección inicial de 25 mg/kg) o con IgG 35PA83 "6.20" (vía subcutánea, 1 inyección de 10 mg/kg) por separado; o la ciprofloxacina y la IgG 35PA83 "6.20" se inyectan simultáneamente en dos sitios diferentes. También se probaron retrasos adicionales de 24 horas y 48 horas antes de iniciar el tratamiento combinado (ciprofloxacina e IgG 35PA83 "6.20"). Después de la primera administración del tratamiento, se inyectó ciprofloxacina solo (25 mg/kg, dos veces al día) durante los siguientes 4,5 días. La dosis de ciprofloxacina se eligió como aproximadamente el doble de la dosis humana estándar (dosis diaria de 20 mg/kg en humanos adultos), ya que esta dosis ya se ha 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 iniciar este estudio. Esta parte del estudio se centra en resolver el problema de la supervivencia a corto plazo después del tratamiento diferido, y la vigilancia se limitó al período de 18 días después de la infección.

Ejemplo 12: Comparación entre los tratamientos profilácticos activos y pasivos contra el ántrax

[0149] Un tratamiento profiláctico pasivo contra el ántrax consiste en el tratamiento con inmunoglobulina 35PA83 "6.20". El tratamiento profiláctico activo contra el ántrax consiste en la inmunización con el antígeno PA. Para comparar la inmunoprotección activa y pasiva, se inmunizó subcutáneamente un grupo de diez ratones con 5 µg de PA83 en adyuvante completo de Freund y se les infectó intraperitonealmente con 10 000 DL₅₀ un mes después. Se inmunizó otro grupo de diez ratones de forma idéntica, pero estos recibieron una vacuna de refuerzo cuatro semanas más tarde con 5 µg de PA83 en adyuvante Freund incompleto y se les infectó un mes después de la segunda inyección. Paralelamente, se evaluó la protección pasiva contra la misma infección con la inmunoglobulina 35PA83 "6.20". Todos los animales infectados fueron observados durante un mes y se compararon los resultados de los dos tipos de profilaxis.

Ejemplo 13: Comparación entre la inmunización pasiva y el tratamiento tardío con IgG 35PA83 "6.20" solo en conejos blancos de Nueva Zelanda (WNZ) infectados con esporas de 9 602

[0150] Para el estudio de inmunización pasiva, se inyecta por vía intravenosa IgG 35PA83 "6.20" a 2,5, 1, 0,5 mg/kg a 3 grupos de 8 conejos WNZ, previamente anestesiados con imalgene 1000 (Merial, Lyon, Francia). Cinco minutos más tarde, los animales se ponen en contacto con 25 µl de una suspensión de esporas de la cepa virulenta *B. anthracis* 9602, depositadas en cada fosa nasal para su inhalación en los pulmones, y correspondientes a 100 DL₅₀. Para el tratamiento tardío, se utilizaron las mismas condiciones experimentales, excepto en que a 2 grupos de 8 animales se les inyectó IgG (2,5 mg/kg) 6 horas después del contacto con 80 DL₅₀ o 200 DL₅₀ de esporas de *B. anthracis* 9602. Para cada grupo, se utilizan 4 animales adicionales en las mismas condiciones experimentales que los controles positivos. Todos los experimentos con la cepa 9602 de *B. anthracis* se realizan en un laboratorio de nivel de seguridad 3, y los animales se observan 21 días después del contacto.

Referencias bibliográficas

[0151]

- 5 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*.
- 10 Andhs-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.
- 15 Andhs-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.
- 20 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. Immunoelectrophoretic 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.
- 25 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).
- 30 Laffly, " Selection of a macaque Fab with framework regions like those in humans, high affinity, and ability to neutralize 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.
- 35 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.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0152]

- 40 <110> LFB et al
- <120> Inmunoglobulina contra la toxina del carbunco
- <130> BFF130656 CEB
- <160> 20
- <170> Versión de PatentIn 3.5
- 45 <210> 1
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> VH

ES 2 749 646 T3

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL

ES 2 749 646 T3

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región constante de la cadena pesada

ES 2 749 646 T3

<400> 3

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

ES 2 749 646 T3

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
 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

ES 2 749 646 T3

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Región constante de la cadena ligera

<400> 4
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> 5
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena pesada sin péptido señal

ES 2 749 646 T3

<400> 5

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

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

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

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

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

ES 2 749 646 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

ES 2 749 646 T3

```

           325                         330                         335

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      450                         455

```

<210> 6

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera sin péptido señal

ES 2 749 646 T3

<400> 6

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

ES 2 749 646 T3

<210> 7
<211> 473
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> cadena pesada con péptido señal

<400> 7
Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Leu Leu Leu Ser Ile Thr Ser Ala
1 5 10 15

Asn Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro
20 25 30

Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser
35 40 45

Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

ES 2 749 646 T3

Glu Trp Ile Gly Leu Ile Tyr Gly Ser Thr Ala Asp Thr Arg Tyr Asn
 65 70 75 80

Pro Ser Leu Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn
 85 90 95

Gln Leu Ser Leu Gln Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Asn Phe Trp Ser Gly Glu Tyr Tyr
 115 120 125

Gly Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Ala Val Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140

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

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 165 170 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 180 185 190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 195 200 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 210 215 220

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 225 230 235 240

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 245 250 255

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315 320

ES 2 749 646 T3

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 340 345 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 370 375 380

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 420 425 430

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 8

<211> 232

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera con péptido señal

ES 2 749 646 T3

<400> 8

Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Leu Leu Leu Ser Ile Thr Ser Ala
1 5 10 15

Asn Ala Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Tyr
20 25 30

Val Gly Asp Lys Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Asn
35 40 45

ES 2 749 646 T3

Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
50 55 60

Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
85 90 95

Gln Ser Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ser Ala
100 105 110

Pro Leu Ala Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg Thr Val
115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 9

<211> 375

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la parte variable de la cadena pesada

ES 2 749 646 T3

	<400> 9		
	caggtgcagc tgcaggaatc tggccctggc ctgctgaagc ccagcgagac actgtctctg	60	
	acctgcgccg tgtccggcga ctctatcagc ggcggctact actggtcttg gatcaggcag	120	
	agccccggca agggcctgga atggatcggc ctgatctacg gcagcaccgc cgacaccaga	180	
	tacaaccca gcctgaaggg cagagtgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccagctg	240	
	tctctgcagc tgagaagcgt gaccgctgcc gacaccgccg tgtactactg tgccagaagc	300	
	ggctacaact tttggagcgg cgagtactac ggcctggact cttggggaca gggcgctgtc	360	
	gtgacagtgt ccagc	375	
5	<210> 10 <211> 321 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la parte variable de la cadena ligera		
	<400> 10		
	gccatccagc tgaccagag ccctagctct ctgagcgcct acgtgggcca caaagtgacc	60	
	atcacctgtc acgccagcca gggcatcaac agctggctgg cctggtatca gcagaagccc	120	
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaag gccagcagcc tgctgagcgg cgtgcccagc	180	
	agattcagcg gctctggctc tggcaccgac tacaccctga ccatcagctc cctgcagagc	240	
	gaggacttcg ccagctacta ctgcctgcag tacgacagcg cccctctggc cttcggcctc	300	
	ggaacaaagc tggacatcaa g	321	
15	<210> 11 <211> 990 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la parte constante de la cadena pesada		

ES 2 749 646 T3

<400> 11
gcctctacca agggcccaag cgtgttccct ctggccccta gcagcaagtc tacctctggc 60
ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactactttc ccgagcccgt gaccgtgtcc 120
tggaaactctg gcgctctgac aagcggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagtctagc 180
ggcctgtaca gcctgagcag cgtcgtgact gtgccctcta gctctctggg caccagacc 240
tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggaaccc 300
aagagctgcg acaagacca cacctgtcct ccctgtcctg cccctgaact gctgggcgga 360
ccttccgtgt tcctgttccc cccaaagcct aaggacacc tgatgatcag caggaccccc 420
gaagtgacct gcgtgggtgt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 480
tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ctagagagga acagtacaac 540
agcacctaca gggtggtgtc tgtgctgaca gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 600
gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggcc ctgccagccc ccatcgaaaa gaccatctcc 660
aaggccaagg gacagcctcg cgagccccag gtgtacacac tgccctccag cagggacgag 720
ctgacaaaga atcaggtgtc cctgacctgt ctcgtgaaag gcttctacct cagcgacatt 780
gccgtggaat gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 840
ctggacagcg acggctcatt cttcctgtac tccaagctga ccgtggacaa gtccaggtgg 900
cagcagggca acgtgttcag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 960
cagaagtccc tgagcctgag ccctggcaag 990

5 <210> 12
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la parte constante de la cadena ligera

<400> 12
aggaccgtgg ccgcaccaag tgtctttatc ttcccacca gcgacgagca gctgaagtcc 60
ggcacagctt ccgtcgtgtg cctgctgaac aacttctacc ctaggaagc caaggtgcag 120
tggaaaggtg acaacgcctt gcagtcggc aactcccagg aaagcgtgac cgagcaggac 180
agcaaggact ccacctacag cctgagcagc accctgacac tgagcaaggc cgactacgag 240
aaacataagg tgtacgcctg cgaagtgacc caccagggcc tgtctagccc cgtgaccaag 300
agcttcaaca ggggcgagtg c 321

15 <210> 13
<211> 1365
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> > Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada

ES 2 749 646 T3

<400> 13
caggtgcagc tgcaggaatc tggccctggc ctgctgaagc ccagcgagac actgtctctg 60
acctgcgccg tgtccggcga ctctatcagc ggcggctact actggtcttg gatcaggcag 120
agccccggca agggcctgga atggatcggc ctgatctacg gcagcaccgc cgacaccaga 180
tacaaccca gcctgaaggg cagagtgacc atcagcaagg acaccagcaa gaaccagctg 240
tctctgcagc tgagaagcgt gaccgctgcc gacaccgccg tgtactactg tgccagaagc 300
ggctacaact tttggagcgg cgagtactac ggcctggact cttggggaca gggcgctgtc 360
gtgacagtgt ccagcgcctc taccaagggc ccaagcgtgt tccctctggc ccctagcagc 420
aagtctacct ctggcggaac agccgccctg ggctgcctcg tgaaggacta ctttcccagag 480
cccgtgaccg tgtcctggaa ctctggcgct ctgacaagcg gcgtgcacac cttccctgcc 540
gtgctgcagt ctagcggcct gtacagcctg agcagcgtcg tgactgtgcc ctctagctct 600
ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac 660
aagaaggtgg aaccaagag ctgcgacaag acccacacct gtcctccctg tcctgccctt 720
gaactgctgg gcggacctc cgtgttcctg ttcccccaa agcctaagga caccctgatg 780
atcagcagga cccccgaagt gacctgcgtg gtggtggatg tgtcccacga ggaccctgaa 840
gtgaagttca attggtacgt ggacggcgtg gaagtgcaca acgccaagac caagcctaga 900
gaggaacagt acaacagcac ctacaggggtg gtgtctgtgc tgacagtgct gcaccaggac 960
tggtgaacg gcaaagagta caagtgcaag gtgtccaaca aggccctgcc agccccatc 1020
gaaaagacca tctccaaggc caagggacag cctcgcgagc cccaggtgta cacactgcct 1080
cccagcaggg acgagctgac aaagaatcag gtgtccctga cctgtctcgt gaaaggcttc 1140
taccacagcg acattgccgt ggaatgggag agcaacggcc agcccagaaa caactacaag 1200
accaccccc ctgtgctgga cagcgacggc tcattcttcc tgtactcaa gctgaccgtg 1260
gacaagtcca ggtggcagca gggcaacgtg ttcagctgct cctgatgca cgaggccctg 1320
cacaaccact acaccagaa gtcctgagc ctgagccctg gcaag 1365

- 5 <210> 14
- <211> 642
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera

ES 2 749 646 T3

```

<400> 14
gccatccagc tgacccagag ccctagctct ctgagcgcct acgtgggcca caaagtgacc      60
atcacctgtc acgccagcca gggcatcaac agctggctgg cctggtatca gcagaagccc      120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaag gccagcagcc tgctgagcgg cgtgcccagc      180
agattcagcg gctctggctc tggcaccgac tacaccctga ccatcagctc cctgcagagc      240
gaggacttcg ccagctacta ctgcctgcag tacgacagcg cccctctggc cttcggccct      300
ggaacaaagc tggacatcaa gaggaccgtg gccgcaccaa gtgtctttat cttcccaccc      360
agcgacgagc agctgaagtc cggcacagct tccgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac      420
cctaggggaag ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcaagtccgg caactcccag      480
gaaagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgaca      540
ctgagcaagg ccgactacga gaaacataag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc      600
ctgtctagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc                          642
  
```

<210> 15

<211> 1419

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada que comprende un péptido señal en el extremo N-terminal

ES 2 749 646 T3

<400> 15
atgcatggt cctgatcct cctgctgctg ctgagcatca ccagcgccaa cgctcaggtg 60
cagctgcagg aatctggccc tggcctgctg aagcccagcg agacactgtc tctgacctgc 120
gccgtgtccg gcgactctat cagcggcggc tactactggt cttggatcag gcagagcccc 180
ggcaagggcc tggaatggat cggcctgatc tacggcagca ccgccgacac cagatacaac 240
cccagcctga agggcagagt gaccatcagc aaggacacca gcaagaacca gctgtctctg 300
cagctgagaa gcgtgaccgc tgccgacacc gccgtgtact actgtgccag aagcggctac 360
aacttttggg gcggcgagta ctacggcctg gactcttggg gacagggcgc tgtcgtgaca 420
gtgtccagcg cctctaccaa gggcccaagc gtgttcctc tggcccctag cagcaagtct 480
acctctggcg gaacagccgc cctgggctgc ctctgtaagg actactttcc cgagcccgtg 540
accgtgtcct ggaactctgg cgctctgaca agcggcgtgc acaccttccc tgccgtgctg 600
cagtctagcg gcctgtacag cctgagcagc gtcgtgactg tgccctctag ctctctgggc 660
accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 720
gtggaacca agagctgcga caagaccac acctgtcctc cctgtcctgc ccctgaactg 780
ctgggcggac cttccgtgtt cctgttcccc ccaaagccta aggacacct gatgatcagc 840
aggacccccg aagtgacctg cgtggtggtg gatgtgtccc acgaggacc tgaagtgaag 900
ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc tagagaggaa 960
cagtacaaca gcacctacag ggtggtgtct gtgctgacag tgctgcacca ggactggctg 1020
aacggcaaag agtacaagtg caaggtgtcc aacaaggccc tgccagcccc catcgaaaag 1080
accatctcca aggccaaggg acagcctcgc gagccccagg tgtacacact gcctcccagc 1140
agggacgagc tgacaaagaa tcaggtgtcc ctgacctgtc tcgtgaaagg cttctacccc 1200
agcgacattg ccgtggaatg ggagagcaac ggccagcccc agaacaacta caagaccacc 1260
ccccctgtgc tggacagcga cggctcattc ttctgtact ccaagctgac cgtggacaag 1320
tccaggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcaagaggc cctgcacaac 1380
cactacacc agaagtccct gagcctgagc cctggcaag 1419

<210> 16
<211> 696
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera que comprende un péptido señal en el extremo N-terminal

ES 2 749 646 T3

<400> 16
atgcatggt cctggatctt cctgctgctg ctgagcatca ccagcgcca cgccgccatc 60
cagctgaccc agagccctag ctctctgagc gcctacgtgg gcgacaaagt gaccatcacc 120
tgtcaogcca gccagggcat caacagctgg ctggcctggg atcagcagaa gcccggcaag 180
gcccccaagc tgctgatcta caaggccagc agcctgctga gcggcgtgcc cagcagattc 240
agcggctctg gctctggcac cgactacacc ctgacatca gctccctgca gagcgaggac 300
ttcgccagct actactgcct gcagtaogac agcggccctc tggccttcgg ccctggaaca 360
aagctggaca tcaagaggac cgtggccgca ccaagtgtct ttatcttccc acccagcgac 420
gagcagctga agtccggcac agcttccgtc gtgtgcctgc tgaacaactt ctaccctagg 480
gaagccaagg tgcagtggaa ggtggacaac gccctgcagt ccggcaactc ccaggaaagc 540
gtgaccgagc aggacagcaa ggactccacc tacagcctga gcagcacct gacactgagc 600
aaggccgact acgagaaaca taaggtgtac gcctgcgaag tgaccacca gggcctgtct 660
agccccgtga ccaagagctt caacaggggc gagtgc 696

<210> 17
<211> 1448
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada según se sintetiza

<400> 17
gctagcgccg ccacatgag atggtcctgg atcttctctg tgctgctgag catcaccagc 60
gccaaogctc aggtgcagct gcaggaatct ggccctggcc tgctgaagcc cagcgagaca 120
ctgtctctga cctgagccgt gtccggcgac tctatcagcg gcggctacta ctggctctgg 180
atcaggcaga gccccggcaa gggcctggaa tggatcggcc tgatctacgg cagcaccgcc 240
gacaccagat acaaccccag cctgaagggc agagtgacca tcagcaagga caccagcaag 300
aaccagctgt ctctgcagct gagaagcgtg accgctgccg acaccgccgt gtactactgt 360
gccagaagcg gctacaactt ttggagcggc gagtactacg gcctggactc ttggggacag 420
ggcgtgtctg tgacagtgtc cagcgcctct accaagggcc caagcgtgtt ccctctggcc 480
cctagcagca agtctacctc tggcggaaaca gccgccctgg gctgcctcgt gaaggactac 540
tttcccagc ccgtgaccgt gtccctggaac tctggcgtc tgacaagcgg cgtgcacacc 600
10 ttccctgccg tgctgcagtc tagcggcctg tacagcctga gcagcgtcgt gactgtgccc 660

ES 2 749 646 T3

tctagctctc tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc 720
aaggtggaca agaaggtgga acccaagagc tgcgacaaga cccacacctg tccctccctgt 780
cctgcccctg aactgctggg cggaccttcc gtgttcctgt tcccccaaaa gcctaaggac 840
accctgatga tcagcaggac ccccgaagtg acctgctggtg tgggtggatgt gtcccacgag 900
gacctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg gacggcgtgg aagtgcacaa cgccaagacc 960
aagcctagag aggaacagta caacagcacc tacaggggtgg tgtctgtgct gacagtgctg 1020
caccaggact ggctgaacgg caaagagtac aagtgcgaag tgtccaacaa ggccctgcca 1080
gccccatcg aaaagaccat ctccaaggcc aagggacagc ctgcgcgagcc ccaggtgtac 1140
aactgcctc ccagcagga cgagctgaca aagaatcagg tgtccctgac ctgtctcgtg 1200
aaaggcttct accccagcga cattgcccgtg gaatgggaga gcaacggcca gcccgagaac 1260
aactacaaga ccaccccccc tgtgctggac agcgacggct cattcttctc gtactccaag 1320
ctgaccgtgg acaagtccag gtggcagcag ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac 1380
gaggccctgc acaaccacta caccagaag tccctgagcc tgagccctgg caagtgatag 1440
ggcgcgcc 1448

<210> 18

<211> 725

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera según se sintetiza

<400> 18

actagtgccg ccacatgcg atggtcctgg atcttcctgc tgctgctgag catcaccagc 60
gccaaogccg ccatccagct gaccagagc cctagctctc tgagcgccta cgtgggagc 120
aaagtgacca tcacctgtca cgccagccag ggcatcaaca gctggctggc ctggtatcag 180
cagaagcccc gcaaggcccc caagctgctg atctacaagg ccagcagcct gctgagcggc 240
gtgccagca gattcagcgg ctctggctct ggaccgact acaccctgac catcagctcc 300
ctgcagagcg aggacttcgc cagctactac tgcctgcagt acgacagcgc ccctctggcc 360
ttcggccctg gaacaaagct ggacatcaag aggaccgtgg ccgcaccaag tgtctttatc 420
ttcccacca gcgacgagca gctgaagtcc ggcacagctt ccgtcgtgtg cctgctgaac 480
aacttctacc ctagggaagc caaggtgcag tggaaggtgg acaacgcctt gcagtccggc 540
aactcccagg aaagcgtgac cgagcaggac agcaaggact ccacctacag cctgagcagc 600
accctgacac tgagcaaggc cgactacgag aacataagg tgtacgcctg cgaagtgacc 660
10 caccagggcc tgtctagccc cgtgaccaag agcttcaaca ggggcgagtg ctagtgaact 720
ctaga 725

ES 2 749 646 T3

<210> 19
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> péptido señal

<400> 19
Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Leu Leu Ser Ile Thr Ser Ala
1 5 10 15

Asn Ala

10 <210> 20
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia que codifica el péptido señal

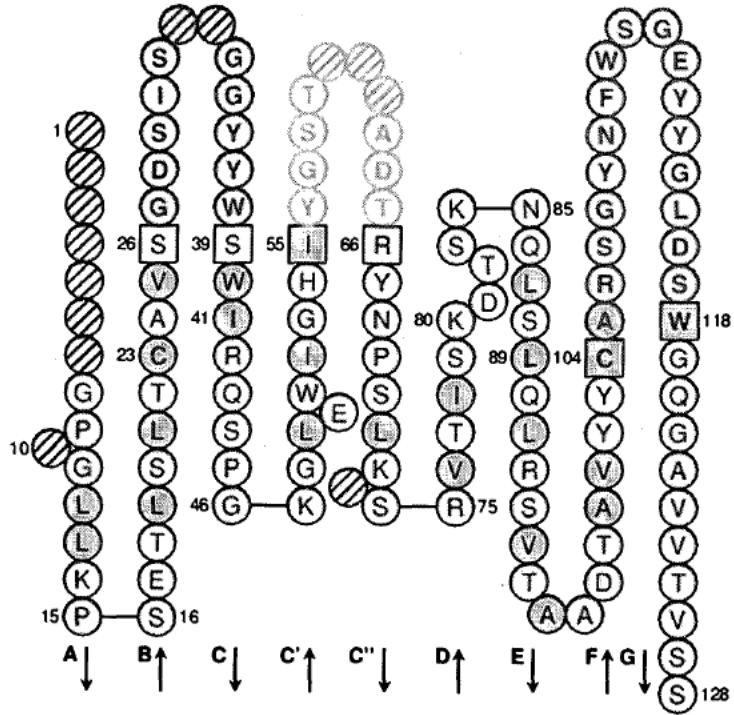
15 <400> 20
atgcatggt cctgatctt cctgctgctg ctgagcatca ccagcgcaa cgc 53

REIVINDICACIONES

1. Inmunoglobulina de clase G dirigida contra el antígeno protector de la toxina del carbunco, en la que:
 - 5 – cada una de las cadenas pesadas comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N°: 5, y
 - cada una de las cadenas ligeras comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N°: 6.
- 10 2. Inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que:
 - la región constante de dicha cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°: 3, y
 - 15 – la región constante de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la secuencia SEQ ID N°: 4.
3. Inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que:
 - cada una de las cadenas pesadas comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N°: 7, y
 - 20 – cada una de las cadenas ligeras comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID N°: 8.
4. Inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que posee, en su sitio de glucosilación Asn297, N-glicanos cuyo índice de fucosilación es inferior al 65%, preferiblemente inferior al 50%, más preferiblemente inferior al 40%.
5. Inmunoglobulina según la reivindicación 4, que presenta un contenido superior al 60 % para las formas G0+G1+G0F+G1F, las formas G0F+G1F siendo inferiores al 50 %.
- 30 6. Inmunoglobulina según la reivindicación 5, que presenta un contenido superior al 60 % para las formas G0+G1+G0F+G1F, el contenido de fucosa siendo inferior al 65 %.
7. Inmunoglobulina según la reivindicación 5, que presenta un contenido inferior al 40% para las formas G1F+G0F.
- 35 8. Polinucleótido que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada y una secuencia que codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina tal y como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Vector que comprende al menos un polinucleótido según la reivindicación 8.
- 40 10. Célula hospedadora que comprende un vector según la reivindicación 9.
11. Composición, preferiblemente farmacéutica, que comprende al menos una inmunoglobulina, preferiblemente humana, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 45 12. Inmunoglobulina, preferiblemente humana, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso como medicamento.
13. Inmunoglobulina, preferiblemente humana, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento o la prevención de patologías asociadas a la toxina del carbunco.
- 50 14. Método para la detección *in vitro* de una toxina del carbunco que comprende el antígeno protector en una muestra biológica, que comprende:
 - 55 – la puesta en contacto de la muestra con al menos una inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y
 - la detección de la unión de dicha inmunoglobulina como indicador de la presencia de dicha toxina del carbunco.
- 60 15. Kit para la detección de una toxina del carbunco que comprende el antígeno protector, donde dicho kit comprende:
 - un recipiente que comprende al menos una inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 marcada, y
 - 65 – un recipiente que comprende medios de detección de dicha inmunoglobulina marcada.

16. Inmunoconjugado que comprende una inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 unida a un agente terapéutico.

A) VH 35PA83



B) VL 35PA83

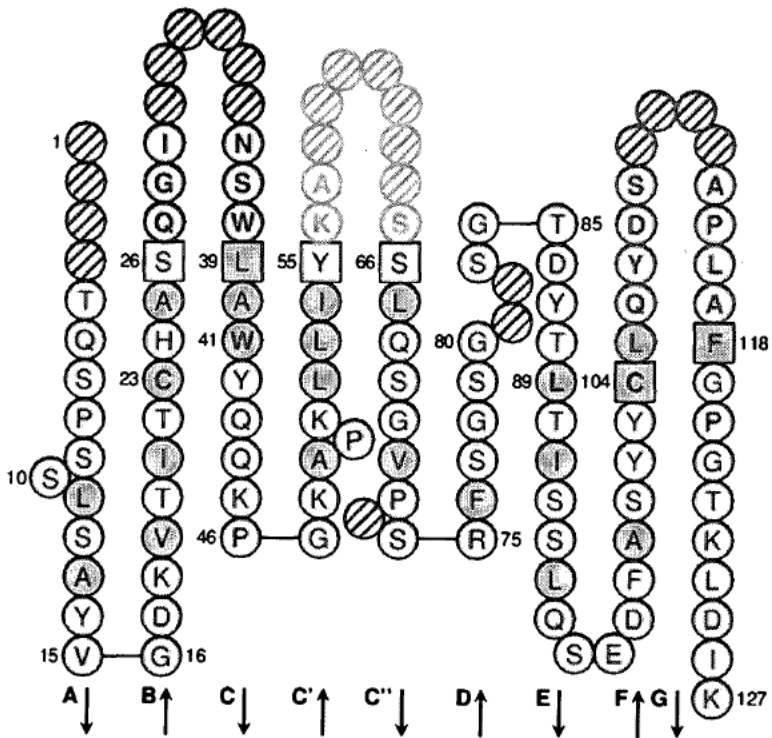
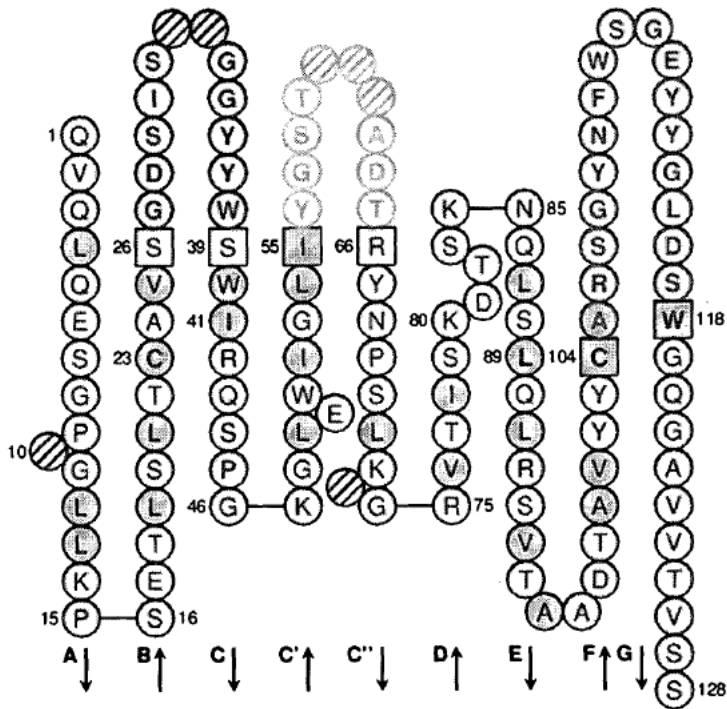


Figura 1

A) VH 6.20



B) VL 6.20

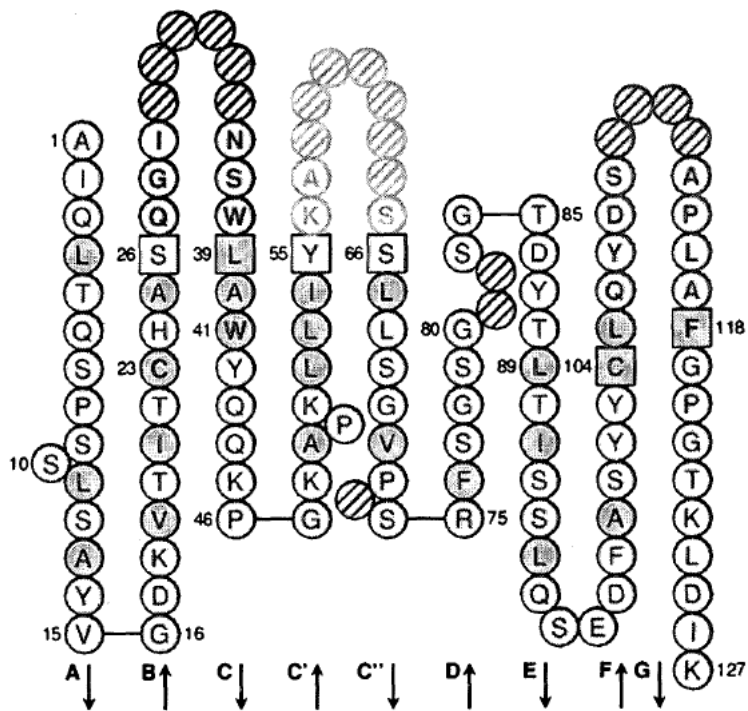


Figura 2

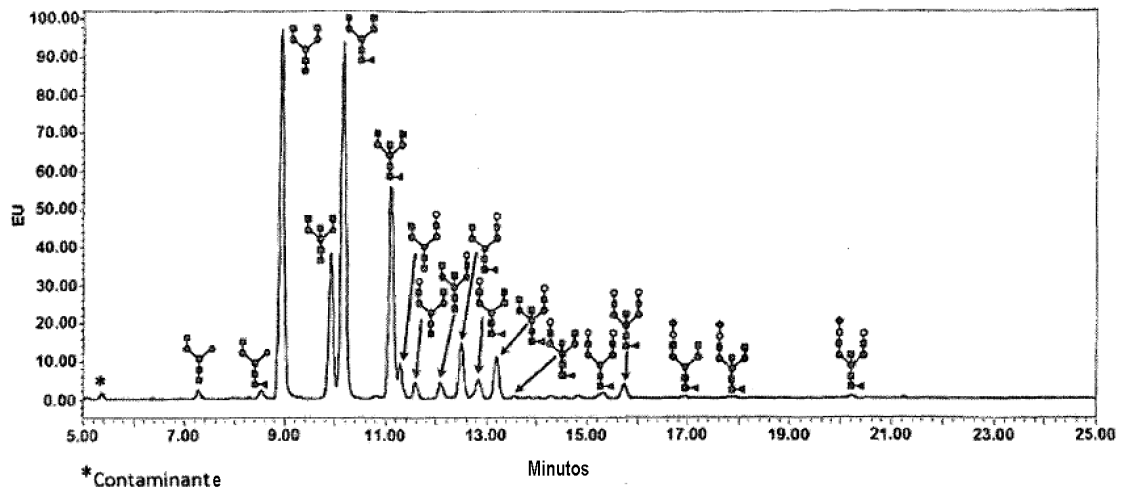


Figura 3