



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 755**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/13** (2006.01)  
**A61K 31/70** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98903075 .4**  
86 Fecha de presentación : **16.01.1998**  
87 Número de publicación de la solicitud: **0966532**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.1999**

54 Título: **Material biológico para el tratamiento de un mamífero por transferencia de genes de anticuerpos y composición farmacéutica que lo contiene.**

30 Prioridad: **20.01.1997 FR 97 00540**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2007**

73 Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)  
3, rue Michel Ange  
75016 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Piechaczyk, Marc y  
Noel, Danièle**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 285 755 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

Material biológico para el tratamiento de un mamífero por transferencia de genes de anticuerpos y composición farmacéutica que lo contiene.

El presente invento se refiere al campo de la terapia génica que consiste en transferir dentro de las células de un sujeto al menos un gen que codifica una proteína terapéutica. Más particularmente, el invento concierne a la transferencia, dentro de las células que no producen anticuerpos de manera natural, de secuencias de un ácido nucleico que codifica todo o parte de un derivado de anticuerpos terapéuticos que conllevan un compuesto proteico que participa en el efecto terapéutico, de modo que las células genéticamente modificadas por estas secuencias de ácidos nucleicos e implantadas en un sujeto produzcan y secreten a la circulación sanguínea de dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de estos anticuerpos.

La terapia génica consiste en corregir la deficiencia de un gen introduciéndolo en las células en las que la deficiencia de dicho gen es causa de una patología, una secuencia de ADN que lleva la información génica permitiendo remediar la deficiencia. Las perspectivas de aplicación de la terapia génica en el campo de las enfermedades genéticas son numerosas y se pueden citar por ejemplo las correcciones de las talasemias, de la drepanocitosis, de los déficit del metabolismo hepático, de la mucoviscidosis, de las miopatías, etc... (W.F.Anderson, 256, 808, 1992; R.C. Mulligan, Science, 260, 926, 1993; D. Miller, Nature, 357, 455, 1992; R. Morgan y W. F. Anderson, Ann. Rev. Biochem., 62, 191, 1993; B. Donet, Biofuturo, Mayo 1992).

Pero la terapia génica permite también luchar contra las enfermedades que no dependen exclusivamente de una deficiencia genética, tales como los cánceres o infecciones virales, introduciendo en las células del órgano o del tejido diana un gen que codifica la proteína o un ARN terapéutico. Tales sustancias terapéuticas son por ejemplo citoquinas, anticuerpos intracelulares, variantes de proteínas virales, ARN antisentido, ribozimas, etc...

Las técnicas que permiten la introducción de información genética en las células están descritas en la bibliografía. Dos aproximaciones principales pueden entretanto ser consideradas.

La primera consiste en introducir la secuencia de ADN que lleva la información genética directamente *in vivo* en las células de los órganos o tejidos diana la terapia o en las células de órganos o de tejidos encargados de producir la sustancia terapéutica, sea en las proximidades del lugar de producción, sea en forma sistémica.

La segunda, que concierne a la terapia celular y llamada *ex vivo*, consiste en extraer las células de un sujeto, en modificar las células *in vitro* introduciendo la secuencia de ADN que lleva la información genética que se le quiere transferir, después en reintroducir las células así modificadas en el organismo del sujeto. Esta estrategia terapéutica está por ejemplo descrita en el documento de patente americana N° 5.399.346.

Las secuencias de ADN que llevan la información génica que se quiere introducir en las células están asociadas funcionalmente con secuencias de ADN que permiten la expresión *in vivo* y pueden presentarse en diversas formas:

- En el caso de una transferencia del gen directa *in vivo* según la primera aproximación considerada a continuación, pueden ser utilizadas bajo la forma:
  - Libre, es decir transferidas bajo la forma de ADN desnudo, como un plásmido o un fragmento de restricción, particularmente mediante inyección *in vivo* en las células, como se describe en la solicitud de patente internacional publicada bajo el número WO 90 11 092;
  - Acomplejada o asociada a otras moléculas que favorezcan su entrada en las células eucariotas como la lipofectina, la transfectasa, la transfectama, la polietilenimina, etc...;
  - Incorporado en un vector viral, el cual será introducido directamente *in vivo* en las células del órgano o del tejido diana mediante infección.
- En el caso de una transferencia del gen según la segunda aproximación considerada anteriormente, es decir *ex vivo*, la secuencia de ADN es integrada *in vitro* en las células que son introducidas en seguida en el organismo del sujeto; puede tratarse por ejemplo de células madre hematopoyéticas, de linfocitos T, de hepatocitos, etc... En este caso, las células genéticamente modificadas *in vitro* por la secuencia de ADN, según las técnicas descritas anteriormente para una introducción directa *in vivo*, pueden haber sido extraídas del sujeto tratado o provenir de otro sujeto humano o animal como el cerdo (E. Cozzi y D.J.G. White, Nature Genetics, 1, 964-966, 1995).

Entre otras, sustancias capaces de interferir con una patología y que se busca que sean producidas en el organismo del paciente para una terapia génica, se pueden citar ciertos antígenos o anticuerpos.

La expresión de las secuencias de ADN codificantes para las proteínas antigénicas destinadas a permitir la producción, por las células genéticamente modificadas por este ADN, de antígenos susceptibles de introducir una inmu-

## ES 2 285 755 T3

nización del individuo. Tal estrategia de vacunación ha sido por ejemplo puesta en práctica en el caso de diversos patógenos como el virus de la gripe (Tang, D., De Vit.;- U Johnston, Nature, 356, 152-154, 1992).

5 La producción *in vitro* de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpos o de derivados de anticuerpos tales como anticuerpos quiméricos, mediante ingeniería genética en las células eucariotas ha sido ya también descrita, por ejemplo en las patentes europeas publicadas con los números 120 694 y 125 023. La inyección en los pacientes de anticuerpos terapéuticos destinado a dirigirse a antígenos implicados en una patología con el fin de neutralizar bien directamente, bien por medio de una cascada de eventos metabólicos o inmunitarios, uno de los agentes causales de la enfermedad. Se puede citar como ejemplos de tales estrategias terapéuticas, el tratamiento o la prevención de los linfomas B (Yefenof, E., Picker, L. I., Scheuermann, R. N., Vitetta, E.S., Street, N.E., Tucker, T., Uhr, J. W., Current Opinion in Immunology, 10 5, 740-744, 1993).

15 La solicitud de patente internacional publicada con el número WO 94 29 466 describe la expresión intracelular de las secuencias de ADN que codifican los anticuerpos. Esta aproximación permite visualizar una terapia génica dirigida *in vivo* a la patología que implica compuestos celulares no accesibles mediante los métodos de vacunación tradicionales o fundada en la producción *in vivo* de antígenos recombinantes. Las secuencias de ADN expresadas por las células modificadas genéticamente según el método descrito en la solicitud de patente internacional WO 94 29 446 están así esencialmente caracterizadas por el hecho que comprenden un gen de anticuerpos modificados de modo que este anticuerpo no sea secretado.

20 El presente invento destinado por el contrario a dar lugar a la expresión *in vivo* de genes de anticuerpos por las células que secretarán dichos anticuerpos a la circulación sanguínea de mamíferos portadores de células genéticamente modificadas mediante el gen del anticuerpo.

25 Este invento se fundamenta en la puesta en evidencia de que diversos tipos celulares, distintos a los que producen anticuerpos de manera natural son capaces, tras la fijación genética, de producir de manera estable *modi in vivo* anticuerpos.

30 En efecto, los plasmocitos, que son células especializadas para la producción de anticuerpos, que constituyen los candidatos para la producción a largo plazo de anticuerpos terapéuticos mediante la transferencia de genes; los plasmocitos tienen una duración de vida reducida, del orden de algunos días, y el hecho que producen otros anticuerpos lleva por naturaleza a asociaciones o recombinaciones entre las cadenas de anticuerpos producidos de manera natural y los anticuerpos expresados mediante la transferencia génica, lo cual es altamente perjudicial al efecto de la investigación terapéutica. Era por tanto importante demostrar qué tipos celulares no especializados para la producción de anticuerpos de manera natural eran susceptible de aceptar una transferencia de genes, de expresar anticuerpos terapéuticos *in vivo* y de secretar niveles sostenidos ventajosamente regulados de anticuerpos a la circulación sanguínea de un mamífero.

40 En consecuencia, el presente invento se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos una célula de mamífero de un tipo celular que no produce anticuerpos de manera natural, de modo que los queratinocitos, los hepatocitos, los fibroblastos de la piel, los miofiblastos, las células endoteliales y las células madre hematopoyéticas, modificadas genéticamente *in vitro* mediante una secuencia de ácidos nucleicos, caracterizada porque dicha secuencia de ácidos nucleicos contiene un gen de anticuerpos de tipo IgG y de elementos que aseguran la expresión *in vivo* de dicho gen de anticuerpos y de la secreción a la circulación sanguínea de un mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de este anticuerpo o de un fragmento del mismo, mediante dichas células modificadas genéticamente.

45 Por secuencias de ácidos nucleicos, se entiende también secuencias de ADN o de ARN o de secuencias que contiene nucleótidos modificados.

50 Las secuencias de ácidos nucleicos que entran en la composición del invento comprenden:

- 55 - al menos un gen de anticuerpo terapéutico, es decir un gen que codifica un anticuerpo nativo no modificado y por tanto natural, o un fragmento de anticuerpo, tal como los fragmentos Fab o F(ab)'<sub>2</sub> o los fragmentos ScFv, o aún un derivado de anticuerpo como un anticuerpo quimérico o un anticuerpo o fragmento de anticuerpos fusionados a una sustancia efectora por ejemplo una toxina o una hormona;
- 60 - al menos un elemento que asegura la expresión de un gen precedente; se trata de secuencias promotoras de la transcripción situadas aguas arriba del gen del anticuerpos y que controlan la expresión en las células que no producen anticuerpos de manera natural.

65 Además del gen del anticuerpos y su promotor, la secuencia de ácidos nucleicos puede comprender una secuencia de terminación de la transcripción, situada aguas abajo del gen del anticuerpo y que permite la secreción de un producto del gen de anticuerpo a la circulación sanguínea de mamífero en el que las células han sido genéticamente modificadas por la secuencia de ácidos nucleicos.

El promotor utilizado puede ser cualquier promotor que permita la expresión eficaz del gen que controla en el tipo celular modificado genéticamente mediante la secuencia de ácidos nucleicos. Puede ser también un promotor viral, un promotor ubicuo o específico de tejido o incluso un promotor sintético.

## ES 2 285 755 T3

La composición del invento está constituida por células que no producen anticuerpos de manera natural, y se presentan bajo una forma que permite su incorporación en el organismo de un mamífero de modo y eventualmente su cultivo previo, dichas células están modificadas genéticamente por al menos una secuencia de ácidos nucleicos que contiene un gen de anticuerpos del tipo IgG y elementos que aseguran la expresión *in vivo* de dicho gen de anticuerpos y la secreción a la circulación sanguínea de un mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de este anticuerpo o de un fragmento de este.

Este modo de realización puede ser puesto en práctica según dos variantes:

- 10 - Bien, las células no productoras de anticuerpos de manera natural que entran en la composición del invento provienen de un mamífero a tratar. En esta variante, las células son preparadas mediante las técnicas dedicadas a la biología celular y molecular, como por ejemplo, a partir de biopsias extraídas de pacientes a tratar, después estas células son modificadas genéticamente mediante la secuencia de ácidos nucleicos que llevan el gen de anticuerpos, bien mediante transfección, bien mediante infección por un vector conforme a los descritos anteriormente en el caso de una transferencia de genes directa *in vivo*. Las composiciones farmacéuticas fabricadas a partir de este material biológico son administradas de vuelta al paciente del que las células han sido extraídas.
- 15 - Bien, las células no productoras de anticuerpos de manera natural que entran en la composición del invento provienen de otro animal humano o animal que el que va a ser tratado. Estas células han sido preparadas como en la variante anterior. En el caso de células de origen humano, estas provienen de donantes compatibles; en el caso de células de origen no humano, se utilizan células de animales modificados genéticamente, como el cerdo, que son compatibles para un transplante de órgano.

25 Las células precedentes se presentan bajo una forma que permite su implantación por cualquier medio conocido en el organismo del mamífero receptor. Estas pueden además presentarse bajo una forma que permita su cultivo previo al transplante. Se puede tratar de cualquier soporte o medio de cultivo compatible con su administración y su incorporación al receptor, como por ejemplo una matriz del tipo descrito en la solicitud de patente europea publicada bajo el número 378 576 que se refiere a fibroblastos.

30 Se eligen células que no producen anticuerpos de manera natural pero que poseen:

- la capacidad de poder secretar proteínas a la circulación sanguínea de un mamífero;
- 35 - una larga duración de vida en el organismo del mamífero, ventajosamente de al menos varios meses a varios años hasta la vida entera del paciente.

40 De un modo más particular, estas células son elegidas por su capacidad para aceptar fácilmente de ser extraídas, modificadas genéticamente *ex vivo* e implantadas en un mamífero.

Entre los tipos celulares que presenta las características precedentes, el invento contempla más específicamente los queratinocitos, los hepatocitos, los fibroblastos de la piel, los mioblastos, las células endoteliales y las células madres hematopoyéticas.

45 Se ha demostrado de manera sorprendente (Fenjves, E.S., Smith, J., Zaradic, S., y Teichman, L.B., Human Gene Therapy, 5, 1241-1248, 1994) que los queratinocitos pueden producir de modo relativamente eficaz proteínas hacia el organismo y no sólo hacia el exterior. Además, su cultivo es fácil y rutinario tras varios años en los servicios hospitalarios para los trasplantes de piel.

50 La manipulación de los hepatocitos es más difícil que la de los queratinocitos. Sin embargo, se ha demostrado (Grossman, M., Raper, S.E., Kozarsky, K., Stein, E.A., Engelhart, J. F., Müller, D., Lupien, P.J., Wilson, J. M., Nature Genetics, 6, 335-341, 1994; Ferry, N. Duplessis, O., Houssin, D., Danos, O., Heard J-M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8377-8381, 1991) que los hepatocitos pueden ser infectados por retrovirus recombinantes a la vez *ex vivo* e *in vivo*.

55 El cultivo y la transducción retroviral de los fibroblastos de la piel son fáciles (Moullier, P., Maréchal, V., Danos, O., Heard, J-M., Transplantation, 56, 427-432, 1993). La manipulación de los organoides es fácil (Moullier y otros, Nature Genetics, 4, junio 1993, 154-159). Los fibroblastos presentan la ventaja de ser fácilmente extraíbles en un sujeto mediante una simple operación quirúrgica. Además, los protocolos de terapia génica están en preparación para la corrección de déficits lisosomales en los niños.

60 Los mioblastos que son células musculares no diferenciadas, pueden también ser purificadas, y serán aparentemente utilizadas sin modificación genética en el marco del tratamiento de ciertas enfermedades degenerativas (Yaho, S-N., Smith, K. J., y Karachi, K., Gene Therapy, 1, 99-107, 1994).

65 La modificación genética de las células endoteliales ya ha sido realizada para producir proteínas terapéuticas, por ejemplo en la solicitud de patente internacional PCT publicada con el número WO 90 06997. Las células endoteliales, que constituyen la pared de los vasos sanguíneos, están por tanto particularmente adaptadas a la puesta en práctica

## ES 2 285 755 T3

del material biológico del invento, cuyo fin es el de secretar, por parte de las células genéticamente modificadas, los anticuerpos a la circulación sanguínea de un mamífero.

5 Otros tipos celulares pueden ser contemplados, tales como las células madre hematopoyéticas, en cuanto que cumplan las características definidas más arriba.

La composición del invento encuentra su aplicación en la preparación de composiciones farmacéuticas destinadas a tratar o a prevenir las recaídas del cáncer, y las infecciones o expansiones virales más particularmente el SIDA.

10 El cáncer afecta a alrededor de una de cada cuatro personas en las poblaciones occidentales y los tratamientos disponibles hoy no son realmente satisfactorios más que para uno de cada dos pacientes.

15 Las enfermedades virales graves afectan de manera cada vez más importante a las poblaciones humanas, se entiende sobre todo de un modo más particular a los virus VIH, para el que no se dispone en este momento de ningún tratamiento eficaz para prevenir o tratar la infección.

El material biológico del invento es remarcable en cuanto a que permite contemplar una nueva aproximación terapéutica a estas graves enfermedades.

20 En efecto, en el caso de los cánceres, permiten al organismo de disponer a largo plazo de anticuerpos específicos de células tumorales bien citotóxicos, o bien que inducen la quiescencia celular. Este fin se logra utilizando secuencias de ácidos nucleicos que llevan un gen que codifica anticuerpos dirigidos contra un antígeno específica de células tumorales. En el caso de las infecciones virales, el material biológico del invento permite al organismo mantener a largo plazo un nivel basal de anticuerpos bien neutralizantes para el virus, bien citotóxicos para las células infectadas. Este fin se logra utilizando secuencias de ADN que codifican anticuerpos dirigidos contra un antígeno específico del virus responsable de dicha infección o contra un antígeno específico de células infectadas por dicho virus.

30 La composición del invento puede contener además vehículos o adyuvantes clásicamente utilizados. Las dosis de células que entran en estas composiciones farmacéuticas están adaptadas al modo de administración utilizada, a la patología a la que va dirigida, a la secuencia de ácidos nucleicos puesta en marcha y a su forma de presentación, para permitir la producción y la secreción de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo en la circulación sanguínea del sujeto tratado.

35 Las células constituyen un material biológico particularmente adaptado para la preparación de las composiciones farmacéuticas destinadas a una terapia celular *ex vivo* de un individuo.

40 Las células humanas precedentes, en cuando a que no provienen de un paciente en el que son implantadas, o las células animales, previo a su trasplante, son tratadas por todos los medio físicos o genéticos, conocidos por el profesional de la técnica, para estar protegidas del sistema inmunitario del paciente que las recibe.

El invento tiene aún por objeto la utilización de la composición farmacéutica precedente, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los cánceres o de las infecciones virales.

45 Además de las características que preceden, el invento conlleva otras características que aparecerán durante el transcurso de la descripción que sigue y que se refiere a ejemplos experimentales de realización y de puesta en práctica del presente invento, siendo entendido que los ejemplos no constituirán ninguna limitación al alcance de las reivindicaciones.

50 Los trabajos expuestos a continuación han permitido demostrar que:

55 - *in vitro* las células extraídas del paciente, modificables genéticamente *ex vivo* y reimplantables, que no producen anticuerpos de manera natural, son capaces de secretar anticuerpos recombinantes que conservan las propiedades de anticuerpos de origen,

- al menos un tipo celular precedente es capaz de secretar *in vivo* anticuerpos recombinantes que conservan las propiedades de anticuerpos originales.

60 - el material biológico del invento no induce en el organismo modificado ninguna respuesta inmunitaria para neutralizar los anticuerpos recombinantes.

### I- Definición de anticuerpos recombinantes

65 El anticuerpo recombinante modelo utilizado para los experimentos de transferencia génica de anticuerpos expuesta a continuación es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-tiroglobulina humana (Tg10) (Piechaczyk y otros, Hybridoma, vol. 4, 4, (1985), 361-367). Su clonaje molecular y la caracterización funcional de los ADN complementarios de su cadena pesada y de su cadena ligera han sido efectuados como se indica a continuación.

## ES 2 285 755 T3

La tiroglobulina es una glicoproteína iodada de alto peso molecular implicada en la síntesis, el almacenado y la secreción de las hormonas tiroideas T3, y T4 (Marriq, C., C., Arnaud, M. Rolland, y S. Lissitzky. 1980, Eur. J. Biochem. 111:3347). Un anticuerpo monoclonal de ratón, designado aquí a continuación como Tg10, dirigido contra una región antigénica (región II) frecuentemente reconocida por autoanticuerpos naturales del paciente generan la enfermedad de Grave, la tiroiditis de Hashimoto y los carcinomas de la tiroides, se ha establecido por los miembros del laboratorio CNRS UMR 9921 de la facultad de farmacia de Montpellier, Avenida Charles Flahaut, 34060, Montpellier Cedex 01, Francia (Piechczyk y otras, Hybridoma, vol 4, 4 (1985), 361-367). Los ADN complementarios de cadenas ligera (kappa) y pesada (IgGI) del anticuerpos Tg10 han sido clonadas en el vector pSPORT1 (Gibco/BRL) mediante las técnicas destinadas a la ingeniería genética (Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA). Las secuencias nucleotídicas de las partes variables de las cadenas pesada y ligeras que especifican cada una de las cadenas de anticuerpos han sido determinadas y están representadas respectivamente en las figuras 1 y 2 en el anexo. El clonaje y la secuencia de cADN de los anticuerpos Tg10 han sido efectuados en el laboratorio anteriormente mencionado.

Para su caracterización funcional, los cADN de la cadena ligera y de la cadena pesada de anticuerpos Tg10 han sido clonados en el vector retroviral pLXPXSN (Morgan, R.A., L. Couture, O. Elroy-Stein, J. Ragheb, B. Moss, y W.F. Anderson. 1992. Nucl. Acids. Res 20: 1293-1299) bien a un lado o al otro de las secuencias IRES de poliovirus endógeno a este vector para formar los vectores PM130, o bien individualmente aguas arriba de la secuencia IRES para formar los vectores PM117 y PM124, como se representa en la figura 3 del anexo). Las células de mono COS-7 (ATCC CRL 1651) han sido enseguida trasfectadas por la técnica del fosfato calcido bien por el PM130 sólo, o bien mediante la combinación PM117+PM124. La presencia en el sobrenadante del cultivo de anticuerpos reactivos contra la tiroglobulina humana ha sido ensayada mediante la técnica ELISA (Piechczyk y otros, Hybridoma, vol. 4,4 (1985), 361-367). Además, las constantes cinéticas de asociación y de disociación de anticuerpos recombinantes Tg10 producido por las células COS-7 con la tiroglobulina han sido determinadas a parte de los sobrenadantes de cultivo mediante resonancia plasmónica de superficie (Fagerstam, L.G., y R. Karlsson. 1993. Biosensor techniques. In Immunochemistry. V. Oss y M. VanRegenmortel, eds. M Dekker Inc. P949-970) que sigue a la técnica Biacore desarrollada por la sociedad Pharmaci Biosensor.

Los valores de estas constantes son expuestos en la tabla 1 a continuación.

TABLA 1

Anticuerpos	Constante cinética de asociación $k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	Constante cinética de disociación $k_{off} (s^{-1})$	Constante de afinidad $k_a$
Anticuerpo Tg10 natural	$4,6 \pm 0,1 \times 10^5$	$5,3 \pm 0,2 \times 10^{-5}$	$8,6 \pm 0,4 \times 10^9$
Anticuerpo Tg10 recombinante (PM117+PM124)	$1,4 \pm 0,3 \times 10^5$	$4,3 \pm 1,0 \times 10^{-5}$	$3,2 \pm 1,4 \times 10^9$
Anticuerpo Tg10 recombinante (PM130)	$2,1 \pm 1,5 \times 10^5$	$6,0 \pm 0,4 \times 10^{-5}$	$3,5 \pm 2,7 \times 10^9$

## ES 2 285 755 T3

Cadena pesada del anticuerpo Tg10 recombinante (PM117+PM124)	$1,0 \pm 0,3 \times 10^5$	$3,0 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$3,3 \pm 1,2 \times 10^8$
---	---------------------------	------------------------------	---------------------------

De modo sorprendente, la tabla 1 muestra que la cadena pesada sintetizada sola a partir de PM124 es secretada por las células COS-7 y reconoce la tiroglobulina humana con una afinidad disminuida sólo 10 veces con respecto al anticuerpo completo.

### II- Líneas productoras de retrovirus

La mayor parte de las células primarias son extremadamente sensibles a los métodos de transfección clásicos. Además, la duración de vida, y por tanto la expresión, del ADN transfectado es en general muy corta en la mayoría de las células transfectadas.

Para permitir una infección eficaz de los tipos celulares variados y una expresión a largo plazo del anticuerpo Tg10 en las células genéticamente modificadas, una línea celular productora de retrovirus recombinantes que lleva y expresa los cADN de anticuerpos Tg10 ha sido establecida.

Las células de empaquetamiento retroviral anfotróficas PA 317 (Miller, D. y Buttimore, 1986, Molec. Cell Biol. 6, 2895-2902) han sido transfectadas mediante la técnica del precipitado con fosfato cálcico para el vector retroviral PM130. Varios clones productores estables han sido establecidos. La línea PA 130.10 ha sido utilizada para los experimentos de infección posteriores. Su concentración viral, dosis sobre la línea indicadora NIH 3T3 (Miller, D. y Buttimore, 1986, Molec. Cell Biol. 6, 2895-2902) ha sido de  $10^4$  cfu/ml.

### III- Experimentos *in vitro*

Los retrovirus producidos por la línea PA130.10 han sido utilizados para infectar diferentes líneas celulares establecidas representativas de diferentes tipos celulares disponibles de la colección americana de cultivos tipo (ATCC):

- línea NIH3T3 de fibroblastos murinos;
- línea A431 de queratinocitos humanos;
- línea HepG2 de hepatocitos humanos;
- línea C2C12 de mioblastos.

Diferentes clones celulares han sido derivados para cada tipo de transducción retroviral y el anticuerpos Tg10 producido en el sobrenadante de cultivo ha sido cuantificado mediante ELISA. Los resultados obtenidos están expuestos en la tabla 2 a continuación.

TABLA 2

Líneas	Anticuerpos Tg10
Líneas NIH3T3	88 +/- 65 ng/ $10^5$ células/24h
Líneas A431	35 +/- 6 ng/ $10^5$ células/24h
Líneas HepG2	3,5 +/- 1,5 ng/ $10^5$ células/24h
Líneas C2C12	2 +/- 0,6 ng/ $10^5$ células/24h

Además, en el caso de los mioblastos CDC12 diferenciados *in vitro* en miotubos la producción está conservada.

## ES 2 285 755 T3

Las propiedades termodinámicas y cinéticas de anticuerpos producidos mediante estos diferentes tipos celulares determinados mediante resonancia plasmónica de superficie según la tecnología BIAcore (Pharmacia Biosensor) han revelado ser idénticas a las de los anticuerpos Tg10 de partida.

5 Los vectores retrovirales han sido utilizados en una segunda vez para infectar fibroblastos primarios de piel de ratón (infección retroviral y de hepatocitos humanos(transfección)). Las producciones de anticuerpos han sido respectivamente de:

- 10 a 20 ng/10<sup>5</sup> células/ 3 días, y de

10

- 1 a 10 ng/10<sup>5</sup> células/ 4 días.

Igualmente, las características de los anticuerpos producido han sido las mismos que las de los anticuerpos de partida.

15

### IV- Experimentos *in vivo*

Células C2C12 modificadas genéticamente y que han conservado la capacidad de diferenciar a miotubos han sido implantadas mediante inyección en las extremidades anteriores de 4 ratones singénicos C3H a razón de 10<sup>7</sup> células por extremidad.

20

En 3 de los 4 ratones, la producción de anticuerpos recombinantes que han conservado las propiedades termodinámicas y la característica de reconocimiento del antígeno del anticuerpo de partida ha sido supervisada durante dos meses. La cantidad de anticuerpos producidos ha subido regularmente desde nivel basal hasta una producción de alrededor de 100 ng/ml de suero.

25

### V- Ausencia de respuesta inmunitaria neutralizante hacia los anticuerpos recombinantes

Uno de los objetivos esenciales del invento es el de producir de manera sistémica anticuerpos recombinantes, ventajosamente terapéuticos por parte de células genéticamente modificadas de mamífero.

30

Un riesgo posible de esta aproximación es la inducción de una respuesta inmunitaria por parte del organismo modificado que pudiera entrañar la neutralización del anticuerpo recombinante.

35

Esta objeción ha sido descartada mediante los resultados experimentales presentados a continuación.

2 x 10<sup>7</sup> células miogénicas primarias que expresan de modo estable el anticuerpos monoclonal Tg10 tras la transducción retroviral son implantadas a nivel de las *tibialis anterior* de ratón C3H. El suero de los ratones ha sido extraído a intervalos de una semana durante varios meses. La cantidad de anticuerpo Tg10 secretado es cuantificada mediante el método ELISA. En paralelo, la cantidad de anticuerpos antiidiotipo es determinada mediante ELISA.

40

En una serie de 5 ratones, la secreción de anticuerpos Tg10 está situada entre 100 y 300 ng/ml de suero durante 4 meses. Ninguna respuesta antiidiotipo ha podido ser detectada en estas condiciones.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición farmacéutica, que comprende al menos una célula de mamífero de un tipo celular que no produce anticuerpos de manera natural, tal como los queratinocitos, los hepatocitos, los fibroblastos de la piel, los mioblastos, las células endoteliales y las células madre hematopoyéticas, genéticamente modificadas *in vitro* mediante una secuencia de ácidos nucleicos, **caracterizada** porque dicha secuencia de ácidos nucleicos contiene un gen de anticuerpos de tipo IgG y elementos que aseguran la expresión *in vivo* de dicho gen de anticuerpos y la secreción a la circulación sanguínea de un mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de este anticuerpo o de un fragmento de éste, por dichas células genéticamente modificadas.

10 2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, **caracterizada** porque las células que no producen anticuerpos de manera natural provienen bien del mamífero a tratar, o bien de otro mamífero que el que va a ser tratado, que ha recibido un tratamiento para hacerlos compatibles.

15 3. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada** porque las células que no producen anticuerpos de manera natural son elegidas entre las células que poseen:

- 20 - la capacidad de poder secretar proteínas a la circulación sanguínea de un mamífero;
- un vida de larga duración en el organismo de un mamífero, de al menos varios meses a varios años hasta la vida entera del paciente.

25 4. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada** porque el gen de anticuerpo es un gen que codifica un anticuerpos nativo, un fragmento o un derivado de este anticuerpo tal como un anticuerpo quimérico.

30 5. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, **caracterizada** porque dicho anticuerpo, fragmento o derivado de anticuerpo está dirigido contra un antígeno específico de células tumorales.

35 6. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 7. La utilización de una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los cánceres o infecciones virales.

45

50

55

60

65

Fig. 1a

```

ATG GGT TGG CTG TGG AAC TTG CTA TTC CTG ATG GCA GCT GCC CAA AGT GCC CAA GGA CAG
M  G  W  L  W  N  L  L  F  L  M  A  A  A  Q  S  A  Q  G  Q
-20          -10          -1  1
ATC CAC TTG GTA CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC
I  H  L  V  Q  S  G  P  E  L  K  K  P  G  E  T  V  K  I  S
          10          20
TGC AAG GCT TCT GGG TAT ACC TTC ACA TCG TAT GGC TTG ACC TGG GTG ATA CAG TCT CCA
C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  G  L  T  W  V  I  Q  S  P
          30          40
GGA AAG GAT TTA AAA TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC TTC TCT GGA GTG CCA ACA TAT GCT
G  K  D  L  L  K  W  M  G  W  I  N  T  F  S  G  V  P  T  Y  A
          52  52A          60

```

Fig. 1b

GAT GAC TTC AAG GGA CGC TTT GCC TTC TCT TTG GAC ACC TCT ACC AGC ACT GCC TAT TTG  
 D D F K G R F A F S L D T S T S T A Y L  
 70 80

CAG ATC GAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC TGT TCA AGA AGG GGG GGT  
 Q I D N L K N E D T A T Y F C S R R G G  
 82 82A 82B 82C 90 94

TTT ATT ACT ACG GCT CTT GAC ACC TGG GGC CAA GGC ACC TCT CTC ACA GTC TCC TCA GCC  
 F I T T A L D T W G Q G T S L T V S S A  
 100 110 113

Fig.2a

```

ATG AAG TTG CCT GGT AGG CTG TTG GTG CTG ATG TTC TGG ATT CCT GCT TCC AAT AGT AAT
M  K  L  P  G  R  L  L  V  L  M  F  W  I  P  A  S  N  S  N
-19  -1  I
      -10
GTT GTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC TCC CTG TCT GTC AGT CTT GGA GAT CAA GCC TCC ATC
V  V  M  T  Q  T  P  L  S  L  S  V  S  L  G  D  Q  A  S  I
      10  20
TCT TGC AGA TCT AGT CAG AGC ATT GTA CAT AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA GAA TGG TAC
S  C  R  S  S  Q  S  I  V  H  S  N  G  N  T  Y  L  E  W  Y
27 27A 27B 27C 27D 27E
CTG CAG AAA CCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAT AAA GTT TCC AAC CGA TTG TCT
L  Q  K  P  G  Q  S  P  K  L  L  I  Y  K  V  S  N  R  L  S
      40  50

```

Fig.2b

GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAC TTC ACA CTC AAA ATC AGC  
 G V P D R F S G S G T D F T L K I S  
 60 70

AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA CTT TAT TAC TGT TTT CAA GGT TCA CAT ATT CCA TTC  
 R V E A E D L L G L Y C F Q G S H I P F  
 80 90

ACG TTC GGT TCG GGG ACA AAG TTC GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC  
 T F G S G T K L E I K R A D A A P T V S  
 100 110

Fig.3

