



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 105**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01) **C12N 5/12** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) **C12N 15/79** (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) **A61K 39/40** (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) **G01N 33/577** (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01) **C12Q 1/68** (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03010836 .9**

96 Fecha de presentación : **14.05.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1479695**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.2004**

54

Título: **Anticuerpo monoclonal humano específico para lipopolisacáridos (LPS) de serotipo IATS O6 *Pseudomonas aeruginosa*.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.05.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.05.2010

73

Titular/es: **Kenta Biotech AG.**
Rehhagstrasse 79
3018 Bern, CH

72

Inventor/es: **Lang, Alois B.;**
Horn, Michael P. y
Imboden, Martin A.

74

Agente: **Miltényi, Peter**

ES 2 338 105 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal humano específico para lipopolisacáridos (LPS) de serotipo IATS O6 de *Pseudomonas aeruginosa*.

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humano específico para el serotipo IATS O6 de *P. aeruginosa*, un hibridoma que lo produce, ácidos nucleicos que lo codifican y células huésped transfectadas con los mismos. Además, la presente invención se refiere a métodos para producir dicho anticuerpo monoclonal. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo o al menos un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo.

Las enfermedades infecciosas emergieron drásticamente durante las últimas décadas. Las enfermedades infecciosas, incluyendo las infecciones respiratorias, son una de las principales causas de enfermedad en el mundo. En 1998, las enfermedades infecciosas se cobraron 16 millones de vidas y se clasificaron como la segunda causa principal de muerte en el mundo. Uno de los mayores problemas son las infecciones intrahospitalarias o nosocomiales. Tales infecciones han aumentado desde 7,2/1000 días de paciente en 1975 hasta 9,8/1000 días de paciente en 1995, un aumento del 36%. Junto con *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) y enterococos resistentes a vancomicina (ERV), *P. aeruginosa* es responsable de hasta el 34% de todas las infecciones intrahospitalarias. Las principales víctimas de las infecciones por *P. aeruginosa* son pacientes de fibrosis quística, víctimas de quemaduras, pacientes entubados, pacientes en las unidades de cuidados intensivos, pacientes de cáncer y SIDA, así como pacientes inmunosuprimidos que se han sometido a trasplante de órganos.

Para la prevención de infecciones crónicas por *P. aeruginosa* en pacientes de fibrosis quística, se ha establecido una vacuna octavalente conjugada que consiste en los 8 serotipos de LPS más relevantes de *P. aeruginosa* acoplados a toxina A detoxificada de *P. aeruginosa* para la inmunización activa. Los estudios a largo plazo con esta vacuna han mostrado que la proporción de pacientes infectados de forma crónica cayó desde alrededor del 72% hasta el 32% a la edad de 18 años. Sin embargo, la vacunación activa solo es posible en pacientes inmunocompetentes, así como en situaciones previsibles. De esta manera, la mayoría de las víctimas de *P. aeruginosa* no se pueden inmunizar activamente con la vacuna octavalente. Debido a esto y debido al hecho de que la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* son multirresistentes, existe una necesidad de una herramienta terapéutica alternativa para tratar a los pacientes infectados con *P. aeruginosa*. Un intento es crear anticuerpos monoclonales humanos basados en la tecnología de hibridomas o usando clonación de repertorio por presentación en fagos.

Ambos métodos y los anticuerpos creados mediante los mismos muestran serios inconvenientes.

La tecnología del hibridoma se basa en la inducción de células B murinas de la especificidad deseada mediante inmunización con un antígeno de elección e immortalización mediante fusión con un compañero de mieloma, que es el planteamiento clásico de "Kohler y Milstein". Después de ello, la información genética de un clon productor de anticuerpo se puede volver a clonar y humanizar, bien mediante injerto de CDR o mediante la tecnología de presentación en fago.

Se sabe que los anticuerpos monoclonales murinos dirigidos contra LPS bacteriano reconocen epítomos diferentes que los anticuerpos humanos. Por lo tanto, la generación de anticuerpos monoclonales en ratones seguida por humanización no produciría necesariamente el aislamiento de anticuerpos con la especificidad de interés para su uso en seres humanos. Ha habido diferentes intentos de generar anticuerpos monoclonales humanos contra grupos de LPS de *P. aeruginosa*. Sin embargo, muchos de ellos carecen de funciones efectoras y por lo tanto no eran protectores.

US-4834975 por Siadak *et al.*, divulga un anticuerpo monoclonal humano C5B7 que es específico para LPS del inmunitipo 1 de Fisher de *P. aeruginosa* (correspondiente a IATS O6). Dicho anticuerpo tiene propiedades opsonofagocíticas y protege ratones *in vivo* a una dosis de 50 µg.

Según esto, un problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal humano específico para LPS de un serotipo particular de *P. aeruginosa* en donde el anticuerpo muestra gran capacidad de protección, en particular *in vivo*.

El problema técnico se resuelve mediante los anticuerpos monoclonales humanos como se definen a continuación.

Según la presente invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal humano específico para LPS del serotipo IATS O6 de *P. aeruginosa* en donde la región variable de la cadena ligera del anticuerpo comprende SEQ ID NO:1 en la región CDR1, SEQ ID NO:2 en la región CDR2 y SEQ ID NO:3 en la región CDR3, y en donde la región variable de la cadena pesada del anticuerpo comprende SEQ ID NO:4 en la región CDR1, SEQ ID NO:5 en la región CDR2 y SEQ ID NO:6 en la región CDR3; o un fragmento o derivado del mismo capaz de unirse a dicho LPS.

La presente invención proporciona además un hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal y los ácidos nucleicos que codifican la cadena ligera y pesada del anticuerpo, respectivamente. Además, la presente invención proporciona vectores y células huésped, que comprenden el ácido nucleico. Además, se proporcionan métodos para producir los anticuerpos monoclonales. Además, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo y/o al menos un ácido nucleico, y segundos usos médicos de las mismas.

ES 2 338 105 T3

Sorprendentemente, se ha determinado que los anticuerpos monoclonales humanos según la invención muestran gran capacidad de protección. En particular, se demostró que el anticuerpo monoclonal humano era opsonofagocítico *in vitro*. Incluso más importante, los anticuerpos monoclonales según la presente invención muestran capacidad de protección *in vivo* determinada por la protección a septicemia en el modelo murino de heridas por quemadura como se muestra en los ejemplos.

Según la presente invención el anticuerpo es específico para el LPS del serotipo IATS O6 de *P. aeruginosa* y muestra un valor de opsonofagocitosis determinado usando bacterias conjugadas a fluorescencia de menos de 0,01 $\mu\text{g/ml}$. No se ha descrito ningún anticuerpo en la técnica anterior que muestre actividad opsonofagocítica.

Al contrario que los anticuerpos del estado de la técnica, el anticuerpo monoclonal según la presente invención reconoce aislados clínicos con gran especificidad. Se identificaron 38 de 38 muestras de pacientes infectados con *P. aeruginosa* del serotipo IATS O6 usando este anticuerpo. Sin estar vinculados a ninguna teoría, se asume que el anticuerpo monoclonal es capaz de reconocer cada uno de los subtipos de IATS O6 conocidos en técnica anterior. Esta propiedad hace el anticuerpo particularmente útil para el diagnóstico y la terapia. De esta manera, el anticuerpo según la presente invención muestra una fiabilidad insuperable.

El término “anticuerpo monoclonal humano” como se usa aquí abarca cualquier anticuerpo monoclonal humano parcial o total independientemente de la fuente de la que obtiene el anticuerpo monoclonal. Se prefiere la producción del anticuerpo monoclonal humano por un hibridoma. También se puede obtener el anticuerpo monoclonal mediante ingeniería genética y en particular injerto de CDR de los segmentos CDR como se define en las reivindicaciones en anticuerpos monoclonales disponibles cambiando las regiones CDR del anticuerpo base con los segmentos CDR específicos como se define en las reivindicaciones.

El término “región CDR” significa la región determinante de complementariedad de un anticuerpo, es decir, la región que determina la especificidad de un anticuerpo por un antígeno particular. Tres regiones CDR (CDR1 a CDR3) son responsables de la unión al antígeno en la cadena pesada.

Las posiciones de las regiones CDR en la cadena pesada son como sigue:

Región CDR1, aminoácidos 31 a 35 en el exón V_H

Región CDR2, aminoácidos 50 a 65 en el exón V_H

Región CDR3, aminoácidos 95 y siguientes en el exón V_H

Las posiciones de las regiones CDR son independientes de la clase de anticuerpo, es decir, IgM, IgA o IgG.

Las posiciones de las regiones CDR en la cadena ligera kappa son como sigue:

Región CDR1, aminoácidos 24 a 34 en el exón V_K

Región CDR2, aminoácidos 50 a 56 en el exón V_K

Región CDR3, aminoácidos 89 y siguientes en el exón V_K

Las posiciones de la región CDR en la cadena ligera lambda son como sigue:

Región CDR1, aminoácidos 23 a 36 en el exón V_L

Región CDR2, aminoácidos 49 a 60 en el exón V_L

Región CDR3, aminoácidos 88 y siguientes en el exón V_L

Los alineamientos de aminoácidos en los exones V_H , V_K y V_L se pueden obtener del índice Vbase (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase-ok.php?menu=901>).

El término “serotipo” significa cualquier serotipo conocido de *P. aeruginosa*. Se muestra una tabla de concordancia de las diferentes nomenclaturas actualmente usadas para los diferentes serotipos de *P. aeruginosa* en la tabla I de la especificación.

El término “fragmento” significa un fragmento Fab o $F(ab')_2$ o una mezcla de los mismos.

ES 2 338 105 T3

El término “derivado” abarca una muteína del anticuerpo monoclonal humano en donde la muteína lleva al menos una sustitución conservadora en cualquiera de las CDR en la cadena pesada y/o la cadena ligera como se indica en las reivindicaciones. Más preferiblemente, la muteína no tiene más de 5, particularmente preferido no más de 2 sustituciones conservadoras. La capacidad del fragmento o derivado del anticuerpo de unirse al serotipo particular de LPS se determina mediante ELISA directo como se describe en la sección de materiales y métodos: el LPS particular se inmoviliza en la fase sólida de las placas de ELISA. Los fragmentos de anticuerpos o derivados de anticuerpos se incuban con el LPS inmovilizado, y los anticuerpos o derivados de los mismos unidos se visualizan mediante un anticuerpo secundario adecuado conjugado con una enzima.

Según la presente invención, el término “sustitución conservadora” significa un cambio de un aminoácido que pertenece a un grupo físico-químico particular con un aminoácido que pertenece al mismo grupo físico-químico. Los grupos físico-químicos se definen como sigue:

El grupo de los aminoácidos no polares comprende: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina y triptófano. El grupo de los aminoácidos que tienen cadenas laterales polares sin carga comprende asparraguina, glutamina, tirosina, cisteína y cistina. El grupo físico-químico de los aminoácidos que tienen una cadena lateral polar cargada positivamente comprende lisina, arginina e histidina. El grupo físico-químico de aminoácidos que tienen una cadena lateral polar cargada negativamente comprende ácido aspártico y ácido glutámico, también denominados aspartato y glutamato.

Según la presente invención, se proporciona un anticuerpo específico para LPS del serotipo IATS O6 de *P. aeruginosa* como se ha explicado anteriormente.

Según una forma de realización adicional la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano específico para LPS o el LPS del serotipo IATS O6 de *P. aeruginosa* en donde

la región variable de la cadena ligera del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y la región variable de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; o una variante de dicho anticuerpo capaz de unirse a dicho LPS en donde la región variable de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo es al menos el 85% homóloga a SEQ ID NO:7 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo es al menos el 85% homóloga a SEQ ID NO:8.

El término “homología” conocido para el experto en la materia designa el grado de relación entre dos o más moléculas de polipéptidos, que se determina mediante la conformidad entre las secuencias. El porcentaje de “homología” se determina del porcentaje de regiones homólogas en dos o más secuencias, teniendo en cuenta las brechas u otras características de secuencia.

La homología de polipéptidos mutuamente relacionados se puede determinar por medio de procedimientos conocidos. Como regla, se usan programas especiales de ordenador con algoritmos que consideran los requerimientos especiales. Los procedimientos preferidos para la determinación de la homología en primer lugar generan la mayor conformidad entre las secuencias estudiadas. Los programas informáticos para la determinación de la homología entre dos secuencias incluyen, pero no están limitados al paquete de programas de CGC, incluyendo GAP (Devereux J et al., Nucleic Acids Research 12 (12): 387 (1984); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison (WI); BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul S et al., J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990)). El programa BLAST X se puede obtener del Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI) y de otras fuentes (BLAST Handbook, Altschul S et al., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul S et al., J. Mol. 215: 403-410 (1990)). También se puede usar el muy conocido algoritmo de Smith Waterman para la determinación de homología.

Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48 (1970), 443-453

Matriz de comparación: BLOSUM62 de Henikoff & Henikoff, PNAS USA 89 (1992), 10915-10919

Penalización por brecha: 12

Penalización por longitud de brecha: 2

El programa GAP también es adecuado para su uso con los parámetros anteriores. Los parámetros anteriores son los parámetros estándar (parámetros por defecto) para comparaciones de secuencias de aminoácidos, en los que las brechas en los extremos no disminuyen el valor de homología. Con secuencias muy pequeñas comparadas a la secuencia de referencia, puede ser necesario además aumentar el valor de expectativa hasta 100.000 y en algunos casos reducir la longitud de palabra (tamaño de palabra) hasta 2.

Se pueden usar algoritmos modelo, penalizaciones por brecha abierta, penalizaciones por extensión de brecha y matrices de comparación adicionales incluyendo aquellos nombrados en el manual del programa, Wisconsin Package,

ES 2 338 105 T3

Versión 9, Septiembre 1997. La elección dependerá de la comparación a realizarse y además de si la comparación se realiza entre pares de secuencias, donde se prefieren GAP o Best Fit, o entre una secuencia y una gran base de datos de secuencias, donde se prefieren FASTA o BLAST.

- 5 Una conformidad del 85% determinada con los algoritmos anteriormente mencionados se describe como una homología del 85%. Lo mismo se aplica para grados de homología mayores.

En la forma de realización preferida, las muteínas según la invención tienen una homología de más del 95%.

- 10 Se prefiere además que la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano según la presente invención sea de tipo kappa o lambda. Particularmente preferido, la cadena ligera es de tipo kappa. La cadena ligera puede ser bien una cadena natural incluyendo una cadena ligera reorganizada de forma natural, genéticamente modificada o de tipo sintético. Si el anticuerpo según la presente invención que es específico para IATS O6 es de tipo kappa, entonces se prefiere que la cadena ligera derive de la línea germinal L12a (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/VSEQ.php#L12a/PCRdil6-5+>).

- 15 Según una forma de realización preferida adicional, la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano de la presente invención se selecciona de todos los isotipos humanos, es decir, IgM, IgA o IgG. Preferiblemente, la cadena pesada es del tipo IgM. Si el anticuerpo es del tipo IgM, entonces muestra las propiedades ventajosas de gran avidez por LPS de *P. aeruginosa*, una de forma eficaz el complemento y de esta manera media la muerte directa de las bacterias y/o opsoniza eficazmente bacterias para fagocitosis. Además, IgM es resistente a la degradación proteolítica por elastasa de *P. aeruginosa*, mientras que otros isotipos como IgG o IgA se pueden degradar. Los anticuerpos IgM son eficaces en cantidades bajas. De 1 a 4 μg por ratón fueron completamente protectores en el modelo murino de septicemia por quemadura.

- 25 Se prefiere que la cadena pesada variable derive de la línea germinal DP-75 (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/VSEQ.php#DP-75/V1-2...+>).

La cadena ligera y la cadena pesada pueden estar unidas covalentemente como un anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, scFv bivalente, scFv bifuncional y scFv biespecífico) o unidas de forma no covalente entre sí.

- 30 Según una forma de realización preferida de la presente invención, el anticuerpo monoclonal humano es de secuencia de aminoácidos completamente humana.

- 35 “Consiste completamente en secuencia de aminoácidos humana” significa que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal humano deriva de una línea germinal humana. Esto se puede obtener de diferentes modos. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humano que consiste en secuencias humanas de aminoácidos se puede obtener de un hibridoma en donde la célula B es una célula B humana. De forma alternativa, el anticuerpo monoclonal humano se puede obtener mediante injerto de CDR de las regiones CDR como se indica en las reivindicaciones en anticuerpos monoclonales humanos disponibles produciendo de esta manera un anticuerpo monoclonal humano específico para un serotipo de LPS de *P. aeruginosa* según la presente invención.

La secuencia de aminoácidos completamente humana del anticuerpo monoclonal humano previene la aparición de efectos secundarios no deseados como reacciones de rechazo o choque anafiláctico.

- 45 Adicionalmente preferido, el anticuerpo monoclonal humano muestra reconocimiento esencialmente antigénico humano. “Reconocimiento esencialmente antigénico humano” significa que el reconocimiento antigénico por el anticuerpo monoclonal humano según la presente invención es esencialmente idéntico al reconocimiento de antígeno por un individuo humano sano. En particular, se requiere que las partes Fc de la cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal humano sean de tipo humano para asegurar la interacción con el sistema del complemento humano y para reducir el riesgo de generación de los denominados HAMA (anticuerpos humanos anti-ratón).

Según una forma de realización preferida adicional, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención se puede obtener a partir de una célula B humana o un hibridoma obtenido mediante fusión de dicha célula B humana con una célula de mieloma o heteromiéloma.

- 55 Las células B humanas se pueden obtener mediante inmunización de individuos sanos o pacientes y posterior recogida de muestras de sangre de las que se pueden aislar células B de una manera conocida (Current Protocols in Immunology. Capítulo 7.1. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. Publicado por Wiley & sons, Eds: JC Coligan *et al.*). La célula B humana se puede fusionar con un mieloma o heteromiéloma para producir un hibridoma según técnicas conocidas según el planteamiento clásico de Kohler y Milstein. Las células de mieloma adecuadas son derivados de P3X63 tales como P3X63Ag8.653 (ATCC CRL-1580) o SP2/0 (ATCC CRL-1646). Las células de heteromiéloma adecuadas son por ejemplo, F3B6 (ATCC HB-8785). El hibridoma resultante se puede seleccionar según procedimientos conocidos. Los hibridomas se cultivan en un medio de cultivo adecuado y el anticuerpo producido se recupera del sobrenadante.

- 65 Además, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente, del anticuerpo monoclonal humano de la presente invención. El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico natural derivado de la línea germinal o de reorganización que se produce en células B, de forma alternativa los

ácidos nucleicos pueden ser sintéticos. Los ácidos nucleicos sintéticos también incluyen ácidos nucleicos que tienen modificados los enlaces internucleósidos incluyendo fosfotioéster para aumentar la resistencia de los ácidos nucleicos a la degradación. El ácido nucleico puede estar manipulado genéticamente o producido sintéticamente por completo mediante síntesis de nucleótidos.

5 La presente invención proporciona además vectores que comprenden al menos un ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano de la presente invención y/o al menos un ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano de la presente invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en el mismo vector o pueden estar presentes en forma de vectores binarios. El vector preferiblemente comprende el promotor unido operativamente al ácido nucleico para facilitar la expresión del ácido nucleico que codifica la cadena ligera y/o pesada. Preferiblemente, el vector también incluye un origen para la replicación y mantenimiento en una célula huésped. El vector también puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal localizada 5' del ácido nucleico que codifica la cadena ligera o la cadena pesada. La secuencia señal puede facilitar la secreción al medio de la cadena codificada.

15 Preferiblemente, el vector deriva de adenovirus, virus de la vacuna, baculovirus, virus SV40, retrovirus, virus de plantas o bacteriófagos tales como derivados de lambda o M13. El vector particularmente preferido es un vector que contiene las regiones constantes de las cadenas pesadas de las Ig humanas y cadenas ligeras humanas, tal como el sistema de vector integrado para expresión eucariota de inmunoglobulinas descrito por Persic y col. (Persic *et al.* 20 1997. *Gene*. 187(1): 9-18).

El vector puede comprender además una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta His que produce la expresión de una construcción para producir un producto de fusión con una etiqueta His en el extremo N-terminal de la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo monoclonal humano que facilita la purificación de la proteína en una columna de níquel mediante formación de quelatos.

Además, la presente invención proporciona células huésped que comprenden el vector y/o el ácido nucleico adecuadas para la expresión del vector. En la técnica se conocen numerosos sistemas de expresión procariotas y eucariotas en donde se prefieren células huésped eucariotas tales como células de levadura, células de insecto, células vegetales y células de mamífero tales como células HEK293, células PerC6, células CHO, células COS o células HELA y derivados de las mismas. Particularmente preferidas son líneas celulares de producción humana. Se prefiere que las células huésped transfectadas secreten el anticuerpo producido al medio de cultivo. Si se alcanza expresión intracelular, se realiza renaturalización según procedimientos estándar tales como por ejemplo, Benetti PH *et al.*, *Protein Expr Purif* Agosto; 13:283-290, (1998).

35 La presente invención también proporciona métodos para producir el anticuerpo monoclonal humano. En una forma de realización, el anticuerpo monoclonal humano se produce cultivando el hibridoma descrito anteriormente. El anticuerpo monoclonal producido se secreta al sobrenadante y se puede purificar a partir del mismo aplicando técnicas cromatográficas convencionales.

40 De forma alternativa, el anticuerpo monoclonal humano es producido por la célula huésped que comprende un vector según la presente invención y cultivando la célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión recombinante de la cadena de anticuerpo codificada. Preferiblemente, la célula huésped comprende al menos un ácido nucleico que codifica la cadena ligera y al menos un ácido nucleico que codifica la cadena pesada y es capaz de ensamblar el anticuerpo monoclonal humano de modo que se genera una estructura tridimensional que es equivalente a la estructura tridimensional de un anticuerpo monoclonal humano producido por una célula B humana. Si la cadena ligera se produce por separado de la cadena pesada, entonces ambas cadenas se pueden purificar y posteriormente ensamblar para producir un anticuerpo monoclonal humano que tiene esencialmente la estructura tridimensional de un anticuerpo monoclonal humano producido por una célula B humana.

50 El anticuerpo monoclonal humano también se puede obtener mediante expresión recombinante de la cadena ligera y/o pesada codificada en donde el ácido nucleico se produce mediante el aislamiento de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal humano de una manera conocida y el injerto de la secuencia de ácido nucleico que codifica las CDR como se define en las reivindicaciones en el ácido nucleico aislado.

55 Según una forma de realización preferida adicional, el anticuerpo monoclonal humano según la presente invención está modificado. Las modificaciones incluyen di-, oligo- o polimerización de la forma monomérica, por ejemplo mediante entrecruzamiento usando dicitclohexilcarbodiimida. Los di-, oligo- o polímeros producidos de esta manera se pueden separar mediante filtración en gel. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones de la cadena lateral, por ejemplo modificaciones de los residuos de ϵ -amino-lisina o modificaciones de los extremos amino y carboxi terminales, respectivamente. Modificaciones adicionales incluyen modificaciones postraduccionales, por ejemplo, glicosilación y/o desglicosilación parcial o total de la proteína y formación de puentes disulfuro. El anticuerpo también se puede conjugar a un marcador, tal como un marcador enzimático, fluorescente o radioactivo.

65 La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo monoclonal humano y/o al menos un ácido nucleico que codifica una cadena ligera y/o pesada del anticuerpo monoclonal humano.

ES 2 338 105 T3

La composición farmacéutica puede comprender además ingredientes farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se aplican para el tratamiento de enfermedades producidas por *P. aeruginosa* en infecciones tales como septicemia, bronquitis crónica, infecciones locales, principalmente en paciente inmunodeprimidos y/o en pacientes con función respiratoria deteriorada. Las composiciones farmacéuticas están pensadas además para la profilaxis y/o tratamiento de infecciones intrahospitalarias (nocosomiales). Puesto que las víctimas principales de infecciones por *P. aeruginosa* son pacientes de fibrosis quística, víctimas de quemaduras, pacientes entubados, pacientes en unidades quirúrgicas y/o de cuidados intensivos, pacientes de cáncer y SIDA, pacientes inmunodeprimidos, pacientes inmunosuprimidos, pacientes diabéticos, así como adictos a drogas intravenosas, las composiciones farmacéuticas están pensadas en particular para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades causadas por *P. aeruginosa* en dicho grupo de pacientes.

La composición farmacéutica puede comprender además fármacos antibióticos, preferiblemente acoplados al nuevo anticuerpo monoclonal.

Las composiciones farmacéuticas comprenden el nuevo anticuerpo monoclonal en un rango de concentración de 0,5-8 mg/kg de peso corporal.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de cualquier forma conocida tales como administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, tópica, intranasal o como un nebulizador de inhalación.

La presente invención también proporciona un kit de prueba para el diagnóstico de infecciones por *P. aeruginosa* que comprende al menos un anticuerpo monoclonal humano de la presente invención y opcionalmente ingredientes adecuados adicionales para llevar a cabo la prueba de diagnóstico.

El kit de prueba es adecuado para el diagnóstico fiable específico de una infección por *P. aeruginosa*. Un ensayo de prueba se puede basar en una prueba ELISA convencional en forma líquida o unida a membrana. La detección puede ser directa o indirecta como se conoce en la técnica en donde el anticuerpo se conjuga opcionalmente a un marcador enzimático, fluorescente o radiactivo.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención pero no se pretende que limiten el ámbito de la presente invención. Formas de realización adicionales serán evidentes para el experto en la materia al estudiar la especificación y teniendo en cuenta el conocimiento general normal.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 se refiere a la secuencia de ADN y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 310BO6.

La figura 2 se refiere a la secuencia de ADN y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa de 310BO6.

La figura 3 se refiere al análisis por inmunotransferencia de la especificidad de serotipo del anticuerpo monoclonal 310BO6. La figura 3a muestra una tinción con plata de LPS de diferentes serotipos separados en SDS PAGE. La figura 3b muestra un análisis de inmunotransferencia de LPS de diferentes serotipos separados en SDS PAGE usando el anticuerpo monoclonal 310BO6.

La figura 4 se refiere al patrón de reconocimiento de aislados clínicos de *P. aeruginosa* del serotipo IATS O6 por el anticuerpo monoclonal 310BO6 en comparación con otro anticuerpo monoclonal específico para IATS O6.

La figura 5 se refiere a la actividad opsonofagocítica del anticuerpo monoclonal 310BO6 dirigido contra el serotipo IATS O6 de *P. aeruginosa*.

Materiales y métodos

Los siguientes materiales y métodos se han usados en los ejemplos 1 a 4:

Determinación de la especificidad a LPS y cuantificación de IgM en el sobrenadante celular

Para el cribado y análisis de anticuerpos en sobrenadantes de cultivos celulares, se realizó un ELISA como se ha descrito en otra parte (Cryz, S.J. *et al.*, 1987. J. Clin. Invest. 80(1):51-56) con algunos cambios. Brevemente, se prepararon soluciones madre de LPS, lipopolisacárido de *P. aeruginosa* (producido internamente) a una concentración de 2 mg/ml en trietilamina 36 mM. Para el recubrimiento, la solución se diluyó a 10 µg/ml en PBS que contenía azida de sodio al 0,02% (PBS-Az). Esta solución se mezcló con un volumen igual de seroalbúmina humana metilada a 10 µg/ml (HSA; producida internamente como sigue: se disolvieron 2 g de HSA liofilizada en 200 ml de metanol

ES 2 338 105 T3

absoluto. Después de añadir 1,68 ml de HCl al 37%, la solución se almacenó durante al menos 3 días a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación ocasional. El precipitado se recoge mediante una centrifugación de 10 minutos (4500 rpm, rotor GS1), y se lava dos veces con metanol absoluto y dos veces con éter anhídrido resuspendiendo el precipitado en el disolvente. El precipitado se seca durante 2 horas en un desecador y el precipitado seco se resuspende en H₂O y se almacena en alícuotas a -20°C. La concentración de proteína fue de 0,85 mg/ml en PBS-Az agitando suavemente durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se recubrieron placas de ELISA de NUNC® con la solución LPS-HSA a 100 µl/pocillo durante la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas 3 veces con 300 µl de PBS a pH 7,4 (producido internamente) que contenía Tween20 al 0,05% (#93773; Fluka Chemie AG, Suiza) (PBS-T), se incubaron los sobrenadantes de cultivos celulares diluidos 1:2 en PBS durante 2 horas a 37°C. Después de lavar las placas 3 veces con PBS-T, los anticuerpos unidos se detectaron con anticuerpo de cabra anti-IgM humano conjugado a peroxidasa de rábano (# 074-1003; KPL; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. Gaithersburg, MD) diluido 1:2000 en PBS que contenía SFT al 5% (v/v). Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C y se lavaron 3 veces con PBS-T. La unión del anticuerpo se visualizó añadiendo 100 µl/pocillo de OPD (ortofenildiamina 0,4 mg/ml en ácido cítrico 24 mM e hidrogenofosfato de sodio 52 mM que contenía solución sustrato de H₂O₂ al 0,0012% (V/V). La reacción de color se paró después de 2-3 minutos mediante la adición de 50 µl/pocillo de HCl 1 M. La densidad óptica se leyó en un lector de ELISA a 490 nm usando el software Softmax Pro®.

Para la cuantificación de IgM en los sobrenadantes de cultivos celulares, las placas de ELISA se recubrieron con anticuerpo de cabra anti-IgM humano sin conjugar a 1 µg/ml en PBS durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-T y se incubaron los sobrenadantes celulares y los estándares en diluciones de dos veces. Como estándar se usó suero humano estándar (Behring) empezando a una concentración de 0,5 µg/ml. Todas las diluciones se hicieron en PBS-T. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en una mesa oscilante. Después de lavar las placas 3 veces con PBS-T, los anticuerpos unidos se detectaron con anticuerpo de cabra anti-IgM humano conjugado a peroxidasa de rábano (KPL) diluido 1:2000 en PBS que contenía SFT al 5% (v/v). Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en una mesa oscilante y se lavaron 3 veces con PBS-T. La unión de anticuerpo se visualizó añadiendo 150 µl/pocillo de solución sustrato OPD. La reacción de color se paró después de 1 minuto mediante adición de 50 µl/pocillo de HCl 1 M. La densidad óptica se leyó en un lector de ELISA a 490 nm usando software Softmax Pro®.

30 *Análisis de secuencias*

Se aisló ARN de células de hibridoma usando el kit RNeasy de Qiagen. Se sintetizó el ADNc con la tecnología SMART (Becton Dickenson). Para la PCR de la segunda hebra se usaron los siguientes cebadores (Tabla III): (1) IgM constante inverso (con µ): 5'-GCC ACG CTG CTC GTA TCC GAC G-3' (SEQ ID NO:11); (2) kappa constante inverso (con κ): 5'-AGC AGG CAC ACA ACA GAG GCA GTT CC-3' (SEQ ID NO:12). Los cebadores directos estaban incluidos en el kit SMART. Para la secuenciación se han usado los siguientes cebadores: (3) secuencia IgM (seq µ): 5'-GCT GCT CGT ATC CGA CGG-3' (SEQ ID NO:13) y (4) secuencia kappa (seq κ): 5'-CAC AAC AGA GGC AGT TCC-3' (SEQ ID NO:14). La secuenciación se realizó en Microsynth AG (Balgach, Suiza) y las secuencias se compararon con las secuencias de línea germinal existentes usando el software V-Base DNAplot (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase-ok.php?menu=901>).

45 *Análisis por inmunotransferencia*

Se cargaron LPS de diferentes serotipos (producidos internamente) (Tabla I) en un gel en gradiente de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras (gel preformado del 4-15%; BioRad). Después de la separación (15 mA/gel, 60 minutos), el gel se transfirió a filtros de nitrocelulosa y los sitios libres de unión se bloquearon con PBS que contenía SFT al 5% (V/V). La nitrocelulosa se incubó en sobrenadante celular sin diluir durante 2 horas a temperatura ambiente en una mesa oscilante. Después de lavar 3 veces en PBS-T y 2 veces en PBS, el filtro de nitrocelulosa se incubó con anticuerpo de cabra anti-IgM humano conjugado a fosfatasa alcalina diluido 1:500 en PBS que contenía SFT al 5% (V/V) durante 90 minutos a temperatura ambiente en una mesa oscilante. Después de lavar 3 veces en PBS-T y 2 veces en PBS, los anticuerpos unidos se visualizaron usando el sustrato de fosfatasa alcalina BCIP/NBT (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indoilo/nitrozolío) (KPL), y la reacción de color se paró después de 5 minutos con H₂O.

60

65

ES 2 338 105 T3

TABLA I

Serotipos IATS de cepas de referencia de P. aeruginosa

5	Serotipo IATS	Especificación
	O1	PA53 (IT4)
	O2	E576 (IT3)
10	O3	6510 (Habs3)
	O4	6511 (Habs4)
	O6	PA220 (IT1)
15	O7	Fisher 6 (IT6)
	O10	Fisher 5 (IT5)
	O11	Fisher 2 (IT2)
20	O16	Fisher 7 (IT7)

TABLA II

Aislados clínicos de serotipo IATS O6 de P. aeruginosa

30	# de aislado	fuente del aislado
	2310_15	fibrosis quística
35	2310_19	fibrosis quística
	2311_11	bronco-catéter
	V04 1297	infección vaginal
40	V05 1573	fibrosis quística
	V07 2215	catéter
	V07 2420	herida
45	V10 11941	herida
	V103328	trasplante de pulmón
	V10 9205	esputo
50	V12 3799	secreción traqueal

ELISA en células enteras

55 Se hicieron crecer bacterias de diferentes aislados clínicos (véase la tabla II) en medio de Luria a 37°C hasta una densidad óptica a 600 nm de 1, y se fijaron en formalina al 37% (concentración final de formalina: 0,5%) durante la noche a 37°C. Las bacterias fijadas se diluyeron 1:50 en PBS y se inmovilizaron en placas de ELISA. Después de
60 bloquear las placas con PBS que contenía suero fetal de ternera al 5% (v/v), se incubaron el anticuerpo monoclonal 310BO6 y otro anticuerpo monoclonal, ambos dirigidos contra el serotipo IATS O6 de *P. aeruginosa*, con las bacterias fijadas durante 2 horas a 37°C. Después de lavar las placas 3 veces con PBS-T, los anticuerpos unidos se detectaron con anticuerpo de cabra anti-IgM humano conjugado a peroxidasa de rábano (# 074-1003; KPL; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. Gaithersburg, MD) diluido 1:2000 en PBS que contenía SFT al 5% (v/v). Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C y se lavaron 3 veces con PBS-T. La unión de anticuerpo se visualizó añadiendo 100 µl/pocillo de
65 OPD (ortofenildiamina 0,4 mg/ml en ácido cítrico 24 mM e hidrogenofosfato de sodio 52 mM que contenía solución sustrato de H₂O₂ al 0,0012% (V/V). La reacción de color se paró después de 2-3 minutos mediante la adición de 50 µl/pocillo de HCl 1 M. La densidad óptica se leyó en un lector de ELISA a 490 nm usando software Softmax Pro®.

ES 2 338 105 T3

Ensayo de opsonofagocitosis

Para determinar la actividad biológica, se ensayó la actividad opsonofagocítica de los anticuerpos monoclonales anti-LPS de *P. aeruginosa*. Para este fin, se hicieron crecer bacterias de *P. aeruginosa*, del serotipo IATS O6, según la tabla 1, en medio TSBG (medio tríptico de soja 30 g/l que contenía glucosa al 1% (peso/volumen)) durante la noche. Después de lavar dos veces las bacterias con PBS frío, el precipitado bacteriano se resuspendió en 5 ml de tampón bicarbonato 0,1 M, pH 8,0. Se añadieron 50 μ l de éster succinimidílico de 5-(y -6)-carboxifluoresceína (5(6)-FAM, SE; Molecular Probes, Eugene, OR; 10 mg/ml en dimetilsulfóxido), y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Las bacterias se fijaron mediante adición de 100 μ l de formaldehído al 37% e incubación durante la noche a 37°C. Para eliminar el colorante no conjugado, las bacterias se lavaron 6 veces mediante centrifugación y resuspensión en 20 ml de PBS estéril frío. Las bacterias marcadas se almacenaron a 4°C hasta su uso. Para el ensayo, se diluyó una alícuota de las bacterias hasta una densidad óptica a 550 nm de 1, seguido por una dilución 1:50 en HBSS-BSA (solución equilibrada de sales de Hanks que contenía BSA al 0,1%). Se mezclaron 20 μ l de las bacterias con 10 μ l de diferentes diluciones de sobrenadante de cultivo celular de hibridoma que contenían el anticuerpo monoclonal 310B06, o un anticuerpo monoclonal control no específico, respectivamente. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, se añadieron 10 μ l de suero de gazapo (Charles River Laboratories, Alemania) como fuente de complemento, y se incubaron las sondas durante otros 30 minutos a 37°C. Se añadieron 40 μ l de células HL-60 diferenciadas (la línea celular promielocítica HL-60 se diferenció a células granulocíticas incubando las células durante 3 días en medio de Dulbecco modificado por Iscoves (IMDM; Sigma) suplementado con suero fetal de ternera al 10% (v/v) y dimetilformamida 100 mM) a las bacterias opsonizadas para obtener una concentración final de $1,25 \times 10^6$ células/ml. Después de incubar durante 90 minutos a 37°C en un agitador, las células se recogieron transfiriéndolas a 2 ml de tampón de lavado de células (PBS con azida al 0,02% (v/v); Becton Dickenson). Después de centrifugar durante 5 minutos a 250 x g, el precipitado celular se resuspendió en 150 μ l de tampón de lavado celular y se analizó mediante citometría de flujo. Se determinó la actividad opsonofagocítica positiva analizando la fluorescencia verde de las células HL-60 en comparación con la tinción de fondo. La tinción de fondo se determinó incubando las bacterias conjugadas con fluoresceína en presencia de complemento con células HL-60.

Protección in vivo de ratones infectados con P. aeruginosa

Se determinó la capacidad protectora *in vivo* de los anticuerpos monoclonales anti-LPS de *P. aeruginosa* en el modelo murino de septicemia por quemaduras. Los ratones NMRI (18-20 g; Charles River Laboratories) recibieron aproximadamente de 1 a 5 μ g en un volumen de 0,2 ml de los anticuerpos monoclonales por vía intravenosa 4 horas antes de la provocación. Como control, se inyectaron 0,2 ml de sobrenadante de anticuerpo inespecífico. Para la provocación, se anestesiaron grupos de 5 ratones hembra en una atmósfera de 3-cloro-1,1,2-trifluoroetil-difluorometil-éter (Ethrane, Abbott Lab., Chicago, IL). Los ratones se sometieron a 10 segundos de abrasión con etanol en un área de 2 cm² del lomo. Se inyectaron inmediatamente diferentes concentraciones (en el intervalo de 70 cfu/ratón a 70.000 cfu/ratón) de los organismos de provocación (*P. aeruginosa* IATS O6; cepa PA220; véase la tabla 1) resuspendidos en 0,5 ml de PBS por vía subcutánea en la zona quemada. Los animales se observaron durante 5 a 7 días. Se determinó la capacidad protectora dividiendo la DL₅₀ de los ratones protegidos por la DL₅₀ de ratones control que habían recibido el sobrenadante del anticuerpo inespecífico.

Ejemplo 1

Secuencias de ADN y aminoácidos de 310B06

La especificidad del anticuerpo se determina mediante la secuencia de ADN y aminoácidos, respectivamente. Se determinaron las secuencias de ADN de los fragmentos variables de las cadenas pesada y ligera. Brevemente, se aisló el ARN total de las células de hibridoma, y se sometió a transcripción inversa para dar ADNc completo usando la tecnología SMART. En este planteamiento, se añadió un cebador universal al extremo 5' del ADNc. Usando este cebador y los cebadores específicos C κ y C μ representados en la tabla III, se amplificaron mediante PCR las regiones variables y las regiones constantes de IgM y kappa. Los fragmentos de PCR se purificaron después mediante escisión de geles de agarosa y se usaron como moldes para secuenciación con los cebadores representados en la tabla III.

ES 2 338 105 T3

TABLA III

Cebadores usados para amplificación por PCR y secuenciación de las regiones variables de las cadenas pesadas IgM y las cadenas ligeras kappa de 310BO6 y 1BO11

Cebador	Secuencia	Aplicación
Con μ	5' -GCC ACG CTG CTC GTA TCC GAC G-3' (SEQ ID NO: 11)	PCR
Con κ	5' -ACC ACG CAC ACA ACA GAG GCA GTT CC-3' (SEQ ID NO: 12)	PCR
Seq μ	5' -GCT GCT CGT ATC CGA CGG-3' (SEQ ID NO:13)	Secuenciación
Seq κ	5' CAC AAC AGA GGC AGT TCC-3' (SEQ ID NO:14)	Secuenciación

Las secuencias de las regiones variables se compararon posteriormente con el índice Vbase. Los resultados con la comparación con las secuencias de la línea germinal se expresan como número de mutaciones de "reemplazo y silenciosas" (R:S), como se representa en la tabla IV. Las secuencias de ADN y aminoácidos se representan en las figuras 1 y 2.

TABLA IV

Relación de mutaciones de cambio frente a silenciosas de secuencias de línea germinal

	Cadena pesada		Cadena ligera	
	Línea germinal	R:S	Línea germinal	R:S
310BO6	DP-75	11:5	L12a	2:4

Ejemplo 2

Análisis por inmunotransferencia

Se ensayó la monorreactividad del anticuerpo monoclonal dirigido contra el LPS de *P. aeruginosa* de serotipo IATS O6 mediante inmunotransferencia. Se separaron las preparaciones de LPS de *P. aeruginosa* de diferentes serotipos como se representan en la tabla I mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con el sobrenadante del cultivo de células de hibridoma que contenía el anticuerpo monoclonal 310BO6 dirigido contra el serotipo IATS O6 de *P. aeruginosa* y los anticuerpos unidos se detectaron mediante anticuerpo de cabra anti-IgM humano conjugado con fosfatasa alcalina y sustrato de color. Como se muestra en la figura 3, el anticuerpo monoclonal 310BO6 sólo reacciona con el LPS del serotipo IATS O6.

Ejemplo 3

Reconocimiento de aislados clínicos de P. aeruginosa de serotipo IATS O6 por el anticuerpo monoclonal 310BO6

En comparación con otro anticuerpo monoclonal humano contra *P. aeruginosa* de serotipo IATS O6, 310BO6 reconoce un amplio rango de aislados clínicos de *P. aeruginosa* de serotipo IATS O6, que pertenecen a diferentes subtipos de IATS O6. Como se demuestra en la figura 4 en un ELISA en células enteras, 310BO6 reconoce intensamente todos los aislados clínicos probados, mientras que el anticuerpo adicional reaccionó selectivamente con PA220. En este ensayo, las bacterias de los diferentes aislados de *P. aeruginosa* de serotipo IATS O6 se usaron según los métodos descritos anteriormente.

Ejemplo 4

Actividad in vitro de 310BO6: actividad opsonofagocítica

Se puede medir la eficacia protectora de los anticuerpos anti-LPS de *P. aeruginosa* *in vitro* mediante la capacidad de opsonizar bacterias, seguida por fagocitosis. Para la determinación de la actividad de opsonización de 310BO6, se incubaron *P. aeruginosa* de serotipo IATS O6 (cepa PA220) conjugadas con fluoresceína en presencia o ausencia de complemento con concentraciones crecientes (1 ng/ml-3 μ g/ml) del anticuerpo monoclonal 310BO6 dirigido contra

ES 2 338 105 T3

P. aeruginosa de serotipo IATS O6, seguido por incubación con células granulocíticas humanas (células HL-60 diferencias con dimetilformamida). Estas células fagocitaron *P. aeruginosa* de serotipo IATS O6 tras opsonización por 310BO6 y complemento.

5 Ejemplo 5

Capacidad protectora in vivo del anticuerpo monoclonal 310BO6

10 En el ejemplo 4 se demostró la función efectora *in vitro* del anticuerpo monoclonal 310BO6 contra *P. aeruginosa* de serotipo IATS O6. Sin embargo, un anticuerpo con potencial terapéutico debe ser activo no solo *in vitro* sino también *in vivo*. Esta actividad *in vivo* de 310BO6 se demostró mediante la prevención de septicemia en el modelo de murino de septicemia por quemaduras. En este modelo, los ratones recibieron sobrenadante de cultivos de hibridoma que
15 contenían 5 µg de anticuerpo 310BO6 dirigido contra *P. aeruginosa* de serotipo IATS O6 o, como control, sobrenadante de cultivo celular de otra línea celular de hibridoma humano que produce un anticuerpo humano IgM/κ inespecífico, 4 horas antes de la provocación. Para inducir el choque séptico por quemaduras, los ratones se anestesiaron y se sometieron a 10 segundos de abrasión con etanol en el lomo. Inmediatamente después de la quemadura, los ratones se provocaron con al menos tres registros diferentes de *P. aeruginosa* de serotipo IATS O6 (de 70 cfu/ratón a 7.000 cfu/ratón en el grupo control que recibió anticuerpo monoclonal inespecífico y de 700 cfu/ratón a 70.000 cfu/ratón
20 en el grupo que recibió 310BO6) resuspendidos en 0,5 ml de PBS. Los ratones se observaron durante 5 a 7 días, y el potencial protector de los anticuerpos se expresó como veces de aumento en los títulos de la DL₅₀ de bacterias de provocación (tabla V). Se calculó la dosis letal (50%; DL₅₀) según el método de Reed y Muench (Reed, L.J. y Muench, H., 1938. Amer. J. Hyg. 27:493).

25 TABLA V

Potencial protector in vivo de 310BO6

30

Clon de anticuerpo	Seroespecificidad	LD ₅₀ (cfu)		Veces de protección
		Control	Tratado	
310BO6	IATS O6	24	35.541	1476

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo monoclonal humano específico para el lipopolisacárido (LPS) del serotipo IATS O6 de *P. aeruginosa* que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde la región variable de la cadena ligera del anticuerpo comprende SEQ ID NO:1 en la región CDR1, SEQ ID NO:2 en la región CDR2 y SEQ ID NO:3 en la región CDR3, y en donde la región variable de la cadena pesada del anticuerpo comprende SEQ ID NO:4 en la región CDR1, SEQ ID NO:5 en la región CDR2 y SEQ ID NO:6 en la región CDR3, o un fragmento Fab o F(ab')₂ o una mezcla de los mismos; o un derivado del mismo capaz de unirse a dicho LPS, en donde el derivado es una muteína del anticuerpo monoclonal humano que lleva de una a cinco sustituciones conservadoras en cualquiera de las regiones CDR en la cadena pesada y/o ligera.
- 15 2. Anticuerpo monoclonal humano específico para LPS del serotipo IATS O6 de *P. aeruginosa* en donde la región variable de la cadena ligera del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y la región variable de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; o una variante de dicho anticuerpo capaz de unirse a dicho LPS en donde la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo es al menos el 95% homóloga a SEQ ID NO:7 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo es al menos el 95% homóloga a SEQ ID NO:8.
- 20 3. Anticuerpo monoclonal humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 en donde la cadena ligera es de tipo kappa.
- 25 4. Anticuerpo monoclonal humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 en donde la cadena ligera es de tipo lambda.
5. Anticuerpo monoclonal humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la cadena pesada es del tipo IgM, IgA o IgG.
- 30 6. Anticuerpo monoclonal humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el anticuerpo consiste completamente en secuencia humana de aminoácidos.
7. Anticuerpo monoclonal humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde el anticuerpo muestra reconocimiento antigénico humano.
- 35 8. Anticuerpo monoclonal humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde el anticuerpo está modificado en el N-terminal, internamente y/o en el C-terminal.
- 40 9. Anticuerpo monoclonal humano de la reivindicación 8 en donde la modificación se selecciona de al menos una de oligomerización y conjugación a un fármaco y/o un marcador.
10. Anticuerpo monoclonal humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 obtenible de una célula B humana o un hibridoma obtenido mediante fusión de dicha célula B humana con una célula de mieloma o heteromieloma.
- 45 11. Hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 ó 10.
12. Ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 ó 10.
- 50 13. Ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 ó 10.
- 55 14. Vector que comprende al menos un ácido nucleico que codifica la cadena ligera de la reivindicación 12 y/o al menos un ácido nucleico que codifica la cadena pesada de la reivindicación 13.
15. Vector según la reivindicación 14, en donde el vector también comprende un promotor unido operativamente al ácido nucleico para facilitar la expresión del mismo.
- 60 16. Célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 14 y/o el ácido nucleico de la reivindicación 12 ó 13.
- 65 17. Un método para producir el anticuerpo monoclonal humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 ó 10 que comprende los pasos de cultivar el hibridoma de la reivindicación 11 en condiciones que permitan la secreción de un anticuerpo, y para cultivar la célula huésped de la reivindicación 16 en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo monoclonal humano.

ES 2 338 105 T3

18. Composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo monoclonal humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y/o al menos un ácido nucleico de la reivindicación 12 ó 13.

5 19. Uso del anticuerpo monoclonal humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y/o del ácido nucleico de la reivindicación 12 ó 13 para la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de una infección por *P. aeruginosa* en un paciente humano.

20. Uso según la reivindicación 19 en donde la infección por *P. aeruginosa* es una infección intrahospitalaria.

10 21. Kit de prueba para el diagnóstico de una infección por *P. aeruginosa* en una muestra que comprende al menos un anticuerpo monoclonal humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y/o al menos un ácido nucleico de la reivindicación 12 ó 13.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 338 105 T3

Figura 1

5' CAG GCG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAA GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG 54
 Gln Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val 18

CDR1

AAG GTC TCC TGT AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ATC GGC TAT TGG ATG CAC TGG 108
 Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Gly Tyr Trp Met His Trp 36

GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CCT GAG TGG ATG GGA CGG ATC AAC CCT AAC 162
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met Gly Arg Ile Asn Pro Asn 54

CDR2

AGT GGT GGC ACA AAG TAT GTA CAG AAG TTT CAG GGC AGG GTC ACC GTG ACC AGG 216
Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Val Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Arg 72

GAC ACG TCC ATC AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AAC TGG CTG ACA TCT GAC GAC 270
 Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Asn Trp Leu Thr Ser Asp Asp 90

CDR3

ACG GCC GTC TAT TAC TGT GCG AGA GCA AGG CCT GGT TGT GGT GGT GAT TGC TAT 324
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Arg Pro Gly Cys Gly Gly Asp Cys Tyr 108

GAG GTC TTA GAT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA 3' 369
Glu Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 123

Figura 2

5' GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCT TCC ACC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA 54
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg 18

CDR1

GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCC AGT CAG AGT ATT AGT AGC TGG TTG GCC TGG TAT 108
 Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr 36

CDR2

CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC TTG ATC TAT AAG GCA TCT AGT TTA 162
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu 54

GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAA TTC ACT 216
Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr 72

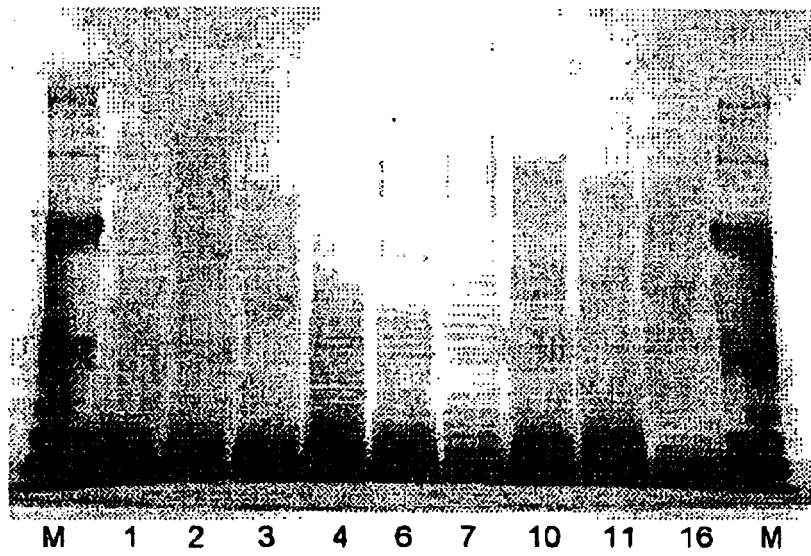
CTC ACC ATT AGC AGC CTG CAG CCT GAT GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG 270
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln 90

CDR3

TAT AAA AGT TAT CCC GTG TTT GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA GGA 3' 321
Tyr Lys Ser Tyr Pro Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly 107

Figura 3

a.



b.

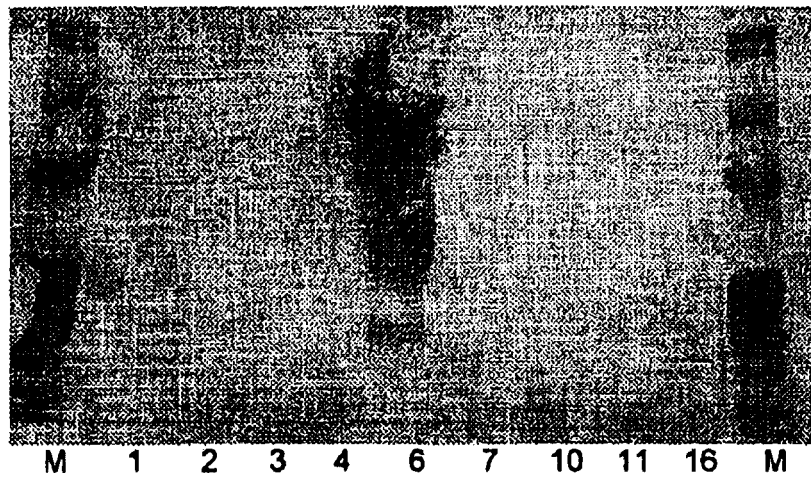


Figura 4

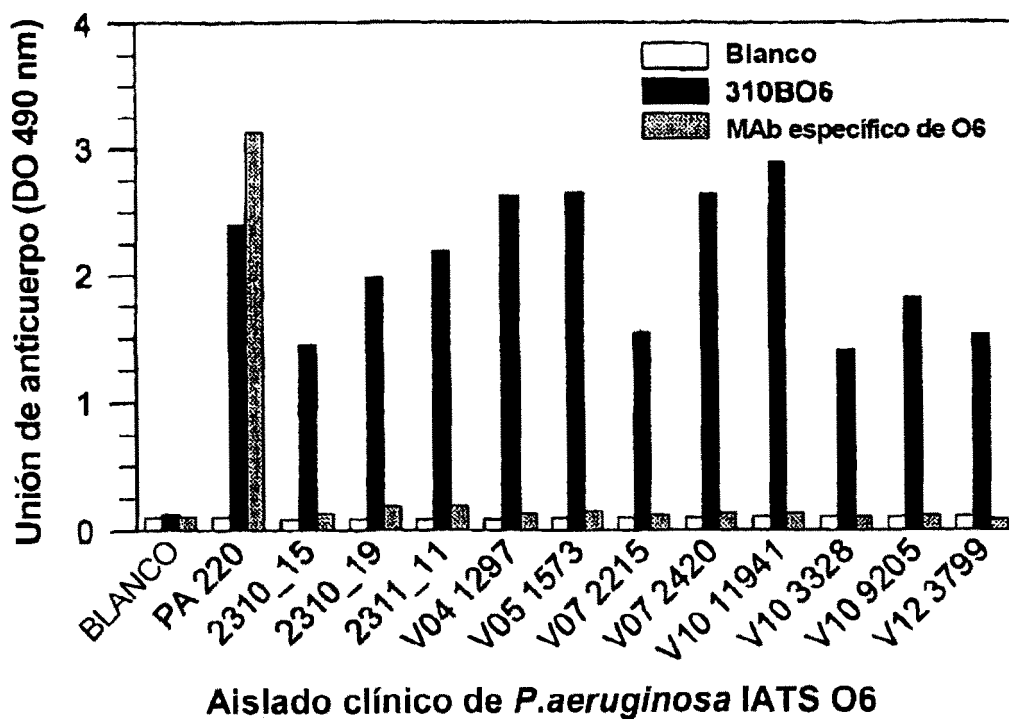
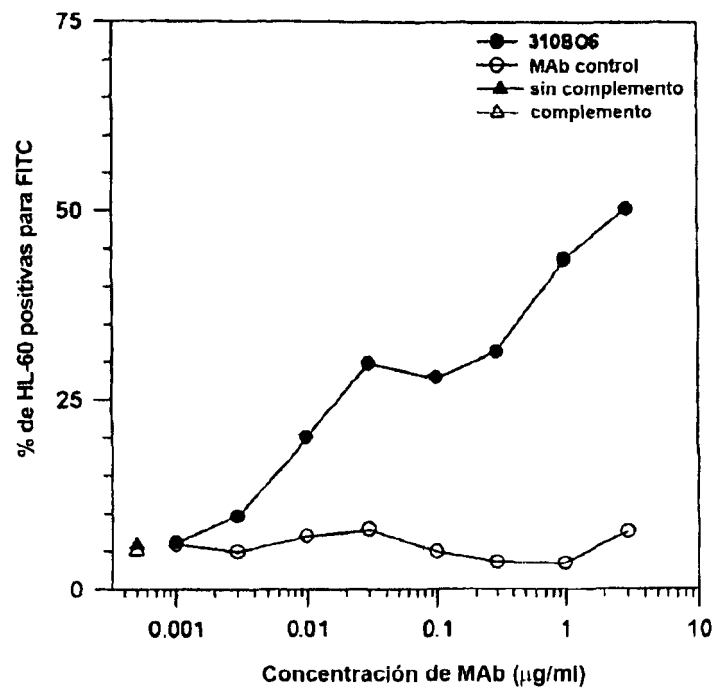


Figura 5



ES 2 338 105 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Berna Biotech

5 <120> Anticuerpo monoclonal humano específico para lipopolisacáridos (LPS) de serotipo IATS O6 de *Pseudomonas aeruginosa*

<130> seq26888-01996

10 <140>
<141>

15 <160> 14

<170> PatentIn ver. 2.1

20 <210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <220>
<223> Cadena ligera de CDR1

30 <400> 1

35 **Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys**
 1 5 10 15

40 <210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <220>
<223> Cadena ligera de CDR2

50 <400> 2

55 **Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser**
 1 5

60 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

65 <220>
<223> Cadena ligera de CDR3

ES 2 338 105 T3

<400> 3

Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Pro Val

5 1 5

<210> 4

10 <211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <220>

<223> Cadena pesada de CDR1

<400> 4

20 **Gly Tyr Trp Met His**
 1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<220>

35 <223> Cadena pesada de CDR2

<400> 5

40 **Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Val Gln Lys Phe Gln**
 1 5 10 15

45 **Gly**

<210> 6

<211> 15

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

55 <223> Cadena pesada de CDR3

<400> 6

60 **Ala Arg Pro Gly Cys Gly Gly Asp Cys Tyr Glu Val Leu Asp Tyr**
 1 5 10 15

65 <210> 7

<211> 107

ES 2 338 105 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <220>

<223> Región variable de la cadena ligera

<400> 7

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Pro Val
85 90 95

40

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105

45

<210> 8

<211> 124

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<220>

55 <223> Región variable de la cadena pesada

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada

60

65

ES 2 338 105 T3

<400> 8

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

10 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Gly Tyr
20 25 30

15 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

20 Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Val Gln Lys Phe
50 55 60

25 Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

30 Met Glu Leu Asn Trp Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

35 Ala Arg Ala Arg Pro Gly Cys Gly Gly Asp Cys Tyr Glu Val Leu Asp
100 105 110

40 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9

<211> 321

<212> ADN

45 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera

50

<400> 9

55 gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcaettgcc gggccagtc gagtattagt agctggttgg cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctctt gatctataag gcatctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtgatc tgggacagaa ttcactctca ccattagcag cctgcagcct 240
60 gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataaaagt atcccgtgtt tggccaaggg 300
accaaggtgg aaatcaaagg a 321

65

<210> 10

<211> 372

ES 2 338 105 T3

<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5 <220>
<223> Región variable de la cadena pesada

<400> 10

10
caggcgcagc tgggtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgtaagg cttctggata caccttcacg ggctattgga tgcactgggt gcgacaggcc 120
15 cctggacaag ggctgagtg gatgggacgg atcaacccta acagtgggtg cacaaagtat 180
gtacagaagt ttcagggcag ggtcacctg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga actggctgac atctgacgac acggccgtct attactgtgc gagagcaagg 300
20 cctggtrgtg gtgggtgattg ctatgaggte ttagattact ggggccaggg aaccctggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 11

25 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 11

35 gccacgctgc tcgtatccga cg 22

<210> 12

40 <211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 12

50 agcaggcaca caacagagc agttcc 26

<210> 13

55 <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 13

65 gctgctcgta tccgacgg 18

ES 2 338 105 T3

<210> 14

<211> 18

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

10

<400> 14

cacaacagag gcagttcc

15

18

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65