



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 270 598**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

A61K 39/108 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12P 21/04 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99924395 .9**

86 Fecha de presentación : **19.05.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1079856**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2001**

54 Título: **Anticuerpos humanizados que reconocen la Verotoxina II y línea celular que produce los mismos.**

30 Prioridad: **20.05.1998 US 86570 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es: **TEIJIN LIMITED**
6-7, Minamihommachi 1-chome
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, JP
PDL BioPharma, Inc.

72 Inventor/es: **Matsumoto, Yoh-Ichi;**
Imaizumi, Atsuchi;
Kimura, Tsuyoshi;
Takedo, Tae;
Co, Man, Sung y
Vasques, Maximiliano

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 270 598 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

Anticuerpos humanizados que reconocen la Verotoxina II y línea celular que produce los mismos.

5 **Referencia cruzada de la solicitud relacionada**

La presente solicitud reivindica prioridad del documento USNN 60/086570 presentado en 20 de mayo de 1998.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere de manera general a la combinación del ADN recombinante y de las tecnologías de anticuerpos monoclonales, para desarrollar nuevos productos biológicos y, más particularmente, por ejemplo, a la producción de inmunoglobulinas no inmunogénicas (en humanos) específicas para el antígeno Verotoxina II (VT2) y las variantes antigénicas de la Verotoxina II (VT2V) y su utilización *in vitro* e *in vivo*. La presente invención se refiere
15 asimismo más específicamente a los anticuerpos monoclonales humanizados contra VT2 que pueden neutralizar VT2 y VT2V, las secuencias polinucleótidas que codifican los anticuerpos, un procedimiento para producir los anticuerpos, composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo como un principio activo, agentes terapéuticos para tratar la infección de *E. coli* que produce Verotoxina (VTEC) y el Síndrome Urémico Hemolítico (HUS) que comprenden el anticuerpo como un principio activo, y procedimientos para tratar dichas enfermedades.

20 **Antecedentes de la invención**

La Verotoxina, (VT), conocida asimismo como toxina de tipo Shiga (SLT), se conoce porque causa diarrea sanguinolenta y el desarrollo del síndrome urémico hemolítico en la infección de *E. coli* que produce la Verotoxina (VTEC).
25 Uno de los agentes etiológicos de la infección VTEC es la *E. coli* 0157 virulenta. VT puede ser producida asimismo por bacterias distintas de las que causan la infección VTEC, que pueden también dar lugar a un síndrome tóxico en el hombre. En niños y en personas mayores con respuestas inmunes reducidas, la VT que se produce por las bacterias que se desarrollan en el intestino, puede alcanzar la corriente sanguínea alterando las células epiteliales intestinales. Esto puede inducir el Síndrome Urémico Hemolítico (HUS) que se caracteriza por disfunción renal y ocasionalmente daño cerebral (véase por ejemplo, Kamali, M. *et al.*, *The Lancet*, 1, 619-620 (1983); Siegler, R., *The Journal of Pediatrics*, 125, 511-518 (1994)). Hasta la actualidad, no existe medicamento efectivo para estos síndromes tóxicos,
30 Los antibióticos no han demostrado eficacia para prevenir la progresión de los síndromes tóxicos (véase, por ejemplo, Carter, A. *et al.*, *The New England Journal of Medicine*, 316, 1496-1500 (1987); Griffen, P. *et al.*, *Annals of Internal Medicine*, 109, 705-712 (1988)). Esto podría ser debido a la liberación de VT a partir de las bacterias eliminadas por los antibióticos y a la infectividad de los antibióticos contra VT.

Existen dos tipos de Verotoxina, (o toxina de tipo Shiga), la Verotoxina I (VT1 o SLT-1) y la Verotoxina II (VT2 o SLT-2). (Véase O'Brien *et al.*, *Curr.Top. Microbiol. Immunol.*, 180, 65-94 (1992)). La *E. coli* que produce VT2 se ha aislado de pacientes que padecían la infección VTEC. (Véase, Russmann *et al.*, *J. Med.Microbiol.* 40 (5), 338-343 (1994)). Ostroff *et al.*, *J.Infect. Dis.* 160, 994-998 (1989) y Kleanthous *et al.*, *Arch. Dis. Child.* 65, 722-727 (1990) informaron de que las cepas 0517 de *E. coli* que contenían VT2 pero no VT1 se asociaban más frecuentemente con HUS. Existen variantes adicionales VT2 (VT2V) que se han aislado asimismo clínicamente. (Véase, por ejemplo, *Microb. Pathog.*, 8, 47-60 (1990); FEBS Lett, 79, 27-30 (1991); *Microb. Pathog.*, 5, 419-426 (1988); y *J. Bacteriol.*, 170, 4223-4230 (1988)). Armstrong *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 171 (4), 1042-1045 (1995), han probado un absorbente de VT en ensayos clínicos, pero sin embargo, este medicamento actúa sólo en el intestino y no está disponible para absorber el VT que ha alcanzado la corriente sanguínea. Una preparación de γ -globulina mostró una actividad neutralizadora muy baja para VT2, en comparación con la de VT1 (Ashkenazi, S. *et al.*, *The Journal of Pediatrics*, 113, 1008-1014 (1988); Morooka, T. *et al.*, *Acta Paediatrica Japonica*, 38, 299-295 (1996)). Se ha informado de un anticuerpo monoclonal de ratón que neutraliza a VT2. Sin embargo, se informó de que este anticuerpo mostraba una afinidad de unión relativamente baja para el VT2V (Schmitt, C. *et al.*, *Infection and Immunity*, 59, 1065-1073 (1991)).

Además, la utilización de anticuerpos monoclonales murinos tales como los descritos anteriormente, tiene ciertos inconvenientes en el tratamiento humano, particularmente en regímenes terapéuticos repetidos, tal como se explica a continuación. Los anticuerpos monoclonales del ratón, por ejemplo, tienden a tener una corta vida media en el
55 hombre, y cuando se utilizan en éste, carecen de otras importantes características funcionales de las inmunoglobulinas.

Además, los anticuerpos monoclonales murinos contienen secuencias sustanciales de aminoácidos que serán inmunogénicas cuando se inyecten a un paciente humano. Numerosos estudios han mostrado que, después de la inyección de un anticuerpo extraño, la respuesta inmune que se ha provocado por un paciente contra el anticuerpo inyectado puede ser muy fuerte, eliminando esencialmente la utilidad terapéutica del anticuerpo después de un tratamiento inicial. Además, si los anticuerpos monoclonales antigénicos de ratón u otros (para el hombre) se utilizan para tratar varias enfermedades humanas, los tratamientos subsiguientes con anticuerpos no relacionados con el ratón pueden ser inefectivos o incluso peligrosos en ellos mismos, debido a la reactividad cruzada.

65 Aunque la producción de los así denominados "anticuerpos quiméricos" (por ejemplo, regiones variables del ratón unidas a regiones constantes humanas) ha mostrado algún éxito, permite un problema significativo de inmunogenidad. En general, la producción de inmunoglobulinas humanas que reaccionan con el antígeno VT2 con una alta

ES 2 270 598 T3

afinidad, como con muchos antígenos, sería extremadamente dificultosa utilizando las técnicas típicas de producción de anticuerpos monoclonales humanos.

5 Así, son necesarias formas mejoradas de inmunoglobulinas humanizadas específicas para el antígeno VT2 que sean sustancialmente no inmunogénicas en el hombre, que sean producidas todavía fácil y económicamente de forma apropiada para la formulación terapéutica y otros usos. La presente invención cumple con este y otros requisitos.

Sumario de la invención

10 La invención proporciona anticuerpos humanizados que se unen específicamente al VT2 y/o a las variantes de éste. Alguno de dichos anticuerpos se unen específicamente a la subunidad B de VT2 y/o a la subunidad B de la variante de VT2. Alguno de estos anticuerpos neutralizan VT2 y/o la variante de VT2. Anticuerpos preferidos neutralizaron VT2 y/o las variantes de VT2, de modo que se proporcionan, por lo menos, una protección del 50%, 75%, 95% o 100% contra ratones u otros mamíferos sometidos a la estimulación con 10 LD₅₀ de VT2 o de la variante de VT2.

15 Algunos anticuerpos humanizados constituyen una forma humanizada del anticuerpo VTm1-1 del ratón, que se caracteriza por una región variable de cadena ligera que se muestra en la Fig. 1B y una región de cadena pesada que se muestra en la Fig. 1A.

20 La invención proporciona además anticuerpos humanizados que compiten con anticuerpos VTm1-1 del ratón para la unión específica a VT2 y/o a la variante de VT2.

25 Algunos de los anticuerpos humanizados, tal como se ha descrito anteriormente, comprenden regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo VTm1-1 del ratón, y estructuras de la región variable de cadenas ligeras y pesadas de las estructuras de cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo GF4, siempre y cuando una posición seleccionada, por lo menos, de entre el grupo constituido por L49, H29, H30, H49 y H98, esté ocupada por el aminoácido que se encuentra en la posición equivalente de la estructura de la región variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo VTm1-1 del ratón.

30 Dichos anticuerpos humanizados se unen específicamente a la verotoxina II y con una constante de afinidad de entre 10^{-1} M⁻¹ y tres, cinco o diez veces la afinidad del anticuerpo VTm1-1 del ratón.

35 En algunos anticuerpos humanizados que se han descrito en el párrafo anterior, cada posición seleccionada de entre el grupo constituido por L49, H29, H30, H49 y H98, está ocupada por el aminoácido presente en la posición equivalente de la estructura de la región variable de la cadena ligera o pesada del anticuerpo VTm1-1 del ratón.

40 En alguno de los anticuerpos humanizados mencionados anteriormente, una posición, por lo menos, seleccionada de entre el grupo constituido por L3, L4, L19, L76, L79, L85, H1, H4, H5, H79, H89 y H93 es ocupada por un aminoácido presente en la posición equivalente de una secuencia consenso de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo humano. En algunos anticuerpos humanizados cada posición seleccionada del grupo L3, L4, L19, L76, L79, L85, H1, H4, H5, H79, H89 y H93 es ocupada por un aminoácido presente en la posición equivalente de una secuencia consenso de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo humano.

45 Algunos anticuerpos humanizados comprenden una región variable de cadena pesada que se muestra en la Fig. 2A y una región variable de cadena ligera que se muestra en la Fig. 2B, siempre y cuando una o más posiciones seleccionadas de entre el grupo constituido por L49, H29, H30, H49, H98, L3, L4, L19, L76, L79, L85, H1, H4, H5, H79, H89, y H93 pueden sustituirse tal como se muestra en las Tablas 2 y 3.

50 Algunos anticuerpos humanizados comprenden una región variable de cadena pesada que se muestra en la Fig. 2A y una región variable de cadena ligera que se muestra en la Fig. 2B.

55 Algunos anticuerpos humanizados comprenden una cadena pesada humanizada que posee por lo menos una identidad secuencial del 85% con la cadena pesada humanizada que se muestra en la Fig. 2A, y una cadena ligera humanizada que posee por lo menos una identidad secuencial del 85% con la cadena ligera humanizada que se muestra en la Fig. 2B, siempre y cuando por lo menos una posición seleccionada de entre el grupo constituido por L49, H29, H30, H49 y H98, esté ocupada por el aminoácido presente en la posición equivalente de la estructura de la región variable de la cadena ligera o pesada del anticuerpo VTm1-1 del ratón.

60 Algunos de los anticuerpos humanizados tal como se han descrito anteriormente comprenden dos pares de dímeros de cadenas ligeras/pesadas, en los que cada cadena comprende una región variable y una región constante.

Algunos de los anticuerpos humanizados tal como se describen anteriormente son un fragmento Fab o uno F(ab')₂.

65 Opcionalmente, los anticuerpos humanizados, tal como se describen anteriormente, se proporcionan en forma purificada.

Algunos anticuerpos humanizados, tal como se describen anteriormente, tienen un isotipo inmunoglobulínico IgG₁.

ES 2 270 598 T3

La invención proporciona además procedimientos para producir anticuerpos VTm1-1 humanizados. Dichos procedimientos comprenden cultivar una línea celular que codifica cadenas ligeras y pesadas de cualquiera de los anticuerpos que se describieron anteriormente, por los que se expresa el anticuerpo humanizado; y recuperar el anticuerpo humanizado expresado por la línea celular. Algunos de dichos procedimientos comprenden además la mezcla del anticuerpo con un portador farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica.

La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición preferida de este tipo comprende un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada que se muestra en la Fig. 2A y una región variable de cadena ligera que se muestra en la Fig. 2B. La invención proporciona además la utilización de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que padezca o corra el riesgo de sufrir los efectos tóxicos de una verotoxina.

Los procedimientos que tratan a un paciente que padece o corre el riesgo de sufrir los efectos tóxicos de una verotoxina, comprenden la administración al paciente de una dosis efectiva de un anticuerpo humano o humanizado que se une específicamente a la verotoxina II y/o a una variante de la verotoxina II. En alguno de dichos procedimientos, el anticuerpo compete con el anticuerpo VTm1-1 del ratón para la unión específica a la verotoxina II o a la variante de la verotoxina II. En alguno de dichos procedimientos, el anticuerpo humanizado se une específicamente a VT2 y/o a una variante de VT2. En alguno de dichos procedimientos, el anticuerpo humanizado se une específicamente a la subunidad B de VT2 y/o de la variante de VT2. El alguno de dichos procedimientos, el anticuerpo humanizado se une específicamente a VT2 y/o a la variante de VT2 y neutraliza VT2 y/o la variante de VT2. En alguno de dichos procedimientos, el anticuerpo humanizado se une específicamente a la subunidad B de VT2 y/o a la subunidad B de la variante VT2 y neutraliza VT2 y/o la variante de VT2. En alguno de dichos procedimientos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, que es una forma humanizada del anticuerpo Vtm1-1 del ratón. En alguno de dichos procedimientos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada que se muestra en la Fig. 2A y una región variable de cadena ligera que se muestra en la Fig. 2B. En alguno de dichos procedimientos, el paciente es infectado con *E. coli* que produce verotoxina y el anticuerpo se administra terapéuticamente. En alguno de dichos procedimientos, el paciente corre el riesgo de infección por la *E. coli* que produce verotoxina y el anticuerpo se administra profilácticamente. Alguno de dichos procedimientos comprenden además el control del paciente para la recuperación de los efectos tóxicos de la Verotoxina II o de la variante de la verotoxina II.

En otro aspecto, la invención proporciona una línea celular que produce cualquiera de los anticuerpos anteriormente descritos.

La presente invención proporciona nuevas composiciones útiles, por ejemplo, para el tratamiento de la infección de *E. coli* que produce Verotoxina (VTEC) y el Síndrome Urémico Hemolítico (HUS), las cuales composiciones contienen inmunoglobulinas humanizadas capaces de unirse específicamente a la subunidad B del antígeno VT2 y de neutralizar VT2 y sus variantes. Las inmunoglobulinas pueden tener dos pares de complejos de cadenas ligera/pesada, comprendiendo una cadena, por lo menos, una o más regiones determinantes complementarias del ratón unidas funcionalmente a segmentos de la región de la estructura humana. Por ejemplo, regiones determinantes complementarias del ratón, con o sin residuos aminoácidos adicionales asociados naturalmente, pueden introducirse en regiones de la estructura humana, para producir inmunoglobulinas humanizadas capaces de unirse al antígeno con niveles de afinidad más fuertes que $10^7 M^{-1}$. Estas inmunoglobulinas humanizadas serán capaces asimismo de bloquear la unión a VT2 del anticuerpo monoclonal del ratón donador de CDR.

Las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención pueden ser producidas fácilmente mediante diversas técnicas del ADN recombinante con una expresión final en células transfectadas, preferentemente células eucarióticas inmortales, tales como células de mieloma o hibridoma. Los polinucleótidos que comprenden una primera secuencia que codifica regiones de la estructura de inmunoglobulinas humanizadas y un conjunto de una segunda secuencia que codifica las deseadas regiones determinantes complementarias de la inmunoglobulina, pueden producirse sintéticamente o mediante la combinación de segmentos apropiados de ADN genómicos y cADN.

Las inmunoglobulinas humanizadas pueden ser utilizadas en forma sustancialmente pura para tratar resultados potencialmente tóxicos procedentes de VT2 o de VT2V, tales como los producidos durante la infección de *E. coli* que produce Verotoxina y el Síndrome Urémico Hemolítico (HUS). Las inmunoglobulinas humanizadas o sus complejos pueden prepararse en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptada, que variará, dependiendo del modo de administración.

60 Breve descripción de las figuras

Figura 1. El cADN y las secuencias aminoácidas traducidas de las regiones variables de la cadena pesada (A) (SEC ID n°: 1 y 2) y de la cadena ligera (B) (SEC ID n°: 3 y 4) del anticuerpo VTm1.1 del conejo (MuVTm1.1) Las regiones determinantes complementarias (CDR) están subrayadas y los primeros aminoácidos de las cadenas maduras están doblemente subrayados.

Figura 2. El cADN y las secuencias aminoácidas traducidas de las regiones variables de la cadena pesada (A) (SEC ID n°: 5 y 6) y de la cadena ligera (B) (SEC ID n°: 7 y 8) del anticuerpo humanizado VTm1.1 (HuVTm1.1) Las

ES 2 270 598 T3

regiones determinantes complementarias (CDR) están subrayadas y los primeros aminoácidos de las cadenas maduras están doblemente subrayados.

Figura 3. Esquema para la síntesis del cADN de la región variable del anticuerpo humanizado.

Figura 4. Unión competitiva de los anticuerpos MuVTm1.1 y HuVTm1.1 a la verotoxina II (VT2) de *E. coli*. Concentraciones crecientes del anticuerpo competitivo se incubaron con VT2 revestido en presencia del trazador biotinilado MuVTm1.1 La absorbancia se midió y graficó respecto a la concentración de los anticuerpos competidores no marcados.

Figura 5. Actividad neutralizante *in vitro* de HuVTm1.1 respecto de MuVTm1.1

Figura 6. Identificación del antígeno reconocido (subunidad B de VT2) de HuVTm1.1.

Figura 7. Actividad neutralizante de MuVTm1.1 contra VT2 la variante de VT2.

Definiciones

La frase “sustancialmente idéntico” en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos (por ejemplo, ADN que codifican una inmunoglobulina humanizada o la secuencia aminoácida de la inmunoglobulina humanizada) se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que presentan por lo menos el 80%, más preferentemente el 85, 90-95% o una identidad de los residuos nucleótidos o aminoácidos más alta, cuando se comparan y alinean para una máxima correspondencia, cuando se ha medido u utilizando el siguiente procedimiento de comparación secuencial y/o mediante inspección visual. Dichas secuencias “sustancialmente idénticas” se consideran típicamente como homólogas. Preferentemente, la “identidad secuencial” se da en una región de la secuencia que tiene por lo menos 50 residuos de longitud, más preferentemente en una región de, por lo menos, 100 residuos aproximadamente, y más preferentemente las secuencias son sustancialmente idénticas en, por lo menos, 150 residuos aproximadamente, o sobre la longitud completa de las dos secuencias que van a compararse. Tal como se describe a continuación, cualesquiera secuencias de dos anticuerpos pueden sólo alinearse de una forma, utilizando el sistema numeral de kabat. Por tanto, para los anticuerpos, la identidad porcentual tiene un significado único y bien definido.

Las secuencias aminoácidas de las regiones variables de las cadenas maduras pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas se denominan Hx y Lx respectivamente, en los que x es un número que designa la posición de un aminoácido según el esquema de Kabat. Secuencias de Proteínas de interés inmunológico (National Institutes of Health, Bethesda MD, 1987 y 1991). Kabat lista muchas secuencias aminoácidas para anticuerpos para cada subgrupo, y lista el aminoácido más habitual que se encuentra para cada posición del residuo en ese subgrupo, para generar una secuencia de consenso. Kabat utiliza un procedimiento para asignar un número de residuo a cada aminoácido en una secuencia listada, y este procedimiento para asignar números a residuos se ha convertido en estándar en el campo. El esquema de Kabat puede ampliarse a otros anticuerpos que no están incluidos en su conjunto, alineando el anticuerpo en cuestión con una de las secuencias de consenso en Kabat, haciendo referencia a los aminoácidos conservados. Por ejemplo, un aminoácido en la posición L50 de un anticuerpo humano ocupa la posición equivalente de un aminoácido en posición L50 de un anticuerpo de ratón.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la capacidad de intercambio de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas-hidroxílicas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Grupos preferidos de sustitución de aminoácidos conservadores son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina.

Análogos de secuencias ejemplificativas de anticuerpos pueden rastrearse para la retención de la actividad de unión, utilizando procedimientos de exposición fágica tal como describen, por ejemplo, Cesareni, *FEBS Lett* 307:66-70 (1992); Swimmer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:3756-60 (1992); Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:3576-80 (1992); Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-8 (1991); Scott & Smith, *Science* 249:386-90 (1990); Garrad *et al.*, *BioTechniques* 9:1373-1377 (1991), que se incorporan a la presente memoria en su totalidad como referencia.

El término “sustancialmente puro” significa que una especie objeto es la especie predominante presente (*es decir*, en una base molar, es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferentemente una fracción purificada sustancialmente es una composición en la que la especie objeto comprende por lo menos un 50% aproximadamente (en una base molar) de todas las especies macromoleculares que estén presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 80 a 90% de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. Más preferentemente, la especie objeto se purifica hasta obtener una homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante los procedimientos convencionales de detección).

La competición entre los anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que la inmunoglobulina bajo ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un determinante antigénico. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo el radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), el inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA), el ensayo sandwich competitivo (véase Stahl *et al.*, *Methods in Enzymology*: 242-253 (1983)); EIA biotina-avidina directo en fase sólida (véase Kirkland *et al.*, *J.Immunol.* 137:3614-3619 (1986)); ensayo marcado directo en fase sólida, ensayo sandwich marcado directo en fase sólida (véase Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press (1988); RIA marcado directo en fase sólida utilizando marcado con I-125 (véase Morel *et al.*, *Molec. Immunol.* 25 (1):7-15 (1988); EIA biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546-552 (1-990); y RIA marcado directo (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J.Immunol.* 32:77-82 (1990)). Habitualmente, la inmunoglobulina del ensayo está presente en exceso. Los anticuerpos identificados mediante el ensayo competitivo (anticuerpos de competición) incluyen los que se unen a un mismo epítipo como el anticuerpo de referencia y los que se unen a un epítipo adyacente que está suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de referencia, para que se produzca la obstaculización estérica. Habitualmente, cuando un anticuerpo competitivo está presente en exceso, inhibirá en un 50 ó 75% por lo menos la unión específica de un anticuerpo de referencia a una diana antigénica designada.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan inmunoglobulinas humanizadas que reaccionan específicamente con la subunidad B de VT2. Estas inmunoglobulinas, que presentan afinidades de unión con la subunidad b de VT2, por lo menos entre 10^6 M^{-1} a 10^{10} M^{-1} , y preferentemente entre 10^6 M^{-1} a 10^{10} M^{-1} o más intensamente, son capaces de, por ejemplo, neutralizar la toxicidad de VT2 y VT2V (los antígenos VT2). Las inmunoglobulinas humanizadas tendrán una estructura humana y una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una inmunoglobulina, típicamente de una inmunoglobulina de ratón, que reacciona específicamente con los antígenos VT2. En una forma de realización preferida, una o más de las CDR provendrán del anticuerpo MuVTm1.1. De este modo, las inmunoglobulinas de la presente invención, que pueden producirse económicamente en grandes cantidades, encuentran su utilización, por ejemplo, en el tratamiento de los resultados tóxicos de la infección por *E. coli* que produce Verotoxina (VTEC) y del Síndrome Urémico Hemolítico (HUS), en pacientes humanos, mediante diversas técnicas.

Se sabe que la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kD) y una "ligera" (de aproximadamente 25kD). La parte aminoterminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento antigénico. La parte carboxiterminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones constantes y variables se unen mediante una región "J" y aproximadamente 12 o más aminoácidos, con la cadena pesada incluyendo asimismo una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. (Véase, de modo general, *Fundamental Immunology*, Paul, W., Ed., capítulo 7, págs 131-166, Raven Press, N.Y. (1984)).

Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Todas las cadenas muestran la misma estructura general de regiones estructurales relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, denominadas asimismo Regiones de Determinación de Complementariedad o CDR (Véase "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1987); y Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196, 901-917 (1987)).

Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones estructurales, permitiendo la unión a un epítipo específico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína formada por uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por los genes inmunoglobulínicos. Los genes reconocidos de la inmunoglobulina incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu, así como los genes miríadas de la región variable de la inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden existir en distintas formas además de los anticuerpos: que incluyen, por ejemplo, Fv, Fab, y $F(ab')_2$, así como los anticuerpos híbridos bifuncionales (por ejemplo, Lanzavecchia *et al.*, *Eur.J.Immunol.* 17, 105 (1987)) y en las cadenas únicas (por ejemplo Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5879-5883 (1988) y Bird *et al.*, *Science* 242, 423-426 (1988)). (Véase, de modo general, Hood *et al.*, *Immunology*, Benjamín, N.Y., 2ª edición, (1989), Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) y Hunkapiller y Hood, *Nature*, 323, 15-16 (1986)).

Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyas cadenas pesadas y ligeras se han construido, típicamente mediante ingeniería genética, a partir de segmentos de genes de inmunoglobulinas que pertenecen a distintas especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos (C), tal como γ_1 y γ_3 . Un anticuerpo típico quimérico terapéutico es por tanto una proteína híbrida que está formado por el V o el dominio de unión antigénica de un anticuerpo de ratón y el C o el dominio efector de un anticuerpo humano, aunque pueden utilizarse otras especies de mamíferos.

ES 2 270 598 T3

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “región estructural” se refiere a las partes de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras inmunoglobulínicas que están relativamente bien conservadas (*es decir*, distintas a las CDR) entre distintas inmunoglobulinas en una única especie, tal como se define por Kabat, *et al.*, (en el trabajo citado). Tal como se utiliza en la presente memoria, un “región estructural humana” es una región estructural que es sustancialmente idéntica (de aproximadamente 85% o más) a la región estructural de un anticuerpo humano que se encuentre naturalmente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “inmunoglobulina humanizada” se refiere a una inmunoglobulina que comprende una estructura humana, por lo menos una CDR de un anticuerpo no humano, y en la cual cualquier región constante presente sea sustancialmente idéntica a una región constante inmunoglobulínica humana, es decir, idéntica, por lo menos, en aproximadamente 85-90%, preferentemente por lo menos en 95%. Por consiguiente, la totalidad de las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de una o más secuencias inmunoglobulínicas humanas nativas. Por ejemplo, una inmunoglobulina humanizada no comprendería un anticuerpo quimérico de una región constante humana/una región variable murina.

Los anticuerpos humanizados tienen por lo menos tres ventajas potenciales respecto al ratón y en algunos casos, a los anticuerpos quiméricos para su utilización en la terapia humana.

A causa de que la parte efectora es humana, puede interactuar mejor con otras partes del sistema inmune humano (por ejemplo, destruye las células diana más eficientemente mediante la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)).

El sistema inmune humano no reconocerá la estructura o región C del anticuerpo humanizado como extraña, y por tanto la respuesta del anticuerpo contra dicho anticuerpo inyectado será menor que contra un anticuerpo de ratón totalmente extraño o un anticuerpo quimérico parcialmente extraño.

Se ha informado de que los anticuerpos inyectados de ratón tienen una semivida biológica en la circulación humana mucho más corta que la semivida biológica de los anticuerpos normales (Shaw, D. *et al.*, *J. Immunol*, 138, 4534-4538 (1987)). Los anticuerpos humanizados inyectados tendrán presumiblemente una semivida biológica esencialmente idéntica a los anticuerpos humanos que se encuentran de modo natural, permitiendo la administración de dosis más pequeñas y menos frecuentes.

En un aspecto, la presente invención se refiere a inmunoglobulinas humanizadas que son codificadas por polinucleótidos recombinantes que codifican los CDR de cadena ligera y/o pesada de una inmunoglobulina capaz de unirse a la subunidad B de VT2, tal como el anticuerpo monoclonal MuVTm1.1, y las regiones apropiadas de estructura humana. Como la región de estructura humana, una secuencia de aminoácidos de una región estructural o variable de una inmunoglobulina no humana que proporciona CDR, se compara con las secuencias correspondientes en una colección de secuencias de inmunoglobulinas humanas, seleccionándose una secuencia que posee una alta homología. Polinucleótidos ejemplificativos, que cuando se expresan codifican las cadenas polipeptídicas que comprenden las CDR de cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo monoclonal MuVTm1.1, se incluyen en la Fig. 1. Debido a la degeneración del codón y a las sustituciones aminoácidas no críticas, otras secuencias polinucleótidas pueden sustituir fácilmente a aquellas secuencias, tal como se detalla a continuación. El diseño de las inmunoglobulinas humanizadas puede llevarse a cabo de la forma siguiente. Cuando un aminoácido cae bajo la siguiente categoría, el aminoácido estructural de una inmunoglobulina humana que va a utilizarse (inmunoglobulina aceptora) es reemplazado por un aminoácido secuencial de una inmunoglobulina no humana que suministra CDR (inmunoglobulina donadora):

el aminoácido en la región de estructura humana de la inmunoglobulina aceptora no es habitual para la inmunoglobulina humana en esa posición, mientras que el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donadora es típico para la inmunoglobulina humana en esa posición;

la posición del aminoácido es inmediatamente adyacente a uno de los CDR; o

el aminoácido está en el interior de aproximadamente 3A de una CDR en un modelo de inmunoglobulina de estructura terciaria (*véase*, Queen *et al.*, en el trabajo citado y Co *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2869 (1991), respectivamente, incorporándose los dos a la presente memoria como referencia).

Cuando cada uno de los aminoácidos en la región estructural humana de la inmunoglobulina aceptora y un aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donadora no es habitual para la inmunoglobulina humana en esa posición, dicho aminoácido es reemplazado por un aminoácido típico para la inmunoglobulina humana en esa posición.

Para una descripción detallada de la producción de inmunoglobulinas humanizadas *véase* Queen *et al.*, en el trabajo citado y Co *et al.*, en el trabajo citado.

Los polinucleótidos comprenderán además típicamente una secuencia polinucleótida del control de la expresión, unida funcionalmente a las secuencias codificantes de la inmunoglobulina humanizada, que comprenden regiones promotoras heterólogas o naturalmente asociadas. Preferentemente, las secuencias del control de la expresión serán sistemas promotores eucarióticos en vectores capaces de transformar o transfectar células huéspedes eucarióticas, pero

las secuencias de control para los huéspedes procarióticos pueden utilizarse asimismo. Una vez que el vector se ha incorporado al huésped apropiado, el huésped se conserva bajo condiciones apropiadas para una expresión de alto nivel de las secuencias nucleótidas, y, tal como se desea, puede seguir la recuperación y purificación de las cadenas ligeras, cadenas pesadas, dímeros de cadenas ligeras/pesadas o anticuerpos intactos, fragmentos de unión u otras formas inmunoglobulínicas.

Las secuencias de ácido nucleico capaces de expresar finalmente los deseados anticuerpos humanizados, pueden formarse a partir de diversos polinucleótidos distintos (genómicos, o de cADN, ARN, oligonucleótidos sintéticos, etc) y componentes (por ejemplo, las regiones V, J, D y C), así como por diversas técnicas. La conjunción de secuencias genómicas y sintéticas apropiadas constituye el procedimiento más habitual de producción, pero las secuencias de cADN pueden asimismo utilizarse (véase, la publicación de la patente europea nº 0239400 y Riechmann, L *et al.*, *Nature*, 332, 323-327 (1988), incorporándose ambos documentos a la presente memoria como referencia).

Las secuencias del ADN de la región constante humana pueden aislarse, según procedimientos bien conocidos, a partir de diversas células humanas, pero preferentemente de células B inmortales (véase, Kabat, en el trabajo citado, y WP 87/02671). Los CDR para producir las inmunoglobulinas de la presente invención se derivarán de modo similar de los anticuerpos monoclonales capaces de unirse a los antígenos VT2 y producirse en cualquier fuente conveniente de mamíferos, que incluye ratones, ratas, conejos o otros vertebrados capaces de producir anticuerpos mediante procedimientos bien conocidos. Células origen apropiadas para las secuencias polinucleótidas y células huéspedes para la expresión inmunoglobulínica y la secreción, pueden obtenerse de diversas fuentes, tales como la American Type Culture Collection (*Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*), 5ª edición (1985), Rockville, Maryland, USA, que se incorpora como referencia a la presente memoria).

Además de las inmunoglobulinas humanizadas que se describen específicamente en la presente memoria, otras inmunoglobulinas modificadas “sustancialmente homólogas) pueden diseñarse fácilmente y prepararse utilizando varias técnicas del ADN recombinante bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las regiones estructurales pueden variar desde las secuencias originales del nivel de estructura primaria mediante diversas sustituciones de aminoácidos, adiciones y deleciones intermedias y terminales, y similares. Además, distintas regiones estructurales humanas pueden utilizarse de modo único o en combinación como base para las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención. En general, pueden llevarse a cabo fácilmente modificaciones de los genes mediante diversas técnicas bien conocidas, tales como la mutagénesis sitio-dirigida (véase, Gillman y Smith, *Gene* 8, 81-97 (1979) y Roberts S *et al.*, *Nature* 328, 731-734 (1987)).

Alternativamente, pueden producirse fragmentos polipeptídicos que comprenden sólo una parte de la estructura primaria del anticuerpo, presentando dichos fragmentos una o más actividades inmunoglobulínicas (por ejemplo, actividad de fijación del complemento). Estos fragmentos polipeptídicos pueden producirse mediante fragmentación proteolítica de los anticuerpos intactos mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, o insertando codones de detención en las localizaciones deseadas en los vectores que utilizan mutagénesis sitio-dirigida, tal como después de CH1 para producir fragmentos Fab o después de la región bisagra, para producir fragmentos F(ab')₂. Los anticuerpos de cadena única pueden producirse uniendo VL y VH con un enlace de ADN (véase Huston *et al.*, en el trabajo citado y Bird *et al.*, en el trabajo citado). Asimismo, debido a que como muchos genes, los genes relacionados con la inmunoglobulina contienen regiones funcionales separadas, cada una con una o más actividades biológicas distintas, los genes pueden fusionarse a regiones funcionales de otros genes para producir proteínas de fusión que tienen nuevas propiedades.

Como se ha establecido previamente, los polinucleótidos se expresarán en huéspedes después de que las secuencias se hayan unido funcionalmente a (es decir, se hayan posicionado para asegurar el funcionamiento de) una secuencia de control de la expresión. Estos vectores de expresión son típicamente capaces de replicarse en los organismos huéspedes, bien como episomas o como parte integrante del ADN cromosómico del huésped.

Habitualmente, los vectores de expresión contendrán un marcador de selección por ejemplo, tetraciclina o neomicina, para permitir la detección de las células transformadas con las secuencias deseadas del ADN (véase, por ejemplo, la patente US nº 4.704.362, que se incorpora a la presente memoria como referencia).

E. coli constituye un huésped procariótico particularmente útil para la clonación de los polinucleótidos que codifican los anticuerpos humanizados de la presente invención. Otros huéspedes microbianos apropiados para su utilización incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacteriáceas tales como *Salmonella*, *Serratia*, y varias especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procarióticos, se pueden también conformar vectores de expresión, que contendrán típicamente secuencias de control de la expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo un origen de replicación). Además, estará presente cualquier número de diversos promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de la lactosa, un sistema promotor del triptófano (*trp*), un sistema promotor de la beta-lactamasa, o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores controlarán típicamente la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de unión al sitio ribosómico y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción.

Otros microbios, tales como las levaduras, pueden utilizarse asimismo para la expresión. *Saccharomyces* es un huésped preferido, con vectores apropiados que tienen secuencias de control de la expresión, tales como promotores, incluyendo la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, y un origen de replicación, secuencias de finalización y similares, tal como se desea.

Además de los microorganismos, los cultivos de células de tejidos de mamíferos pueden también utilizarse para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (véase *Winnacker, From Genes a Clones*, Editores VCH, N.Y., N.Y. (1987)).

5 Las células eucarióticas son actualmente preferidas, a causa de que diversas líneas celulares huéspedes apropiadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas se han desarrollado en la técnica, e incluyen las progenies celulares CHO, varias líneas celulares COS, células HeLa, líneas celulares preferentemente de mieloma, etc, o células B transformadas de hibridomas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, y un potenciador (Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89, 46-68
10 (1986)), y sitios necesarios de información del procesamiento, tales como sitios de unión ribosómica, sitios de corte y empalme del ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias de finalización transcripcional. Las secuencias preferidas de control de la expresión son promotores derivados de genes de inmunoglobulinas, SV40, Adenovirus, Virus del Papiloma Bovino, citomegalovirus y similares.

15 Los vectores que contienen las secuencias polinucleótidas de interés (*por ejemplo*, la cadena pesada y ligera que codifica secuencias y secuencias de control de la expresión), pueden transferirse a las células huésped mediante procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección mediante cloruro cálcico se utiliza habitualmente para las células procarióticas, mientras que el tratamiento con fosfato cálcico o la electroporación puede utilizarse para otros huéspedes celulares. (Véase, de modo general, Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1982), que se incorpora a la presente memoria como referencia).

20 Una vez expresados el conjunto de anticuerpos, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulinas de la presente invención, pueden purificarse según los procedimientos estándar en la técnica, incluyendo la precipitación con sulfato amónico, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, en general, *Scopes, R.*, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982)).

30 Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras de por lo menos una homogeneidad de aproximadamente 90 a 95%, y para utilización farmacéutica, se prefiere mucho una homogeneidad de 98 a 99% o más. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad, según se desee, los polipéptidos pueden entonces utilizarse terapéuticamente (incluyendo la extracorporeidad) o para desarrollar y llevar a cabo procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes, y similares. (Véase, de modo general, *Immunological Methods*, Vols I y II, Lefkovits y Pemis, editores, Academic Press, New York, N.Y. (1979 y 1981)).

35 Las inmunoglobulinas de la presente invención se utilizarán individualmente para tratar los efectos tóxicos de la infección (VTEC) por *E. coli* productora de Verotoxina y el Síndrome Hemolítico Urémico (HUS) y/o para neutralizar los antígenos VT2. A título de ejemplo no limitativo, algunos estados patológicos típicos apropiados para el tratamiento, incluyen la colitis hemorrágica localizada localmente en el tracto digestivo, la disfunción renal y el daño cerebral.

40 Las inmunoglobulinas humanizadas y sus composiciones farmacéuticas de la presente invención son particularmente útiles para la administración parenteral, esto es, subcutánea, intramuscular o intravenosamente. Las composiciones para la administración parenteral comprenderán habitualmente una solución de la inmunoglobulina o un cóctel suyo disueltos en un portador aceptable, preferentemente un portador acuoso. Pueden utilizarse diversos portadores, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, glucosa al 5%, solución de albúmina humana y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente están libres de partículas. Estas composiciones pueden ser esterilizadas mediante técnicas de esterilización bien conocidas y convencionales. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables si se requieren para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como el ajuste de pH y agentes tampones, agentes de tonicidad, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, lactato sódico, citrato sódico, etc. La concentración de inmunoglobulina en estas formulaciones puede variar ampliamente, es decir, desde una cantidad mínima tal como aproximadamente 0,5%, habitualmente por lo menos de aproximadamente 1%, a una cantidad máxima tal como el 15-20% en peso, y se seleccionará basándose principalmente en volúmenes de líquidos, viscosidades, etc, de acuerdo con el modo particular seleccionado de administración.

55 Así, una composición farmacéutica típica para inyección puede prepararse hasta contener 1 ml de agua tampón estéril, y 1-10 mg de inmunoglobulina. Una composición típica para infusión intravenosa podría prepararse hasta contener 250 ml de solución de Ringer estéril, y 150 mg de inmunoglobulina. Los procedimientos actuales para preparar composiciones administrables parenteralmente serán conocidas o evidentes para los expertos en la materia, y se describen con más detalle en, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Science*, 15ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980).

60 Las inmunoglobulinas de la presente invención pueden congelarse o liofilizarse para su almacenamiento y ser reconstituidas en un portador adecuado antes de utilizarse. Esta técnica se ha mostrado efectiva con globulinas inmunes convencionales y pueden utilizarse técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica. Los expertos en la materia apreciarán que la liofilización y reconstitución pueden conducir a varios grados de pérdida de la actividad inmunoglobulínica (*por ejemplo*, con las globulinas inmunes convencionales, los anticuerpos IgM tienden a tener

ES 2 270 598 T3

una mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG) y que los niveles de uso pueden tener que ajustarse para compensar.

5 Las composiciones que contienen estas inmunoglobulinas humanizadas o un cóctel suyo, pueden administrarse para tratamientos terapéuticos o profilácticos. En la aplicación terapéutica, las composiciones se administran a un paciente que ya padece la infección de *E. coli* (VTEC) que produce la Verotoxina y el Síndrome Hemolítico Urémico (HUS), u otras manifestaciones tóxicas de los antígenos VR2, en una cantidad suficiente para curar o por lo menos detener parcialmente el síndrome tóxico y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para que esto se cumpla se define como una “dosis terapéuticamente efectiva”. En aplicaciones profilácticas, las composiciones se administran a 10 pacientes que presentan riesgo de infección en una cantidad suficiente para prevenir o inhibir detectablemente dicha infección y/o su manifestación tóxica, debida a los antígenos VT2. Las cantidades efectivas para dichas utilidades dependen de la gravedad de la enfermedad y del estado general del propio sistema inmune del paciente, pero están generalmente comprendidas entre aproximadamente 0,1 y 5 mg/kg de inmunoglobulina por dosis de paciente que se utiliza habitualmente. Debe tenerse en cuenta que los materiales de esta invención pueden utilizarse generalmente en 15 estados patológicos graves, que son situaciones que amenazan la vida o lo hacen potencialmente. En dichos casos, en vista de la minimización de sustancias extrañas y de la probabilidad más baja de rechazos de “sustancias extrañas” alcanzados por estas inmunoglobulinas humanizadas de la invención, es posible y puede considerarse deseable por el médico que lleva a cabo el tratamiento, administrar excesos sustanciales de estas inmunoglobulinas.

20 Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones pueden llevarse a cabo con niveles y patrones de dosis seleccionados por el médico que aplica el tratamiento. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas proporcionarán una cantidad suficiente de la inmunoglobulina o inmunoglobulinas de la presente invención para tratar efectivamente al paciente.

25 En las formas de realización particulares, las composiciones que comprenden la inmunoglobulina humanizada de la presente invención, pueden utilizarse para detectar antígenos VT2 en la infección por *E. coli* (VTEC) que produce Verotoxina y Síndrome Hemolítico Urémico (HUS) y/o en otras infecciones que producen VT2 o VT2V. Así, una inmunoglobulina humanizada de la presente invención, tal como una inmunoglobulina humanizada que se une al antígeno determinante identificado por el anticuerpo MuVTm1.1 puede marcarse y utilizarse para identificar sitios 30 anatómicos que contiene concentraciones significativas de VT2 O VT2V. A título de ejemplo no limitativo, una o más fracciones marcadoras pueden unirse a la inmunoglobulina humanizada. Fracciones marcadoras ejemplares incluyen, pero no están limitadas a colorantes radioopacos, agentes de radiocontraste, moléculas fluorescentes, moléculas espín marcadas, enzimas, u otras fracciones de marcado de valor diagnóstico, particularmente en técnicas radiológicas o de imágenes de resonancia magnética.

35 Las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención pueden encontrar además una amplia variedad de utilización *in vitro*. Como ejemplo, las inmunoglobulinas pueden utilizarse para la detección de antígenos VT2, o similares.

40 Con propósitos diagnósticos, las inmunoglobulinas pueden marcarse o no. Las inmunoglobulinas no marcadas pueden utilizarse en combinación con otros anticuerpos marcados (segundos anticuerpos) que reaccionan con la inmunoglobulina humanizada, tales como los anticuerpos específicos para las regiones constantes de las inmunoglobulinas humanas. Alternativamente, las inmunoglobulinas pueden marcarse directamente. Pueden utilizarse una amplia variedad de marcadores tales como radionúclidos, fluor, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores 45 enzimáticos, ligandos (particularmente haptenos), etc. Están disponibles numerosos tipos de inmunoensayos y son bien conocidos por los expertos en la materia.

Pueden suministrarse asimismo equipos para utilizar con las inmunoglobulinas sujeto en la protección contra o la detección de una actividad celular o para detectar la presencia de un antígeno seleccionado. De este modo, la composición de la inmunoglobulina sujeto de la presente invención puede suministrarse, habitualmente en forma liofilizada 50 en un contenedor, sola o conjuntamente con anticuerpos adicionales, específicos para el tipo celular deseado. Las inmunoglobulinas, que pueden conjugarse a un marcador o toxina, o no conjugarse, se incluyen en los equipos con tampones, tal como Tris, fosfato, carbonato, etc, estabilizantes, conservantes, biocidas, proteínas inertes, por ejemplo, albúmina sérica, o similares, y un conjunto de instrucciones para el uso. Generalmente, estos materiales se encontrarán en una cantidad inferior a aproximadamente 5% en peso, basada en la cantidad de inmunoglobulina activa y presente habitualmente en la cantidad total de por lo menos 0,001% en peso, basado nuevamente en la concentración inmunoglobulínica. Frecuentemente, será deseable incluir un excipiente para diluir los principios activos, en los que el excipiente puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente 1 a 99% en peso de la composición total. Si 55 en el ensayo se utiliza un segundo anticuerpo capaz de unirse a la inmunoglobulina, éste se encontrará habitualmente en un vial separado. El segundo anticuerpo se conjuga típicamente a un marcador y se formula de forma análoga a las formulaciones de la inmunoglobulina descritas anteriormente.

Anticuerpos humanos

65 La descripción proporciona además anticuerpos humanos que compiten con el VTm1-1 de ratón para la unión a la Verotoxina II o con la variante de la Verotoxina II y que pueden generarse utilizando los procedimientos siguientes.

ES 2 270 598 T3

a. Metodología de triomas

El enfoque básico y una pareja ejemplar de fusión celular, SPAZ-4, para su utilización en este enfoque, se han descrito por Oestberg *et al.*, *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, patente US nº 4.634.664; y Engleman *et al.*, patente US nº 4.634.666.

Las líneas celulares productoras de anticuerpos obtenidas mediante este procedimiento se denominan triomas, porque provienen de tres células, dos humanas y una de ratón. Inicialmente, se fusiona una línea de mieloma murino con un linfocito B humano para obtener un célula híbrida xenogénea que no produce anticuerpos, tal como la línea celular SPAZ-4 descrita por Oestberg, *supra*. La célula xenogénea se fusiona entonces con un linfocito B humano inmunizado para obtener una línea celular trioma productora de anticuerpos. Se ha descubierto que los triomas producen anticuerpos de forma más estable que los hibridomas ordinarios obtenidos a partir de las células humanas.

Los linfocitos B se obtienen de la sangre, bazo, nódulos linfáticos o médula ósea de un donante humano. La inmunización *in vivo* de un ser humano viviente con Verotoxina II o con la variante II de la Verotoxina no es habitualmente deseable, debido al riesgo de iniciar una respuesta dañina. Así, los linfocitos B son inmunizados habitualmente *in vitro* con estos antígenos o con un fragmento antigénico de cualquiera de éstos, o con una célula que transporte cualquiera de éstos. Los linfocitos B son expuestos típicamente al antígeno durante 7-14 días en un medio tal como RPMI-1640 (véase Engleman, *supra*) suplementado con suero humano al 10%.

Los linfocitos B inmunizados se fusionan a una célula híbrida xenogénea tal como SPAZ-4 mediante procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, las células son tratadas con polietilenglicol al 40-50% de PESO MOLECULAR 1000-4000, a aproximadamente 37 grados, durante 5-10 minutos. Las células se separan de la mezcla de fusión y se propagan en medio selectivo para los híbridos deseados (*ejemplo*, HAT o AH). Los clones que secretan anticuerpos que muestran la especificidad de unión requerida son identificados ensayando el medio de cultivo del trioma respecto a la capacidad para unirse a la Verotoxina II o a la variante de la Verotoxina II. Los triomas que producen anticuerpos que poseen la especificidad deseada, son subclonados mediante, por ejemplo, la técnica de dilución limitante, haciéndose crecer *in vitro* en el medio de cultivo.

Aunque los triomas son genéticamente estables pueden no producir anticuerpos a niveles muy altos. Los niveles de expresión pueden aumentarse clonando genes de anticuerpos del trioma en uno o más vectores de expresión, y transformando el vector en una línea celular, tal como las líneas celulares que se consideran, *infra*, para la expresión de las inmunoglobulinas recombinantes o humanizadas.

b. Mamíferos transgénicos no humanos

Los anticuerpos humanos que reaccionan con la Verotoxina II y/o la toxina de la Verotoxina II pueden ser producidos asimismo a partir de mamíferos transgénicos no humanos que tienen transgenes que codifican por lo menos un segmento del locus de la inmunoglobulina humana. Habitualmente, el locus endógeno de la inmunoglobulina de dichos mamíferos está funcionalmente inactivado. Preferentemente, el segmento del locus de la inmunoglobulina humana incluye secuencias no organizadas de componentes de cadenas ligeras y pesadas. Tanto la inactivación de los genes endógenos de la inmunoglobulina como la introducción de los genes exógenos de la inmunoglobulina pueden alcanzarse mediante la recombinación homóloga dirigida, o mediante la introducción de cromosomas YAC. Los mamíferos transgénicos que provienen de este procedimiento pueden reorganizar funcionalmente las secuencias componentes de la inmunoglobulina, y expresar un repertorio de anticuerpos de varios isotipos codificados por los genes de la inmunoglobulina humana, sin expresar los genes endógenos de la inmunoglobulina. La producción y propiedades de los mamíferos que tienen estas propiedades se describen detalladamente por, por ejemplo, Lonberg *et al.*, WO93/12227 (1993); Kucherlapati, WO 91/10741 (1991). Los ratones transgénicos son particularmente apropiados. Los anticuerpos se obtienen inmunizando un mamífero transgénico no humano, tal como el descrito por Lonberg o Kucherlapati, *supra*. Los anticuerpos monoclonales se preparan mediante, *por ejemplo*, fusión de células B de dichos mamíferos a líneas celulares de mielomas apropiados utilizando tecnología convencional Kohler-Milstein.

Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo no limitativo. Se entenderá que aunque los ejemplos pertenecen al anticuerpo HuVTm1.1, la producción de los anticuerpos humanizados con una alta afinidad de unión para la subunidad B del antígeno VT2, se considera asimismo utilizando CDR de otros anticuerpos monoclonales que se unen a un epítipo de VT2.

Experimentación

Ejemplo 1

Inmunización de ratones con el toxoide de VT2

Se preparó VT2 tal como se describe por Oku *et al.*, *Microb. Pathog.*, 1989, 6 (2), 113-122. El toxoide de VT2 se preparó tratando 1 mg de VT2 durante 7 días a 37°C con formaldehído al 0,4% en tampón fosfato 0,1M, pH 7,6.

Ratones Balb/c (Nippon Charles River) se inmunizaron con el toxoide VT2 (0,5 µg) combinado con el Adyuvante Completo de Freund (Gibco BRL) mediante inyección intraperitoneal (i.p.). Después de aproximadamente 4 semanas,

ES 2 270 598 T3

los ratones recibieron toxoide VT2 (1 μg) combinado con Adyuvante Incompleto de Freund mediante inyección i.p. Entonces, los ratones recibieron toxoide VT2 (1 μg dos veces, 4 μg dos veces, 5 μg una vez) combinado con Adyuvante Incompleto de Freund mediante inyección intraperitoneal de modo secuencial con un intervalo de 1 a 5 semanas.

5 Se sangró a los ratones seccionando la vena de la cola y el suero se recogió mediante incubación de la sangre durante 30 minutos a 37°C y centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. El título sérico contra VT2 se midió mediante ELISA de la forma siguiente:

10 Cada pocillo de la placa de fondo plano con 96 pocillos (Falcon 3912, Becton Dickinson) se revistió con 50 μl de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de VT2 diluido con solución salina tamponada con fosfato 0,01 M (PBS), incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente.

Cada pocillo se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,05%.

15 Cada pocillo se bloqueó con PBS-BSA al 3% durante una hora a temperatura ambiente.

Cada pocillo se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,05%.

20 50 μl de suero diluido serialmente con PBS se añadieron a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora.

Cada pocillo se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,05%.

25 A cada pocillo se añadieron 50 μl de IgG anticonejo de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (ZYMED) diluido (x 1000) con PBS-BSA al 3% e incubado a la temperatura ambiente durante 1 hora.

Cada pocillo se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,05%.

30 A cada pocillo se añadió p-nitrofenilfosfato (PNPP: Wako Chemicals) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora.

La absorción de 405 nm se midió y registró para cada pocillo.

Ejemplo 2

35 *Construcción de hibridoma mediante el procedimiento de fusión celular*

Se escogieron y esplenectomizaron ratones cuyo suero contenía anticuerpos que reaccionaban contra VT2. 5 x 10⁷ células esplénicas y 5 x 10⁶ P3 x 63 Ag8U.1 (P3U1) células de mieloma de ratón se combinaron y se lavaron una vez con medio RPMI 1640 y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular se dispersó cuidadosamente y se volvieron a suspender en 1 ml de solución de polietilenglicol (PEG) (que contenía 5,75 ml de medio RPMI 1640 + 3,5 ml de PEG + 0,75 ml de dimetilsulfóxido) y se rotó suavemente durante 2 minutos. Entonces, 1 ml del medio RPMI se añadió y se hizo rotar durante 2 minutos. Después de esto, se añadieron 2 ml del medio RPMI y se hicieron rotar durante 2 minutos. 4 ml de medio GIT-HAT (95 μM hipoxantina, 0,4 μM aminopterina, 1,6 μM de timidina, FCS al 5%) se añadieron y se hicieron rotar durante 2 minutos. Entonces, 8 ml de medio GIT-HAT se añadió y se hizo rotar durante 2 minutos después de 30 minutos de incubación a 37°C, la suspensión celular se suministró a cada pocillo de la placa de fondo plano con 96 pocillos inoculados con 10⁴ macrófagos peritoneales de ratón/pocillo. La placa se incubó a 37°C en una cámara incubadora (CO₂ al 5%-95% aire) durante una semana. Entonces, la mitad del medio en cada pocillo se reemplazó con medio GIT-HT recién preparado (medio GIT-HAT sin aminopterina) y la placa se incubó durante aproximadamente una semana para que las células de hibridoma se desarrollaran.

Ejemplo 3

55 *Rastreo de células de hibridoma de ratón que secretan anticuerpos contra VT2*

El rastreo se llevó a cabo seleccionando células de hibridoma que secretan anticuerpos que se unen a VT2 y neutralizan VT2. El sobrenadante del hibridoma se utilizó para el rastreo. La actividad de unión se midió según el procedimiento de ELISA descrito en el Ejemplo 1. La actividad de neutralización de VT2 se midió según el procedimiento siguiente.

60 A cada pocillo de una placa de 96 pocillos se añadieron 30 μl del sobrenadante de hibridoma y 30 μl de 200 pg/ml de VT2 e nFCS-MEM del 10%.

La placa se incubó a 37°C durante 1 hora.

65 50 μl de la solución anterior se añadieron a cada pocillo de una placa de fondo plano con 96 pocillos sobre la que se inocularon células Vero (ATCC) (4 x 10⁴ células/pocillo).

ES 2 270 598 T3

La placa se incubó a 37°C durante 4 días en una cámara de incubación con CO₂ al 5% y un 95% de aire.

100 µl de una solución de rojo neutro al 0,014% se añadió a cada pocillo.

5 La placa se incubó a 37°C durante 1 hora, para teñir las células vivas.

Después de lavar el pocillo con PBS, 100 µl de una solución de etanol al 50% que contiene una solución de ácido acético al 1% (ETOH-AcOH) se añadieron a cada pocillo.

10 La absorción a 550 nm se midió y se registró para cada pocillo.

Ejemplo 4

Clonación de células de hibridoma

15 La clonación de las células de hibridoma se llevó a cabo mediante dilución limitante. Una a dos células de hibridoma se añadieron a cada pocillo de una placa de fondo plano con 96 pocillos previamente inoculada con 10⁴ macrófagos peritoneales de ratón como células alimentadoras. Después de aproximadamente 2 semanas, el sobrenadante se midió respecto a la unión a VT2 y a la neutralización contra VT2 tal como se describe en los Ejemplos 1 y 3, respectivamente.
20 Repitiendo este procedimiento de clonación varias veces tal como se ha descrito anteriormente, se estableció un clon celular del hibridoma secretando un anticuerpo monoclonal (MuVTm1.1) que neutraliza VT2.

Ejemplo 5

25 Purificación de MuVTm1.1

Las células de hibridoma que secretan MuVTM1.1 se adaptaron al medio basal eRDF libre de suero que contiene insulina, transferrina, etanolamina y selenita. El sobrenadante del cultivo se pasó sobre una columna de Proteína G sefarosa (Pharmacia), eluyéndose el anticuerpo utilizando procedimientos estándar. la pureza del anticuerpo se comprobó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y su concentración se determinó mediante SRID.
30 El MuVTm1.1 purificado se ensayó respecto a su capacidad para neutralizar variantes VT2 tal como se describe en el Ejemplo 3. Los resultados se presentan en la tabla siguiente y en la Figura 7.

TABLA 1

35

Actividad neutralizante de MuVTm1.1 contra			
Varias variantes de VT2			
Cepas	Origen	Tipo de toxina	Neutralización
<i>E. coli</i> 0157 V50	Humano	VT2vh	+
<i>E. coli</i> 0157 V354	Humano	VT2vh	+
<i>E. coli</i> 0157 V601	Humano	?	+
<i>E. coli</i> 0157:H7 TK40	Humano	VT2, VT2vx1*	+
<i>E. coli</i> 0157:H7 TK51	Humano	VT2vx1	+
<i>E. coli</i> 091:H21	Humano	VT2vha, VT2vhb	+

55 * VT2vx es un nuevo subtipo de la variante VR2.

Ejemplo 6

60 Clonación y secuenciación de los cADN de la región variable del VTm1.1 murino

Los cADN de la región variable de la cadena ligera y pesada del VTm1.1 (MuVTm1.1) murino se clonaron a partir del ARNm aislado de las células del hibridoma, utilizando la PCR anclada (Co *et al.*, *J.Immunol.* 148:1149 (1992)). Los cebadores del extremo 5' utilizados se hibridizaron a las colas poly-dG añadidas al cADN, y los cebadores del extremo
65 3' a las regiones constantes. Los fragmentos génicos amplificados se insertaron entonces en el plásmido pUC18. Las secuencias nucleótidas se determinaron a partir de varios clones independientes para tanto V_L como V_H cADN. Para la cadena pesada, se identificó una única secuencia, típica de una región variable de una cadena pesada murina. Para la cadena ligera se identificaron dos secuencias únicas, ambas homólogas respecto a las secuencias de la región variable

ES 2 270 598 T3

de la cadena ligera murina. Sin embargo, una secuencia no fue funcional a causa de la pérdida de un nucleótido que provocó un cambio del marco de lectura en la unión V-J, y se identificó como el alelo no productor. La otra secuencia era típica de una región variable de la cadena kappa murina funcional. Las secuencias de la región variable del cADN de la cadena pesada y la cadena ligera funcional y las secuencias aminoácidas traducidas se muestran en la Figura 1.

5 La secuencia V del ratón pertenece al subgrupo V de Kabat de la cadena kappa del ratón. La V_H del ratón pertenece al subgrupo III (D) de Kabat de la cadena pesada.

Ejemplo 7

10 *Diseño de las regiones variables del VTm1.1 humanizado*

Para conservar la afinidad de unión del anticuerpo de ratón en el anticuerpo humanizado, se siguieron los procedimientos generales de Queen *et al* (Queen *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029 (1989) y la patente U.S n° 5.585.089 y n° 5.693.762). La elección de los residuos estructurales puede ser crítica para conservar una alta afinidad de unión. En principio, una secuencia estructural de cualquier anticuerpo humano puede servir como una matriz para el injerto de CDR; sin embargo, se ha demostrado que el reemplazo en línea recta de CDR en dicha estructura puede conducir a una pérdida significativa de la afinidad de unión al antígeno (Glaser *et al., J.Immunol.* 149:2606 (1992); Tempest *et al., Biotechnology* 9:266 (1992); Shalaby *et al., J. Exp. Med.* 17:217 (1992)). Cuanto más homólogo es un anticuerpo humano respecto al anticuerpo murino original, menos distorsiones introducirá probablemente la estructura humana en las murinas que pudieran reducir la afinidad. Basándose en una búsqueda de homología secuencial respecto a la base de datos de Kabat (Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, 1991), el anticuerpo humano GF4 se escogió como el que proporcionaba una buena homología estructural al anticuerpo MuVTm1.1. Otras cadenas altamente homólogas del anticuerpo humano serán apropiadas asimismo para proporcionar la estructura del anticuerpo humanizado, especialmente las cadenas ligeras kappa del subgrupo III humano y las cadenas pesadas del subgrupo III humano, tal como se definió por Kabat.

Los programas informáticos ABMOD y ENCAD (Levitt *et al., J.Mol.Biol.* 168:595 (1983)) se utilizaron para construir un modelo molecular del dominio variable de VTm1.1, que se utilizó para localizar los aminoácidos en la estructura del VTm1.1 que están lo bastante cerca de los CDR como para interactuar potencialmente con ellos. Para diseñar las regiones variables de la cadena ligera y pesada del VTm1.1 humanizado, los del anticuerpo VTm1.1 del ratón se injertaron en las regiones estructurales del anticuerpo GF4 humano. En las posiciones de la estructura en las que el modelo informático sugirió un contacto significativo con las CDRs, los aminoácidos del anticuerpo del ratón se sustituyeron por los aminoácidos estructurales humanos o originales. Para el VTm1.1 humanizado, esto se llevó a cabo en los residuos 29, 30, 49 y 98 de la cadena pesada y en el residuo 49 de la cadena ligera. Además, los residuos estructurales que sólo raramente se dispusieron en sus posiciones en la base de datos de los anticuerpos humanos, fueron reemplazados por un aminoácido humano consensuado en estas posiciones. Para el VTm1.1 humanizado esto se llevó a cabo en los residuos 1, 4, 5, 79, 89 y 93 de la cadena pesada y en los residuos 3, 4, 19, 76, 79 y 85 de a cadena ligera.

La secuencia de las regiones variables de la cadena ligera y pesada del anticuerpo VTm1.1 incluyendo el codon de iniciación y las secuencia peptídicas señaléticas, se muestran en la Figura 2. Sin embargo, muchos de los residuos potenciales de contacto CDR son maleables respecto a las sustituciones de otros aminoácidos que pueden todavía dejar que el anticuerpo conserve una afinidad sustancial para el antígeno. La tabla siguiente lista diversas posiciones en la estructura en la que aminoácidos alternativos pueden ser apropiados (LC= cadena ligera, HC= cadena pesada).

TABLA 2

Posición	VTm1.1 humanizado	Alternativas
LC-49	K	Y
HC-29	F	S
HC-30	S	K
HC-49	A	S
HC-98	R	K

Asimismo, muchos de los residuos estructurales que no están en contacto con las CDRs en las cadenas ligeras y pesadas del VTm1.1 humanizado, pueden acomodar sustituciones de aminoácidos a partir de las posiciones correspondientes del anticuerpo GF4 humano, a partir de otros anticuerpos humanos, a partir del VTm1.1 del ratón, o a partir de otros anticuerpos murinos, sin pérdida significativa de la afinidad o de la no-inmunogenicidad del anticuerpo humanizado. La tabla siguiente lista diversas posiciones adicionales en la estructura, en la que pueden ser apropiados aminoácidos alternativos.

ES 2 270 598 T3

TABLA 3

Posición	VTm1.1 humanizado	Alternativas
5	LC-3	V
	LC-4	L
	LC-19	M
10	LC-76	A
	LC-79	V
	LC-85	S
15	HC-1	E
	HC-4	Q
20	HC-5	L, M
	HC-79	V
25	HC-89	E
	HC-92	D
		M, I

30

La selección de varios aminoácidos alternativos puede utilizarse para producir versiones del VTm1.1 humanizado que tengan combinaciones variables de afinidad, especificidad, no inmunogenicidad, facilidad de preparación, y otras propiedades deseables. Así, los ejemplos en las tablas anteriores se proporcionan a título ilustrativo no limitativo.

35 Ejemplo 8

Construcción del VTm1.1 humanizado

40 Una vez que las secuencias aminoácidas de la región variable humanizada se ha diseñado tal como se ha descrito anteriormente, les construyeron genes para codificarlas, incluyendo los péptidos señaléticos, señales de corte y empalme del donante y sitios apropiados de restricción (Figura 2). Los genes de la región variable de la cadena ligera y pesada se construyeron y amplificaron utilizando ocho oligonucleótidos sintéticos traslapados con una longitud comprendida entre 65 y 80 bases aproximadamente, tal como se muestra en la Figura 3 (véase *H et al., J. Immunol.* 160:1029 (1998)). Los oligos se hibridizaron a pares y se ampliaron con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, dando lugar a dos fragmentos. Estos fragmentos se desnaturalizaron, se hibridizaron a pares y se ampliaron otra vez, dando lugar a un gen de longitud completa. El producto resultante se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la Taq polimerasa, se purificó en gel, se sometió a digestión con XbaI, se purificó otra vez con gel, y se subclonó en el sitio XbaI del vector de expresión pVk o pVg1. Los vectores pVk y pVg1, para la expresión respectiva de las cadenas ligera y pesada, se han descrito anteriormente (véase *Co et al., J. Immunol.* 148:1149 (1992)).

55

La estructura de los plásmidos finales se comprobó mediante secuenciación nucleótida y obtención del mapa de restricción. Todas las manipulaciones del ADN se llevaron a cabo mediante procedimientos estándar bien conocidos por los expertos en la materia.

60

Para construir una línea celular productora del VTm1.1 humanizado, los plásmidos de la cadena ligera y pesada se transfectaron a la línea celular del mieloma de ratón Sp2/0-Ag14 (ATCC CRL 1581). Antes de la transfección, los plásmidos conteniendo las cadenas ligera y pesada se linealizaron utilizando Fspl. Aproximadamente 20 µg de cada plásmido se transfectaron a 1 x 10⁷ células en PBS. La transfección se llevó a cabo mediante electroporación utilizando un dispositivo de Pulsación génica (BioRad) a 360 V y 25 µFD de capacitancia, según las instrucciones del fabricante. Las células de cada transfección se sembraron en cuatro placas de cultivo tisular con 96 pocillos, y después de dos días, se aplicó un medio de selección (DMEM, FCS al 10%, suplemento 1 x HT (Sigma), 0,25 mg/ml de xantina, 1 µg/ml de ácido micofenólico).

65

Después de aproximadamente dos semanas, los clones que aparecieron, se rastrearon respecto a la producción de anticuerpos mediante ELISA. El anticuerpo de un clon de alta producción se preparó haciendo crecer las células hasta confluencia en un medio regular (DMEM con FCS al 10%), reemplazando entonces el medio con un medio libre de

ES 2 270 598 T3

suero (Hybridoma SMF; Gibco) y cultivando hasta los títulos máximos del anticuerpo que se alcanzaron en el cultivo. El sobrenadante del cultivo se procesó a través de una columna de proteína A-Sepharose (Pharmacia); el anticuerpo se eluyó con Glicina 0,1 M, 100 mM NaCl, pH 3, se neutralizó y a continuación se sometió a intercambio con una solución salina tamponada de fosfato (PBS). La pureza del anticuerpo se comprobó analizándolo sobre un gel de acrilamida, y determinando su concentración mediante una lectura de la O.D₂₈₀ (densidad óptica), asumiendo que 1,0 mg de la proteína anticuerpo posee una O.D₂₈₀ de 1,4.

Ejemplo 9

10 *Propiedades del VTm1.1 humanizado*

Medición de la afinidad

15 La afinidad de los anticuerpos MuVTm1.1 y HuVTm1.1 para la Verotoxina II (VT2) se determinó mediante unión competitiva con el anticuerpo biotinilado MuVTm1.1. El procedimiento para el experimento se describe a continuación:

20 Placas Immulon 2, con 96 pocillos, de Laboratorios Dynatec, (parte #0110103455), revestidas con 50 μ l de solución VT2 (0,2 μ g/ml en PBS) por pocillo, se incubaron a 37° C durante 2 horas agitando suavemente.

La solución de VT2 se aspiró. Cada pocillo se lavó 4 veces con 400 μ l de tampón de lavado (Tween 20 al 0,1% en PBS).

25 Cada pocillo se bloqueó 400 μ l de Tampón Bloqueante Pierce SuperBlock en PBS (cat #37515) a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se aspiró la solución bloqueante. Se lavó cada pocillo 4 veces con 400 μ l de tampón de lavado.

30 A cada pocillo se añadieron 20 ng del anticuerpo MuVTm1.1 biotinilado mezclado con diversas concentraciones de anticuerpos de ratón no marcados o anticuerpos Hu VTm1.1 en un volumen total de 100 μ l en tampón de unión (BSA al 1%, Tween 20 al 0,1% en PBS). Se llevó a cabo una incubación a 4°C por la noche con agitación suave. Se aspiraron las soluciones del anticuerpo. Se lavó cada pocillo 4 veces con 400 μ l del tampón de lavado.

35 Se añadieron 100 μ l de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Biosource cat #5NN2004)- (dilución del 1:500 en tampón de unión) a cada pocillo. Se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación suave.

Se aspiró la solución de estreptavidina. Se lavó cada pocillo 6 veces con 400 μ l de tampón de lavado.

40 Se añadieron 100 μ l/pocillo de sustrato peroxidásico (BioRad #72-1064). Se incubó a temperatura ambiente hasta que apareció color. Lectura de la placa en el lector de placas Molecular devices ELISA a 415 nm.

45 El resultado, que se muestra en la Fig. 4, demostró que el anticuerpo VTm1.1 humanizado compite bien contra el anticuerpo biotinilado de ratón en el ensayo competitivo ELISA, dentro de un factor 2 cuando se compara con el anticuerpo murino.

La afinidad de HuVTm1.1 y MuVTm1.1 se calculó asimismo utilizando el procedimiento BIAcore. La K_D calculada para el HuVTm1.1 es de aproximadamente 3,6 x 10⁻⁹ M respecto a 1,9 x 10⁻⁹ M para el Mu VTm1.1, tal como se muestra en la Tabla a continuación:

50 TABLA 4

	MuVTm1.1	HuVTm1.1
55 K _a	9,9 x 10 ⁴ M ⁻¹ S ⁻¹	9,5 x 10 ⁴ M ⁻¹ S ⁻¹
K _d	1,9 x 10 ⁻⁴ S ⁻¹	3,4 x 10 ⁻⁴ S
60 K _D	1,9 x 10 ⁻⁹ M	3,6 x 10 ⁻⁹ M

65

ES 2 270 598 T3

Ejemplo 10

Actividad neutralizante in vitro de:

5 *HuVTm1.1*

La actividad neutralizante de HuVTm1.1 se mide asimismo comparada con el MuVTm1.1 del ratón en un ensayo *in vitro* que se describe a continuación:

10 La línea celular derivada del riñón humano (ACHN) se inoculó en una placa de 96 pocillos con una concentración de 1×10^4 células /pocillo, incubándose a 37°C durante 24 horas.

15 Se aspiró el medio y 50 μ l de una solución mezclada de 30 μ l de una solución de VT2 de 540 pg/ml diluida con FCS-MEM al 10% y de 30 μ l del anticuerpo de ensayo diluido serialmente con FCS-MEM al 10% (VTm1.1 de ratón o humanizado) preincubado a 37°C durante 1 hora, se añadieron a cada pocillo y se incubaron a 37°C durante cuatro días.

20 100 μ l de rojo neutro al 0,028% en el medio se añadieron a cada pocillo y se incubaron a 37°C durante 1 hora (Mullbacher, A *et al*, 1984, Journal of Immunological Methods, 68, 205-215).

La solución se aspiró. Cada pocillo se lavó dos veces con 150 μ l de PBS.

25 100 μ l de EtOH al 50%/AcOH al 1% se añadieron a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 5-10 minutos.

El valor de la absorción a 550 nm se registró para cada pocillo, utilizando un lector de placa ELISA de Molecular Devices.

La actividad neutralizante se calculó según la fórmula siguiente:

$$30 \quad \text{Neutralización (\%)} = \frac{\text{OD (VT2 + Ab)} - \text{OD (VT2 solo)}}{\text{OD (medio solo)} - \text{OD (VT2 solo)}} \times 100$$

35 La actividad neutralizante de HuVTm1.1 comparada con MuVTm1.1 se muestra en las Figuras 5. La ED₅₀ para el HuVTm1.1 es de 0,33 μ g/ml *versus* 0,2 μ g/ml para MuVTm1.1. La actividad de neutralización del HuVTm1.1 para las variantes de VT2 se muestra a continuación:

TABLA 5

40 *Ensayo de neutralización de variantes de VT2 in vitro con HuVTm1.1*

Cepas	Origen	Tipo de toxina	ED ₅₀ (μ g/ml)
45 <i>E. coli</i> 0157	Humano	VT2	0,33
<i>E. coli</i> 0157 (V50)	Humano	VT2vh	0,36
50 <i>E. coli</i> 0157 (V354)	Humano	VT2vh	0,39
<i>E. coli</i> 0157 (V601)	Humano	VT2v	0,32
<i>E. coli</i> 0157:H7 (TK 40)	Humano	VT2, VT2vx*	0,35

55 *VT2vx: Nuevo subtipo de la variante de VT2.

Ejemplo 11

60 *Análisis del antígeno VT2 reconocido*

65 VT2 se redujo, las subunidades A y B se separaron mediante un gel de poliacrilamida que contenía SDS y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio Rad) mediante el procedimiento de transferencia Western. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó durante la noche en BSA al 3% en PBS y se hizo reaccionar entonces con 10 μ g/ml de HuVTm1.1 o con suero anti-VT2 de conejo diluido con BSA al 3% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó 6 veces con BSA al 1%-PBS y se hizo reaccionar con 25 μ g/ml de fosfatasa alcalina conjugada con IgG anti-humana de cabra (TAGO) o fosfatasa alcalina conjugada con IgG de cabra anticonejo (TAGO) diluida con BSA al 3% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó entonces 6 veces con

ES 2 270 598 T3

BSA al 1% en PBS y se hizo reaccionar con la solución de NBT (Cloruro de Nitro-Azul tetrazolio)-BCIP (sal de 5-bromo-4-cloro-3-indoliefosfato p-toluidina) [PIERCE] durante 10 minutos a temperatura ambiente. El resultado que se muestra en la Figura 6 indica que el HuVTm1.1 se une principalmente a la subunidad b de VT2.

5 Ejemplo 12

Actividad in vivo de HuVTm1.1 contra VT2

10 Ratones DdY (Nippon SLC) se inyectaron vía ruta intravenosa con 4,8 μ g de HuVTm1.1, MuVTm1.1 o PBS esterilizados. Una hora después, los ratones recibieron vía intraperitoneal 46 ng de VT2 (correspondientes a 10 LD₅₀). Después de una semana, se midió la viabilidad de los ratones.

La tabla siguiente muestra el resultado. HuVTm1.1 protege completamente a los ratones de la muerte causada por VT2.

15

TABLA 6

20

25

Tratamiento	Supervivientes
PBS	100% (5/5)
VT2	0% (0/5)
HuVTm1.1 + VT2	100% (5/5)
MuVTm1.1 + VT2	100% (5/5)

30 De lo expuesto anteriormente, se apreciará que las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención ofrecen numerosas ventajas respecto a otros anticuerpos específicos antiVT. En comparación con los anticuerpos monoclonales murinos, estas inmunoglobulinas humanizadas contienen sustancialmente menos secuencias aminoácidas no humanas y potencialmente inmunogénicas. Esta probabilidad reducida de antigenicidad después de la inyección a un paciente humano, representa una mejoría terapéutica significativa. Aunque la presente invención se ha descrito con algunos detalles mediante la ilustración y los ejemplos con propósitos de claridad y comprensión, está claro que pueden llevarse a cabo ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

40

45

50

55

60

65

ES 2 270 598 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo humanizado que se une específicamente a VT2 y/o a la variante de VT2, en el que el anticuerpo humanizado comprende por lo menos una CDR de un anticuerpo no humano en una estructura de la región variable humana.
- 10 2. Anticuerpo humanizado según la reivindicación 1, que se une específicamente a la subunidad B de VT2 y/o a la subunidad B de la variante de VT2.
- 15 3. Anticuerpo humanizado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que neutraliza VT2 y/o la variante de VT2.
- 20 4. Anticuerpo humanizado según la reivindicación 1, que es una forma humanizada del anticuerpo VTm1-1 de ratón, estando el anticuerpo de ratón **caracterizado** por una región variable de cadena ligera representada en la Fig. 1B (SEC ID nº 4) y una región variable de cadena pesada representada en la Fig. 1A (SEC ID nº: 2).
- 25 5. Anticuerpo humanizado según la reivindicación 1, que compite con el anticuerpo VTm1-1 de ratón para la unión específica a VT2 y/o a la variante de VT2, en el que las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo de ratón son designados por SEC ID nº 2 y 4, respectivamente.
- 30 6. Anticuerpo humanizado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las regiones que determinan la complementariedad del anticuerpo VTm1-1 de ratón y las estructuras de la región variable de cadena ligera y pesada de las estructuras de cadena ligera y pesada del anticuerpo GF4 humano, con la condición de que por lo menos, una posición, preferentemente cada posición, del grupo constituido por L49, H29, H30, H49 y H98, esté ocupada por el aminoácido que se encuentra en la posición equivalente de la estructura de la región variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo VTm1-1 de ratón, uniéndose dicho anticuerpo humanizado específicamente a la Verotoxina II con una constante de afinidad de entre 10^7 M⁻¹ y diez veces la afinidad del anticuerpo VTm1-1 de ratón, en el que las regiones variables de cadena ligera o pesada del anticuerpo de ratón son designadas por SEC ID nº 2 y 4 respectivamente.
- 35 7. Anticuerpo humanizado según la reivindicación 6, con la condición de que por lo menos una posición, preferentemente cada posición, del grupo L3, L4, L19, L76, L79, L85, H1, H4, H5, H79, H89 y H93 esté ocupada por un aminoácido presente en la posición equivalente de una secuencia de consenso de cadena ligera o pesada de un anticuerpo humano.
- 40 8. Anticuerpo humanizado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende una región variable de cadena pesada representada en la Fig. 2A (SEC ID nº: 6) y una región variable de cadena ligera representada en la Fig. 2B (SEC ID nº: 8) con la condición de que una más posiciones seleccionadas de entre el grupo constituido por L49, H29, H30, H49, H98, L3, L4, L19, L76, L79, L85, H1, H4, H5, H79, H89, y H93 pueden sustituirse tal como se representa en las Tablas 2 y 3; y en el que el anticuerpo humanizado se une específicamente a la Verotoxina II con una constante de afinidad de entre 10^{-7} M y diez veces la afinidad del anticuerpo VTm1-1 del ratón.
- 45 9. Anticuerpo humanizado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende una región variable de cadena pesada representada en la Fig. 2A (SEC ID nº: 6) y una región variable de cadena ligera representada en la Fig. 2B (SEC ID nº: 8).
- 50 10. Anticuerpo humanizado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende una cadena pesada humanizada que presenta por lo menos una identidad secuencial de 85% con la cadena pesada humanizada representada en la Fig. 2A (SEC ID nº: 6) y una cadena ligera humanizada que presenta por lo menos una identidad secuencial de 85% con la cadena ligera humanizada representada en la Fig. 2B (SEC ID nº 8), con la condición de que por lo menos, una posición seleccionada de entre el grupo constituido por L49, H29, H30, H49 y H98, esté ocupada por el aminoácido presente en la posición equivalente de la estructura de la región variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo VTm1-1 de ratón.
- 55 11. Anticuerpo humanizado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo comprende dos pares de dímeros de cadena ligera/pesada, en el que cada cadena comprende una región variable y una región constante.
- 60 12. Anticuerpo humanizado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 u 11, que es un fragmento Fab o un F(ab')₂.
- 65 13. Anticuerpo humanizado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 11 ó 12 en forma purificada.
14. Anticuerpo humanizado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 11, 12 ó 13 que presenta un isotipo IgG₁ inmunoglobulínico.
15. Procedimiento para la producción de un anticuerpo VTm1-1 humanizado, que comprende el cultivo de una línea celular, que codifica cadenas de cadena ligera y de cadena pesada del anticuerpo humanizado según cualquiera de las

ES 2 270 598 T3

reivindicaciones 1 a 6, por lo que el anticuerpo humanizado se expresa; y la recuperación del anticuerpo humanizado expresado por la línea celular; comprendiendo además opcionalmente dicho procedimiento la mezcla del anticuerpo con un portador farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica.

5 16. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 17. Utilización de un anticuerpo humanizado según se define por cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se une específicamente a la Verotoxina II y/o la variante de la Verotoxina II, en la preparación de un medicamento para tratar a un paciente que padezca o en riesgo de sufrir los efectos tóxicos procedentes de una verotoxina.

18. Utilización según la reivindicación 17, en la que:

15 (a) el anticuerpo compite con el anticuerpo VTm1-1 de ratón para la unión específica a la Verotoxina II o la variante de la Verotoxina II; o

(b) el anticuerpo humanizado se une específicamente a VT2 y/o a la variante de VT2; o

20 (c) el anticuerpo humanizado se une específicamente a la subunidad B de VT2 y/o a la variante de VT2; o

(d) el anticuerpo humanizado se une específicamente a VT2 y/o a la variante de VT2 y neutraliza VT2 y/o la variante de VT2;

25 (e) el anticuerpo humanizado se une específicamente a la subunidad B de VT2 y/o a la subunidad B de la variante de VT2 y neutraliza VT2 y/o la variante de VT2; o

(f) el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, que es una forma humanizada del anticuerpo VTm1-1 de ratón; o

30 (g) el anticuerpo es un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada representada en la Fig. 2A (SEC ID n°: 6), y una región variable de cadena ligera representada en la Fig. 2B (SEC ID n°: 8);

35 en la que las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo VTm1-1 de ratón son designadas por SEC ID n°: 2 y 4, respectivamente.

19. Utilización según la reivindicación 17 ó 18, en la que el paciente es infectado con *E. coli* que produce *Verotoxina* y el medicamento se adapta para administrar el anticuerpo terapéutica o profilácticamente.

40 20. Línea celular que produce un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

45

50

55

60

65

60
 ATG AAC TTT GTG CTC AGC TCG ATT TTC CTT GCC CTC ATT TTA AAA GGA GTC CAG TGT GAA
 M N F V L S S I F L A L I L K G V Q C E
 30
 90
 GTG CAG CTG GTG GAG TCG GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GGG CCC CTG AAA CTC TCC
 V Q L V E S G G L V K P G G P L K L S
 120
 150
 TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AGT TAT GGC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCG
 C A A S G F T F S S Y G M S W V R Q T P
 180
 210
 GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT ACT GGT GGT AGT TAC ACC TAC TAC CCA
 E K R L E W V A T I S T G G S Y T Y Y P
 240
 270
 GAC AGT GTG AAG GGT CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC GCC CTG TAT CTG
D S V K G R F T I S R D N A K N A L Y L
 300
 330
 CAA ATG AGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATA TAT TAC TGT GCA AGA CGG GGG GAC
 Q M S S L R S E D T A I Y Y C A R R G D
 360
 390
 GCA TGG GGT AAC TTG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCT GTC ACC GTC TCC TCA
A W G N L D Y W G Q G T S V T V S S

FIG. 1(A).

```

30      60      90      120      150      180      210      240      270      300      330      360
ATG GTT TTC ACA CCT CAG ATA CTT GGA CTT ATG CTT TTT TGG ATT TCA GCC TCC AGA GGT
M  V  F  T  P  Q  I  L  G  L  M  L  F  W  I  S  A  S  A  S  R  G
30      60      90      120      150      180      210      240      270      300      330      360
GAT GTT GTG CTA ACT CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT GTG ACT CCA GGA GAT AGC GTC AGT
D  V  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  V  T  P  G  D  S  V  S
30      60      90      120      150      180      210      240      270      300      330      360
CTT TCC TGC AGG GCC AGT CAA ACT ATT AGC AAC AAC CTA CAC TGG TAT CAA CAC AAA TCA
L  S  C  R  A  S  Q  T  I  S  N  N  L  H  W  Y  Q  H  K  S
30      60      90      120      150      180      210      240      270      300      330      360
CAT GAG TCT CCA AGG CTT CTC ATC AAG TCT GCT TCC CAG TCC ATC TCT GGG ATC CCC TCC
H  E  S  P  R  L  L  I  K  S  A  S  Q  S  I  S  G  I  P  S
30      60      90      120      150      180      210      240      270      300      330      360
AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACT CTC AGT ATC AAC AGT GTG GAA ACT
R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  S  I  N  S  V  E  T
30      60      90      120      150      180      210      240      270      300      330      360
GAA GAT TTT GGA ATG TAT TTC TGT CAA CAG AGT TAC AGC TGG CCG CTC ACG TTC GGT GCT
E  D  F  G  M  Y  F  C  Q  Q  S  Y  S  W  P  L  T  F  G  A
30      60      90      120      150      180      210      240      270      300      330      360
GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA
G  T  K  L  E  L  K

```

FIG. 1(B).

60
 ATG AAC TTT GTG CTC AGC TCG ATT TTC CTT GCC CTC ATT TTA AAA GGA GTC CAG TGT GAA
 M N F V L S I F L A L I L K G V Q C E
 30
 120
 GTG CAA CTG GTG GAG TCG GGG GGA GGC TTA GTG CAG CCT GGA GGG TCC CTG AGA CTC TCC
 V Q L V E S G G TTA GTG CAG CCT GGA GGG TCC CTG AGA CTC TCC
 90
 180
 TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AGT TAT GGC ATG TCT TGG GTT CGC CAG GCT CCG
 C A A S G F T F S S Y G M S W V R Q A P
 150
 240
 GGT AAG GGT CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT ACT GGT GGT AGT TAC ACC TAC TAC CCA
 G K G L E W V A T I S T G G S Y T Y Y P
 210
 300
 GAC AGT GTG AAG GGT CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACC CTG TAT CTG
 D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L
 270
 360
 CAA ATG AAC AGT CTG AGG GCT GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCA AGA CGG GGG GAC
 Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R R G D
 330
 420
 GCA TGG GGT AAC TTG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TTA GTC ACC GTC TCC TCA
 A W G N L L D Y W G Q G T L V T V S S
 390

FIG. 2(A).

60
 30
 ATG GTT TTC ACA CCT CAG ATA CTT GGA CTT ATG CTT TTT TGG ATT TCA GCC TCC AGA GGT
 M V F T P Q I L G L M L F W I S A S R G
 90
 120
 GAA ATT GTG CTA ACT CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT GTG TCT CCA GGA GAA AGA GCC ACT
 E I V L T Q S P A T L S V S P G E R A T
 150
 180
 CTT TCC TGC AGG GCC AGT CAA ACT ATT AGC AAC AAC CTA CAC TGG TAT CAA CAA AAA CCA
 L S C R A S Q T I S N N L H W Y Q Q K P
 210
 240
 GGT CAG GCT CCA AGG CTT CTC ATC AAG TCT GCT TCC CAG TCC ATC TCT GGG ATA CCC GCC
 G Q A P R L L I K S A S Q S I S G I P A
 270
 300
 AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACT ATC AGC AGT CTG GAA TCT
 R F S G S G T D F T L T I S S L E S
 330
 360
 GAA GAT TTT GGA GTG TAT TAC TGT CAA CAG AGT TAC AGT TGG CCG CTC ACG TTC GGT CAA
 E D F A V Y Y C Q Q S Y S W P L T F G Q
 GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
 G T K V E I K

FIG. 2(B).

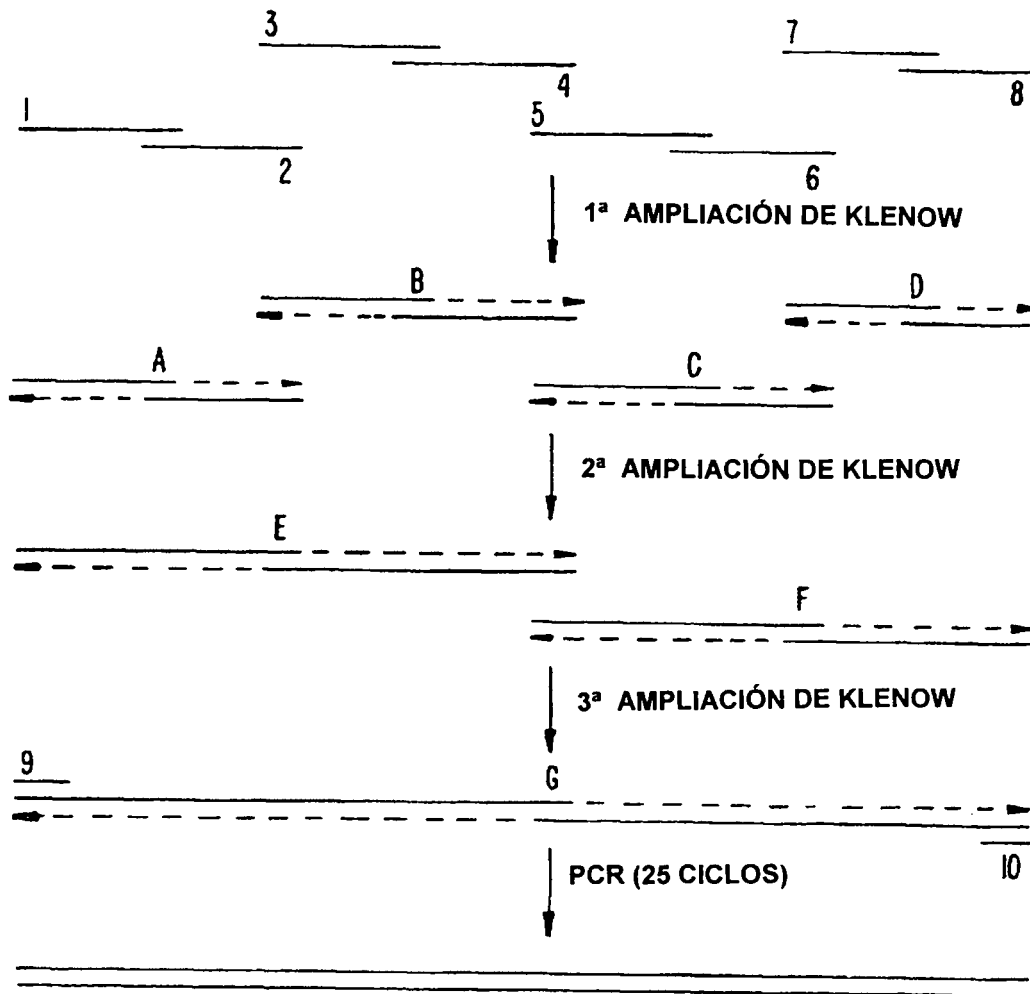


FIG. 3.

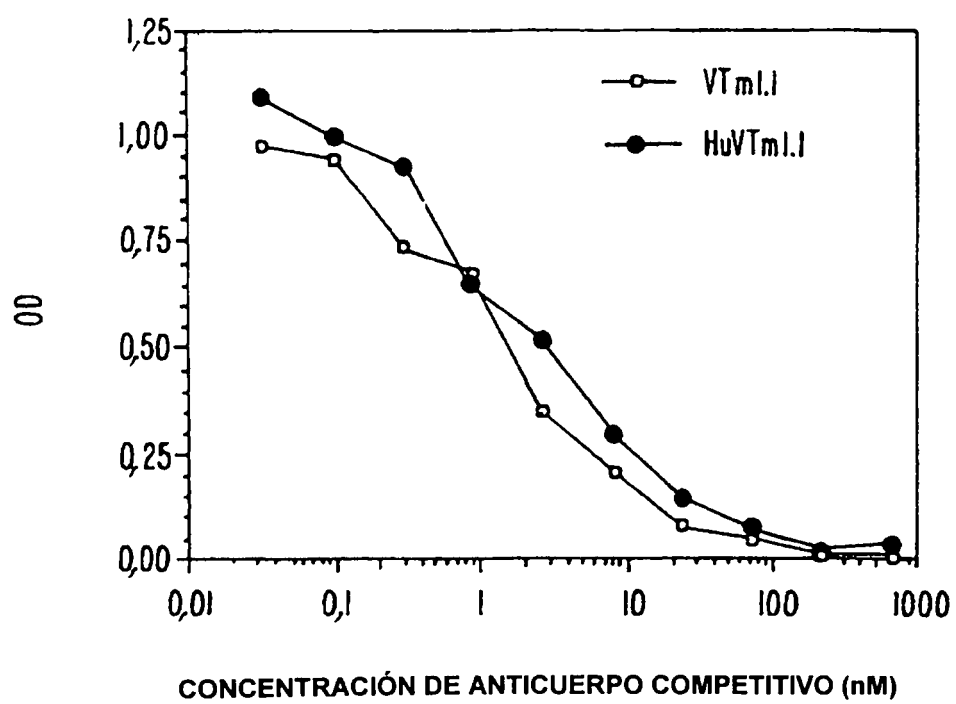


FIG. 4.

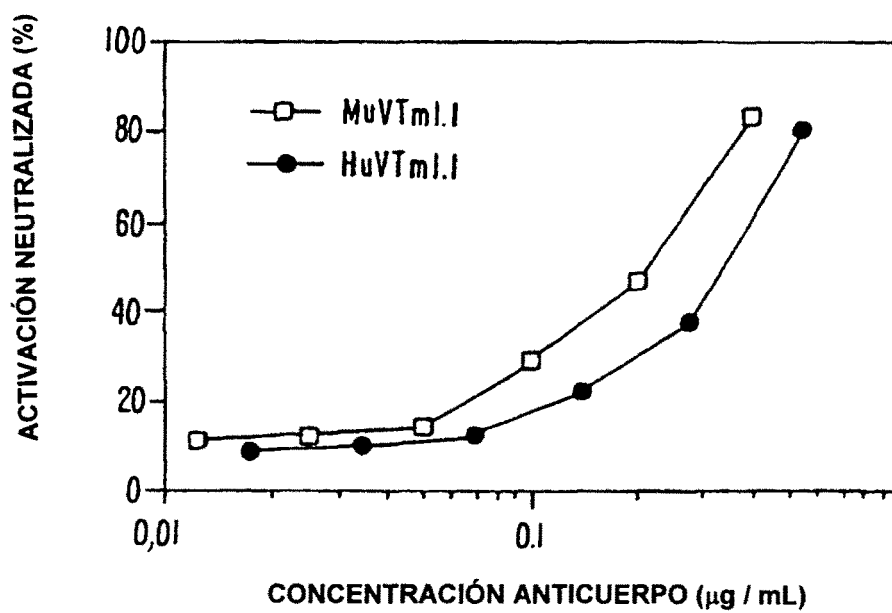


FIG. 5.

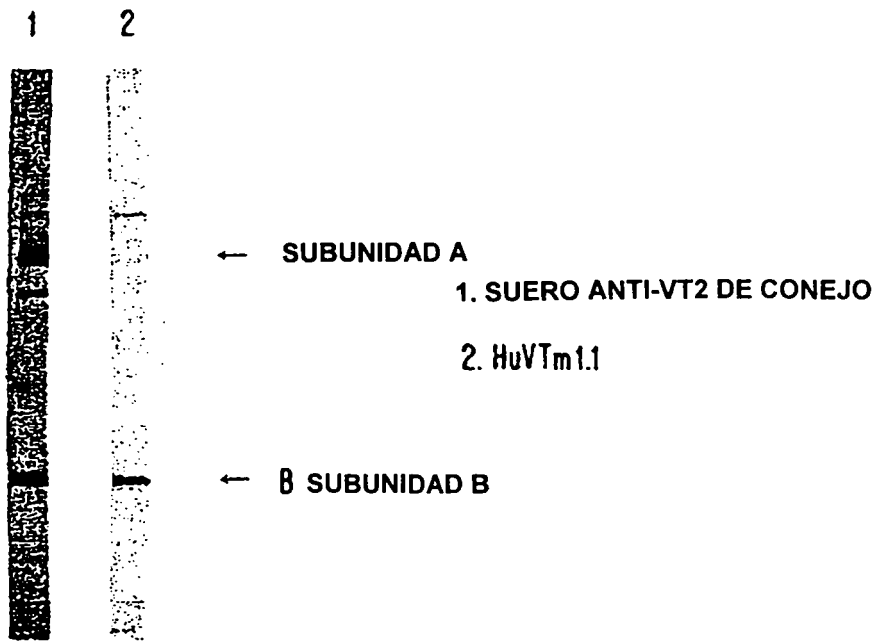


FIG. 6.

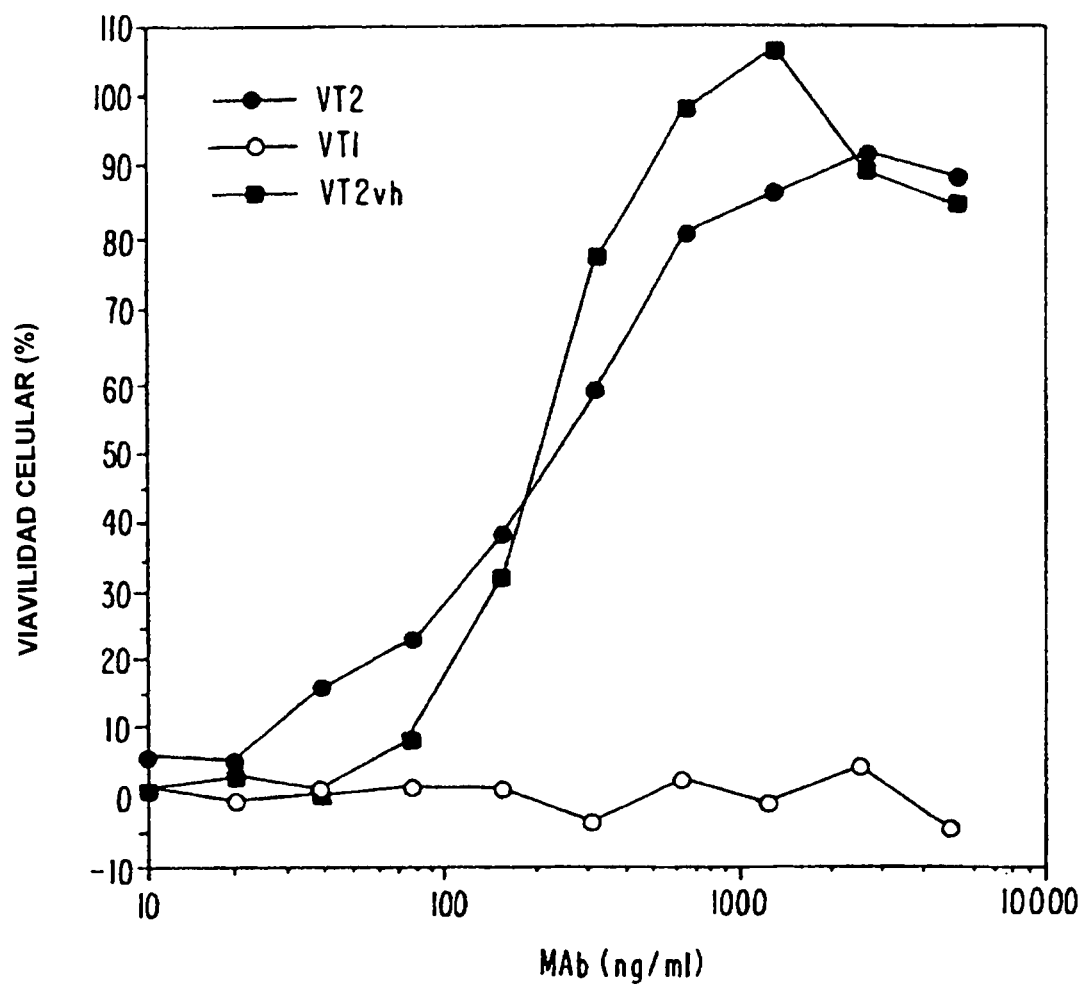


FIG. 7.

ES 2 270 598 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Matsumoto, Yoh-Ichi
Kimura, Tsuyoshi
Imaizumi, Atsuchi
Takedo, Tae
Co, May Sung
Vasquez, Maximiliano
10 TEIJIN LIMITED
- <120> ANTICUERPOS HUMANIZADOS QUE RECONOCEN LA VEROTOXINA II Y LÍNEA CELULAR QUE
LOS PRODUCE
- 15 <130> 019026-000100EP
- <140> EP 99 924395.9
<141> 1999-05-19
- 20 <150> WO 99/59629
<151> 1999-05-19
- 25 <150> US 60/086,570
<151> 1998-05-20
- <160> 8
- 30 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <270> 1
- 35 <211> 414
<212> ADN
<213> *Mus musculus*
- 40 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(414)
- 45 <220>
<223> Figura 1(A): Región variable de cadena pesada de anticuerpo de ratón VTm1.1 (MuVTm1.1)
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 270 598 T3

<400> 2

```

5      Met Asn Phe Val Leu Ser Ser Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
      1          5          10          15
      Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
      20          25          30
10     Pro Gly Gly Pro Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
      35          40          45
      Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
      50          55          60
15     Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
      65          70          75          80
      Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
      85          90          95
20     Ala Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile
      100         105         110
25     Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Asp Ala Trp Gly Asn Leu Asp Tyr Trp
      115         120         125
      Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
      130         135

```

30

<210> 3

<211> 381

<212> ADN

35

<213> *Mus musculus*

<220>

40

<221> CDS

<222> (1)..(381)

<220>

45

<223> Figura 1(B): Región variable de cadena ligera de anticuerpo de ratón VTm1.1 (MuVTm1.1)

50

55

60

65

ES 2 270 598 T3

<400> 3

```

5      atg gtt ttc aca cct cag ata ctt gga ctt atg ctt ttt tgg att tca   48
      Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser
        1                    5                      10                15

10     gcc tcc aga ggt gat gtt gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg tct   96
      Ala Ser Arg Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
                    20                      25                30

15     gtg act cca gga gat agc gtc agt ctt tcc tgc agg gcc agt caa act   144
      Val Thr Pro Gly Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr
                    35                      40                45

20     att agc aac aac cta cac tgg tat caa cac aaa tca cat gag tct cca   192
      Ile Ser Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln His Lys Ser His Glu Ser Pro
                    50                      55                60

25     agg ctt ctc atc aag tct gct tcc cag tcc atc tct ggg atc ccc tcc   240
      Arg Leu Leu Ile Lys Ser Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
                    65                      70                75                80

30     agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc act ctc agt atc aac   288
      Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
                    85                      90                95

35     agt gtg gaa act gaa gat ttt gga atg tat ttc tgt caa cag agt tac   336
      Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr
                    100                      105                110

40     agc tgg ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa   381
      Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
                    115                      120                125

```

<210> 4

<211> 127

40 <212> PRT

<213> *Mus Musculus*

<220>

45 <223> Figura 1(B): Región variable de cadena ligera de anticuerpo de ratón VTm1.1 (MuVTm1.1)

<400> 4

```

50     Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser
        1                    5                      10                15

55     Ala Ser Arg Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
                    20                      25                30

60     Val Thr Pro Gly Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr
                    35                      40                45

```

65

ES 2 270 598 T3

```

Ile Ser Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln His Lys Ser His Glu Ser Pro
   50                               55                               60
5  Arg Leu Leu Ile Lys Ser Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
   65                               70                               75                               80
    Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
                               85                               90                               95
10 Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr
                               100                               105                               110
    Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
                               115                               120                               125
15

```

<210> 5

<211> 414

20 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(414)

<220>

30 <223> Figura 2(A): Región variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado VTm1.1 (HuVTm1.1)

<400> 5

```

35  atg aac ttt gtg ctc agc tcg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa gga 48
    Met Asn Phe Val Leu Ser Ser Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
       1                               5                               10                               15
    gtc cag tgt gaa gtg caa ctg gtg gag tcg ggg gga ggc tta gtg cag 96
    Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
                               20                               25                               30
    cct gga ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc 144
    Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
                               35                               40                               45
45  agt agt tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag gct ccg ggt aag ggt ctg 192
    Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
       50                               55                               60
    gag tgg gtc gca acc att agt act ggt ggt agt tac acc tac tac cca 240
    Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
       65                               70                               75                               80
    gac agt gtg aag ggt cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288
    Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
                               85                               90                               95
    acc ctg tat ctg caa atg aac agt ctg agg gct gag gac acg gcc gta 336
    Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
                               100                               105                               110
60  tat tac tgt gca aga cgg ggg gac gca tgg ggt aac ttg gac tac tgg 384
    Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Asp Ala Trp Gly Asn Leu Asp Tyr Trp
                               115                               120                               125
65  ggt caa gga acc tta gtc acc gtc tcc tca 414
    Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
       130                               135

```

ES 2 270 598 T3

<210> 6

<211> 138

<212> PRT

5 <213> *Mus Musculus*

<220>

10 <223> Figura 2(A): Región variable de cadena pesada de anticuerpo humanizado VTm1.1 (HuVTm1-1)

<400> 6

```

15      Met Asn Phe Val Leu Ser Ser Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
        1          5          10          15
      Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
        20          25          30
20      Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
        35          40          45
      Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
        50          55          60
25      Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
        65          70          75
      Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
        85          90          95
30      Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
        100          105          110
35      Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Asp Ala Trp Gly Asn Leu Asp Tyr Trp
        115          120          125
40      Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        130          135

```

<210> 7

<211> 381

45 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

50 <221> CDS

<222> (1)..(381)

<220>

55 <223> Figura 2(B): Región variable de cadena ligera de anticuerpo humanizado VT,1.1 (HuVTm1.1)

60

65

ES 2 270 598 T3

<400> 8

5 Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 10 Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr
 35 40 45
 Ile Ser Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 15 Arg Leu Leu Ile Lys Ser Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 20
 Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr
 100 105 110
 25 Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65