

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 734**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA LIMITADA

T7

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2010 E 10750805 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras limitación: **20.05.2015 EP 2407537**

54

Título: **Anticuerpo PcrV humanizado con actividad anti-pseudomonas**

30

Prioridad:

11.03.2009 JP 2009057929

45

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente limitada:

11.08.2015

73

Titular/es:

**SHIONOGI & CO., LTD. (100.0%)
1-8 Doshomachi 3-chome Chuo-ku Osaka-shi
Osaka 541-0045, JP**

72

Inventor/es:

**YAMANO, YOSHINORI;
NUMATA, YOSHITO;
SATO, TAKAFUMI;
TSUJI, TOSHINAGA y
KAWAMOTO, KEIKO**

74

Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 529 734 T7

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo PcrV humanizado con actividad anti-pseudomonas

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce PcrV, o una parte del mismo. Más específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo que tiene una mayor actividad neutralizante (en adelante, también referida como actividad inhibidora de citotoxicidad) que los anticuerpos anti-PcrV convencionales, o una parte del mismo, y a una composición farmacéutica que contiene el mismo.

Técnica de Antecedentes

10 Pseudomonas aeruginosa es obligadamente un bacilo gram-negativo aerobio que existe ampliamente en el mundo natural. A pesar de que su patogenicidad es habitualmente baja, es un patógeno que causa infecciones oportunistas que con frecuencia se producen en pacientes que padecen diversas enfermedades pre-existentes, tales como cáncer y diabetes, y en pacientes a quienes se han administrado productos farmacéuticos que tienen una acción inhibidora inmune y, a menudo, puede causar neumonía, infección del tracto urinario, septicemia o similar, que conducen a resultados graves. En los sectores clínicos, la infección por Pseudomonas aeruginosa se considera
15 como una de las infecciones más difíciles de ser tratada, ya que Pseudomonas aeruginosa no sólo tiene inherentemente una baja sensibilidad a los antibióticos existentes, sino que también tiene una alta tendencia a adquirir fácilmente resistencia a diversos antibióticos y llegar a ser difícil de curar. Así, para Pseudomonas aeruginosa, la medida de desarrollar nuevos antibióticos uno tras otro es limitada, y es muy deseable un método terapéutico que no se base en antibióticos.

20 Una alta citotoxicidad de Pseudomonas aeruginosa se ejerce mediante la inyección de toxina en una célula eucariota a través de un sistema de secreción de exotoxina de tipo III. PcrV es una proteína de 294 residuos (NCBI N° de Acceso AAC45935, SEQ ID NO: 1) que constituye el sistema de secreción de exotoxina de tipo III, y una secuencia de operón que codifica la misma está abierto al público (documento de patente 1, documento no de patente 1). Dado que el control de PcrV posiblemente puede conducir a un medio terapéutico en la infección de
25 Pseudomonas aeruginosa (documento no de patente 2), se reseñan anticuerpos policlonales (documentos no de patente 3, 4) y anticuerpos monoclonales (documento de patente 2, documentos no de patente 5, 6) contra PcrV que tienen actividad neutralizante. Sin embargo, los anticuerpos policlonales son difíciles de humanizar y de ser utilizados como composiciones farmacéuticas, debido a la dificultad en la mejora de la antigenicidad. También los anticuerpos monoclonales que han sido reseñados hasta ahora tienen una baja actividad neutralizante y no logran
30 satisfacer los requisitos en sectores clínicos.

Documento de patente 1: Patente de EE.UU. N° 6.551.795

Documento de patente 2: Traducción japonesa de la publicación PCT N° 2005-500250

Documento no de patente 1: Yahr, T.L. et al., J. Bacteriol., 1997, vol. 179, pág. 7165

Documento no de patente 2: T. Sawa et al, Nature Medicine, 1999, vol. 5, pág. 392

35 Documento no de patente 3: Shime N et al, J. Immunol.. 2001, vol. 167, pág. 5880

Documento no de patente 4: Imamura Y et al, Eur. Respir. J., 2007, vol. 29, pág. 965

Documento no de patente 5: Karine Faure et al, J. immune. Based. Therapies and Vaccines, 2003, vol. 1

Documento no de patente 6: Dara W. Frank et al, J. Infect. Disease, 2002, vol. 186, pág. 64

Sumario de la invención

40 Problema a ser resuelto por la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar una medida que sea eficaz en la terapia de infecciones, en particular la infección por Pseudomonas aeruginosa.

Medios para resolver el problema

5 Como resultado de diligentes esfuerzos de preparación de anticuerpos monoclonales contra PcrV, los autores de la presente invención han tenido éxito en la preparación de un nuevo anticuerpo monoclonal humanizado que se considera que tiene un mayor efecto terapéutico sobre la enfermedad en comparación con un anticuerpo monoclonal contra-PcrV conocido convencionalmente, y han completado la presente invención.

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado contra PcrV o una parte de dicho anticuerpo, según se define en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona también:

- una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o parte del mismo;
- 10 - el anticuerpo o parte del mismo, para uso en métodos de tratamiento médico;
- el uso del anticuerpo o parte del mismo en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades infecciosas inducidas por *Pseudomonas aeruginosa*;
- un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera del anticuerpo; y
- 15 - un vector de expresión que comprende el polinucleótido,

todo ello según se define en las reivindicaciones.

Efecto de la invención

20 Un anticuerpo monoclonal humanizado o una de parte del mismo de la presente invención es útil como un agente de prevención y/o un agente de tratamiento de enfermedades infecciosas inducidas por *Pseudomonas aeruginosa*, debido a su muy excelente actividad neutralizante en PcrV

Breve explicación de los dibujos

[Fig. 1] La Fig. 1 muestra curvas en las que PcrV marcada con biotina está sustituida con PcrV no marcada en anticuerpos de PcrV (1F3, 2A4, 6F5, 7A7 y Mab166).

25 [Fig. 2] La Fig.2 muestra afinidades de los anticuerpos de PcrV (1F3, 2A4, 6F5, 7A7 y Mab166) determinadas por análisis de resonancia de plasmón superficial.

[Fig. 3] La Fig. 3 muestra los resultados de ensayos de sándwich entre anticuerpos de PcrV (1F3, 2A4, 6F5, 7A7 y Mab166) y Mab166.

[Fig. 4] La Fig. 4 muestra efectos inhibidores de anticuerpos de PcrV (1F3, 2A4, 6F5, 7A7 y Mab166) sobre la citotoxicidad de células U937 de la cepa SR24 de *Pseudomonas aeruginosa*.

30 [Fig. 5] La Fig. 5 muestra efectos inhibidores de anticuerpos de PcrV (1F3, 2A4, 6F5, 7A7 y Mab166) sobre la citotoxicidad de células de mieloma P3U1 de la cepa SR24 de *Pseudomonas aeruginosa*.

[Fig. 6] La Fig. 6 muestra curvas en las que PcrV marcada con biotina está sustituida con PcrV de longitud completa no marcada y PcrV truncada en anticuerpos de PcrV (1F3, 2A4, 9D12, 12H9 y Mab166).

35 [Fig. 7] La Fig. 7 muestra reactividad con PcrV de longitud completa y PcrV truncada en anticuerpos de PcrV (1F3, 2A4, 9D12, 12H9 y Mab166) en transferencia Western.

[Fig. 8] La Fig. 8 muestra la correlación entre el anticuerpo y la PcrV de longitud completa por la supresión de la actividad inhibidora de la citotoxicidad.

[Fig. 9] La Fig. 9 muestra la correlación entre el anticuerpo y la PcrV truncada por la supresión de la actividad inhibidora de la citotoxicidad.

[Fig. 10] La Fig. 10 muestra la secuencia de aminoácidos de una región variable del anticuerpo 1F3. Lo subrayado indica una región CDR.

[Fig.11] La Fig. 11 muestra la secuencia de aminoácidos de una región variable del anticuerpo 2A4. Lo subrayado indica una región CDR.

5 [Fig. 12] La Fig. 12 muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo de ratón (Ratón 1F3), el anticuerpo humanizado molde (Molde), el anticuerpo humanizado mutante (Retromutación) y el anticuerpo humanizado (Humanizado 1F3).

10 [Fig. 13] La Fig. 13 muestra la afinidad entre el antígeno de PcrV y cada una de las combinaciones de la cadena pesada de un anticuerpo quimérico (quimera H) de ratón-ser humano, la cadena ligera del mismo (quimera L), la cadena pesada del anticuerpo humanizado molde (HT), la cadena ligera del mismo (LT), la cadena pesada del anticuerpo humanizado mutante (HB) y la cadena ligera del mismo (LB).

15 [Fig. 14] La Fig. 14 muestra la afinidad de los anticuerpos que incluyen cada una de las combinaciones de la cadena pesada del anticuerpo quimérico de ratón-ser humano (quimera H), la cadena ligera de anticuerpo quimérico de ratón-ser humano (quimera L), los mutantes de la cadena pesada del anticuerpo humanizado mutante (I48M, A67V, L69M, V71R, A78V, V93A y L94R), y la cadena ligera del anticuerpo humanizado molde (LT), con el antígeno de PcrV.

[Fig. 15] La Fig. 15 muestra la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado. Lo subrayado indica una región CDR.

20 [Fig. 16] La Fig. 16 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de una cadena ligera del anticuerpo humanizado. Lo subrayado indica una región CDR.

[Fig. 17] La Fig. 17 muestra la afinidad entre el antígeno de PcrV y cada una de las combinaciones de la cadena pesada de un anticuerpo quimérico (quimera H) de ratón-ser humano, la cadena ligera del mismo (quimera L), la cadena pesada del anticuerpo humanizado (h1F3 H), y la cadena ligera del mismo (h1F3 L).

25 [Fig. 18] La Fig. 18 muestra los efectos inhibidores de anticuerpos de PcrV (anticuerpo de PcrV humanizado, anticuerpo de PcrV de ratón y Mab166) sobre la citotoxicidad de células U937 de la cepa SR24 de Pseudomonas aeruginosa.

[Fig. 19] La Fig. 19 muestra los efectos inhibidores de anticuerpos de PcrV (anticuerpo de PcrV humanizado, anticuerpo de PcrV de ratón y Mab166) sobre la citotoxicidad de células de mieloma de la cepa SR24 de Pseudomonas aeruginosa.

30 Modo de llevar a cabo la invención

35 "Anticuerpo monoclonal", que es un objeto de la presente invención, es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la PcrV antes mencionada. Más concretamente, es un anticuerpo monoclonal contra PcrV que tiene al menos una característica seleccionada de (1) inhibir el 50% o más de la citotoxicidad de células de leucocitos por parte de Pseudomonas aeruginosa en una concentración de 1 nM a 200 nM in vitro; (2) inhibir el 50% o más de la citotoxicidad de células de mieloma por parte de Pseudomonas aeruginosa en una concentración de 1 nM a 50 nM in vitro; y (3) que tiene una constante de disociación (Kd) con PcrV de 2×10^{-9} (M) o menos. Puede tener su epítipo en las posiciones de 136 a 233 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

40 Una característica del anticuerpo monoclonal de la presente invención es que tiene una fuerte actividad inhibidora de citotoxicidad. Por ejemplo, cuando se utilizan células de leucocitos, el anticuerpo monoclonal tiene una actividad inhibidora (neutralizante) tal que inhibe el 50% o más de citotoxicidad de Pseudomonas aeruginosa, en un intervalo de concentraciones de 1 a 200 nM, preferiblemente de 2 a 100 nM, y más preferiblemente de 5 a 25 nM. Cuando se utilizan células de mieloma, el anticuerpo monoclonal tiene una actividad inhibidora (neutralizante) tal que inhibe el 50% o más de citotoxicidad de Pseudomonas aeruginosa, en un intervalo de concentraciones de 1 a 50 nM, preferiblemente de 2 a 30 nM, y más preferiblemente de 4 a 20 nM. Estos valores superan ampliamente las actividades numéricas para Mb166 reseñadas en Dara W. Frank et al. (J. Infect. Disease, 2002, vol. 186, pág. 64).

45 Otra característica del anticuerpo monoclonal de la presente invención es que tiene su epítipo en una región desde las posiciones 136 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de PcrV (SEQ NO: 1). Los autores de la presente invención han encontrado que un anticuerpo que reconoce esta región tiene una actividad más fuerte

(actividad inhibidora de citotoxicidad) que un anticuerpo que reconoce otra región. El anticuerpo que reconoce esta región es útil para el tratamiento de enfermedades infecciosas, ya que tiene una fuerte actividad inhibidora de citotoxicidad.

5 El epítipo de reconocimiento del anticuerpo monoclonal puede ser identificado de la siguiente manera. En primer lugar, se prepara una diversidad de estructuras parciales de una molécula a ser reconocidas por el anticuerpo monoclonal. Para la preparación de estructuras parciales, se conoce un método para preparar diversos péptidos parciales de la molécula con una técnica de síntesis de oligopéptidos conocida, un método de producción de los mismos en o fuera del huésped tal como E. coli mediante la incorporación en un plásmido de expresión adecuado de una secuencia de ADN que codifica un péptido parcial objetivo con una técnica de recombinación génica, o
10 similares, pero está generalizado utilizar una combinación de estos métodos para el objeto antes mencionado. Por ejemplo, después de preparar una serie de polipéptidos acortados en una longitud apropiada desde el extremo C o el extremo N de la proteína del antígeno mediante el uso de una técnica de recombinación génica conocida por una persona experta en la técnica, se examina la reactividad del anticuerpo monoclonal con estos polipéptidos y se determina aproximadamente un sitio de reconocimiento.

15 Después de ello, se sintetiza con mayor precisión una diversidad de oligopéptidos de la parte correspondiente, mutantes del péptido, o similares, utilizando una técnica de síntesis de oligopéptidos bien conocida por una persona experta en la técnica, y la determinación del epítipo se realiza examinando la capacidad de unión de un anticuerpo monoclonal que contiene un agente profiláctico o terapéutico de la presente invención como ingrediente activo, con estos péptidos, o examinando la actividad inhibidora competitiva de estos péptidos de la unión entre el anticuerpo
20 monoclonal y el antígeno. Como método conveniente para obtener una diversidad de oligopéptidos, también se puede utilizar un kit comercialmente disponible (por ejemplo, kit SPOTs (disponible de Genosys Biotechnologies, Inc.), o una serie de kit de síntesis en múltipines/péptidos con un método de síntesis en múltipines (disponible de Chiron Corporation).

25 La actividad inhibidora de citotoxicidad puede medirse de la siguiente manera. En primer lugar, un anticuerpo monoclonal, para el que se ha de medir la actividad inhibidora de citotoxicidad, se diluye en concentraciones apropiadas en series de dilución dobles. A continuación, las células que se ven afectadas por la toxina de Pseudomonas aeruginosa o similares (a las que se alude en lo que sigue como células diana) se diluyen, por ejemplo, utilizando un medio de cultivo para el cultivo celular, para lograr un número apropiado. Concretamente, se prefiere ajustar en 3×10^6 a 5×10^6 células/mL cuando se utilizan células de mieloma, y ajustar en 1×10^6 a 3×10^6
30 células/mL cuando se utilizan células de leucocitos. Del mismo modo, células de Pseudomonas aeruginosa también se ajustan en 1×10^7 a 5×10^8 ufc/mL utilizando, por ejemplo, un medio de cultivo. En presencia del anticuerpo monoclonal, las células de Pseudomonas aeruginosa y las células diana se cultivan en el mismo tubo de ensayo o pocillo (por ejemplo, en condiciones in vitro tal como un pocillo en una microplaca en una condición de cultivo apropiada. La condición de cultivo en este momento puede ser una condición de cultivo empleada comúnmente y que es considerada adecuada para el crecimiento de células o bacterias. En cuanto al tiempo de cultivo, la condición
35 óptima se cambia apropiadamente dependiendo del tipo de células diana y, por ejemplo, se prefieren de aproximadamente 1 a 3 horas para el caso de utilizar células de mieloma, y de aproximadamente 1 a 3 horas para el caso de utilizar células de leucocitos. Tomando un pocillo no añadido con un anticuerpo como un grupo de control, se calcula una concentración a la que se observa un 50% de inhibición en comparación con el grupo control (concentración efectiva). En cuanto a la decisión de la vida y la muerte de las células diana, aunque se han establecido diversos procesos, por ejemplo es útil la medición de la absorbancia a una longitud de onda apropiada (por ejemplo, de 400 a 500 nm) después de la adición de un reactivo colorante (véase Nature Medicine 1999, vol. 5, págs. 392-395, para referencia).

45 Una característica del anticuerpo monoclonal de la presente invención es que tiene una alta afinidad con PcrV. La constante de disociación (Kd) que se utiliza como un índice de la afinidad con el anticuerpo monoclonal se puede analizar de diversas maneras. Por ejemplo, el análisis puede llevarse a cabo fácilmente de acuerdo con el método de Scatchard utilizando un antígeno marcado con diversos agentes de marcaje, o un método que utiliza un kit de medición Biacore X comercialmente disponible (disponible de Amersham Pharmacia) o un kit similar de acuerdo con el manual de instrucciones y el protocolo de experimentación adjuntado con el kit. La
50 evaluación de la actividad de unión puede llevarse a cabo de acuerdo con ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), EIA (inmunoensayo enzimático), RIA (radioinmunoensayo) o el ensayo de anticuerpos fluorescentes. La constante de disociación (valor Kd), determinada utilizando un método de este tipo, está representada en una unidad de M (mol). Cuanto menor sea la constante de disociación del anticuerpo monoclonal sometido a ensayo, tanto más fuerte será la afinidad que tiene el anticuerpo monoclonal sometido a ensayo. En
55 cuanto al anticuerpo monoclonal de la presente invención o una parte del mismo, la constante de disociación (Kd) de PcrV es 2×10^{-9} (M) o menos, preferiblemente $1,5 \times 10^{-9}$ (M) o menos, y más preferiblemente $1,2 \times 10^{-9}$ (M) o menos.

En el anticuerpo monoclonal de la presente invención, el anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo la región determinante de complementariedad: CDR1, cuya secuencia de aminoácidos es SFTSYWMH (SEQ ID NO: 15); CDR2, cuya secuencia de aminoácidos es INPSNGRTNYNEKFNT (SEQ ID NO: 16); CDR3, cuya secuencia de aminoácidos es YGNYVVYYTMDY (SEQ ID NO: 17) y la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina, incluyendo la región determinante de complementariedad: CDR1, cuya secuencia de aminoácidos es SASTSVSYME (SEQ ID NO: 18); CDR2, cuya secuencia de aminoácidos es TTKLAS (SEQ ID NO: 19); CDR3, cuya secuencia de aminoácidos es HQWRNYPFT (SEQ ID NO: 20).

De acuerdo con esta presente invención, se proporciona la versión humanizada del anticuerpo monoclonal que tiene la característica arriba descrita. El anticuerpo monoclonal humanizado se obtiene mediante el trasplante de una región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo de un mamífero distinto del ser humano, por ejemplo de un ratón, en la CDR de un anticuerpo humano. Por lo tanto, la región de marco se deriva de un anticuerpo humano. Un marco (MR) adecuado se puede seleccionar de acuerdo con los documentos de Kabat E.A. et al. El MR se puede seleccionar de manera que la CDR puede formar un sitio de unión al antígeno apropiado. Si es necesario, el aminoácido de MR de la región variable puede estar sustituido de manera que la CDR del anticuerpo humanizado reconstruido puede formar un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato, K. et al., Cancer Res. 1993, vol. 53. Pág. 851). En este caso, pueden repetirse las etapas descritas anteriormente.

También se conoce un método de producción general para el anticuerpo monoclonal humanizado (por ejemplo, documentos WO95/14041 y WO96/02576, etc.). En concreto, la secuencia de ADN que codifica la región variable diseñada para conectar la CDR del anticuerpo de ratón con la MR del anticuerpo humano, se sintetiza por el método de la PCR a partir de varios oligonucleótidos preparados para que tengan partes solapantes en sus extremos (remitirse al documento WO98/13388). El ADN obtenido se conecta a la región constante codificadora de ADN de anticuerpo humano y el ADN resultante se incorpora en el vector de expresión. Alternativamente, la región variable que codifica el ADN del anticuerpo se puede incorporar en el vector de expresión que comprende la región constante del anticuerpo que codifica ADN. Para preparar el anticuerpo de la presente invención, el gen de anticuerpo se puede incorporar en un vector de expresión para que se exprese bajo el control de una región de control de la expresión, por ejemplo potenciador/promotor. Además, las células huésped se transforman con este vector de expresión y, por lo tanto, podrían producir anticuerpos. Como célula huésped se pueden citar células de vertebrados tales como células COS o células CHO, célula procariota o levaduras.

Para la expresión de gen de anticuerpo, la cadena pesada (cadena H) o la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo se puede incorporar por separado en vectores de expresión, y un huésped puede ser transformado con estos vectores de expresión, o el ADN que codifica la cadena H y la cadena L pueden ser incorporado en un único vector de expresión para transformar un huésped con el vector de expresión resultante (véase el documento WO94/11523).

Transformantes deseables, obtenidos por los métodos descritos anteriormente, pueden ser cultivados por los métodos conocidos para la persona experta. Mediante este cultivo, anticuerpo monoclonal humanizado contra PcrV se produce en los transformantes o fuera de las células. El medio para el cultivo puede seleccionarse apropiadamente de medios convencionales dependiendo de la célula huésped. En el caso de las células COS arriba descritas están disponibles medios tales como RPMI-1640, medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - siglas en inglés) y, si es necesario, se pueden añadir igualmente los ingredientes del suero tal como suero bovino fetal (FBS - siglas en inglés). La temperatura para el cultivo de los transformantes no está restringida, siempre que no se reduzca seriamente la capacidad para producir proteínas en la célula. Preferiblemente se citan temperaturas de 32-42 °C. Lo más preferiblemente, se cita una temperatura de 37 °C. Según sea necesario, el cultivo se puede realizar en la atmósfera que contiene dióxido de carbono al 1-10% (v/v).

Las fracciones que contienen anticuerpo humanizado contra PcrV de la presente invención, producido en los transformantes o fuera de las células por los métodos descritos previamente, se pueden refinar mediante los métodos de separación conocidos hasta ahora. Estos métodos se basan en la propiedad física o propiedad química de la proteína diana. Concretamente, por ejemplo, están disponibles el tratamiento con precipitante de proteínas, cromatografía tal como cromatografía de ultrafiltración, cromatografía de separación por tamaño, cromatografía de adsorción-filtración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o cromatografía líquida de alto rendimiento, diálisis y combinaciones de los mismos.

De acuerdo con los métodos previamente descritos, es deseable que se pueda producir fácilmente con un buen rendimiento y una buena pureza anticuerpo monoclonal humanizado contra PcrV. Las secuencias de aminoácidos de la región variable de los anticuerpos optimizados se muestran como SEQ ID: N° 27 en la Fig. 15 y SEQ ID: N° 28 en la Fig. 16. Estos anticuerpos se construyeron mediante el injerto de aminoácidos de las secuencias completas de CDR y secuencias parciales de MR, que están determinados para la humanización del anticuerpo monoclonal de ratón 1F3, en anticuerpo humano.

En comparación con el anticuerpo de ratón (m1F3) producido por células de hibridoma, este anticuerpo humanizado (h1F3) tenía una actividad inhibidora de citotoxicidad equivalente. Aunque la humanización del anticuerpo con el mantenimiento de la actividad del anticuerpo original es generalmente difícil, los autores de la presente invención tuvieron éxito para obtener el anticuerpo humanizado que tiene actividad equivalente del anticuerpo de ratón original.

5 Anticuerpo humanizado es útil para para el fin del tratamiento debido a su menor antigenicidad en el cuerpo humano.

Como anticuerpo humanizado de la presente invención está disponible la región constante de anticuerpo humano. Como una región constante preferida de anticuerpo humano, se puede citar C γ para la cadena pesada y, por ejemplo, se pueden utilizar C γ 1, C γ 2, C γ 3 y C γ 4 y se pueden citar C κ o C λ para la cadena ligera. Además, la región C del anticuerpo humano puede modificarse para mejorar su estabilidad de anticuerpo o su productividad. En la

10 humanización, anticuerpo humano disponible puede ser cualquier isotipo tal como IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. Como la presente invención, es preferible IgG, e IgG1 o IgG4 son más preferibles.

El anticuerpo monoclonal humanizado de la presente invención puede ser un anticuerpo conjugado que se hace mediante la conjugación con alguna molécula tal como polietilenglicol (PEG), sustancia radiactiva, o toxina. Estos anticuerpos monoclonales conjugados se obtienen modificando químicamente el anticuerpo. Métodos para modificar anticuerpos se han establecido en este campo técnico. Anticuerpo monoclonal humanizado de la presente invención abarca estos anticuerpos monoclonales conjugados.

15 Anticuerpo monoclonal humanizado de la presente invención puede fusionarse con otras proteínas en su sitio N-terminal o sitio C-terminal (Clinical Cancer Research, 2004, 10, 1274-1281). La persona experta puede seleccionar de manera apropiada proteínas de fusión.

Anticuerpo monoclonal humanizado de la presente invención puede fusionarse con otras proteínas en su sitio N-terminal o sitio C-terminal (Clinical Cancer Research, 2004, 10, 1274-1281). La persona experta puede seleccionar de manera apropiada proteínas de fusión.

20 El anticuerpo monoclonal humanizado de la presente invención puede ser del que se mejora la actividad inhibidora de citotoxicidad. Estos anticuerpos son, por ejemplo, el anticuerpo del que se ha eliminado fucosa, el anticuerpo conjugado con la bisección de N-acetil glucosamina a través de su cadena de azúcar (GlcNAc), o anticuerpo del cual la actividad de unión con el receptor de Fc γ se cambia por la sustitución de residuos aminoácidos de la región Fc. Estos anticuerpos se pueden producir por los métodos conocidos por la persona experta.

25 En la presente invención, la frase "parte de anticuerpo monoclonal" significa una región que es una parte del anticuerpo monoclonal antes mencionado de la presente invención y tiene capacidad de unión específica para PcrV de igual manera el anticuerpo monoclonal (en adelante, al que también se alude simplemente como "fragmento de anticuerpo").

Concretamente, se pueden citar Fab (fragmento de unión a antígeno), F(ab')₂, Fab', anticuerpo de cadena sencilla (Fv de cadena sencilla; en lo sucesivo designado scFv), anticuerpo estabilizado con disulfuro (Fv estabilizado con disulfuro; en lo sucesivo designado dsFv), fragmento de la región V dimerizada (en adelante, designado Diacuerpo), que tiene capacidad de unión específica a la PcrV humana, (Expert opinion on therapeutic patents, vol. 6, N° 5, págs. 441-456, 1996).

30 Concretamente, se pueden citar Fab (fragmento de unión a antígeno), F(ab')₂, Fab', anticuerpo de cadena sencilla (Fv de cadena sencilla; en lo sucesivo designado scFv), anticuerpo estabilizado con disulfuro (Fv estabilizado con disulfuro; en lo sucesivo designado dsFv), fragmento de la región V dimerizada (en adelante, designado Diacuerpo), que tiene capacidad de unión específica a la PcrV humana, (Expert opinion on therapeutic patents, vol. 6, N° 5, págs. 441-456, 1996).

Fab es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 con actividad de unión a antígeno, compuesto de aproximadamente una mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L entera, obtenido al degradar con una enzima papaína una parte de péptido por encima de dos enlaces disulfuro (enlace S-S), reticular dos cadenas H en la región de bisagra de IgG. Fab utilizado en la presente invención puede obtenerse tratando el anticuerpo monoclonal de la presente invención con papaína. Alternativamente, Fab puede producirse insertando ADN que codifica Fab de anticuerpo monoclonal de la presente invención en un vector de expresión para la célula e introduciendo el vector en una célula para provocar la expresión.

35 Fab es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 con actividad de unión a antígeno, compuesto de aproximadamente una mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L entera, obtenido al degradar con una enzima papaína una parte de péptido por encima de dos enlaces disulfuro (enlace S-S), reticular dos cadenas H en la región de bisagra de IgG. Fab utilizado en la presente invención puede obtenerse tratando el anticuerpo monoclonal de la presente invención con papaína. Alternativamente, Fab puede producirse insertando ADN que codifica Fab de anticuerpo monoclonal de la presente invención en un vector de expresión para la célula e introduciendo el vector en una célula para provocar la expresión.

F(ab')₂ es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 con actividad de unión a antígeno, formado por la unión de dos regiones Fab' en una parte de bisagra. Estas regiones Fab' se obtienen mediante la degradación de pepsina por debajo de dos enlaces S-S de la región de bisagra de IgG. El F(ab')₂ utilizado en la presente invención puede obtenerse tratando el anticuerpo monoclonal de la presente invención con pepsina. Alternativamente, F(ab')₂ se puede producir insertando ADN que codifica F(ab')₂ del anticuerpo monoclonal en un vector de expresión para la célula e introduciendo el vector en E. coli, levadura o célula animal para provocar la expresión.

45 F(ab')₂ es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 con actividad de unión a antígeno, formado por la unión de dos regiones Fab' en una parte de bisagra. Estas regiones Fab' se obtienen mediante la degradación de pepsina por debajo de dos enlaces S-S de la región de bisagra de IgG. El F(ab')₂ utilizado en la presente invención puede obtenerse tratando el anticuerpo monoclonal de la presente invención con pepsina. Alternativamente, F(ab')₂ se puede producir insertando ADN que codifica F(ab')₂ del anticuerpo monoclonal en un vector de expresión para la célula e introduciendo el vector en E. coli, levadura o célula animal para provocar la expresión.

Fab' es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 con actividad de unión a antígeno, obtenido al cortar el enlace S-S entre bisagras del F(ab')₂ mencionado. Fab' utilizado en la presente invención se pueden obtener mediante el tratamiento de F(ab')₂ del anticuerpo monoclonal de la presente invención con un agente reductor, ditiotreitól. Alternativamente, Fab' puede producirse insertando ADN que codifica Fab' del anticuerpo monoclonal en un vector de expresión para la célula e introduciendo el vector en E. coli, levadura o una célula animal para provocar la expresión.

50 Fab' es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 con actividad de unión a antígeno, obtenido al cortar el enlace S-S entre bisagras del F(ab')₂ mencionado. Fab' utilizado en la presente invención se pueden obtener mediante el tratamiento de F(ab')₂ del anticuerpo monoclonal de la presente invención con un agente reductor, ditiotreitól. Alternativamente, Fab' puede producirse insertando ADN que codifica Fab' del anticuerpo monoclonal en un vector de expresión para la célula e introduciendo el vector en E. coli, levadura o una célula animal para provocar la expresión.

scFv es un péptido VH-P-VL o VL-P-VH, en el que una cadena VH y una cadena VL están conectadas utilizando un enlazador peptídico apropiado (aquí en lo sucesivo, designado por P), y es un fragmento de anticuerpo que tiene actividad de antígeno. VH y VL contenidas en scFv, utilizadas en la presente invención, pueden derivarse a partir del anticuerpo monoclonal de la presente invención. scFv utilizado en la presente invención se puede producir mediante la adquisición de ADNc que codifica VH y VL de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de la presente invención, la construcción de un vector de expresión de scFv y provocando la expresión mediante la introducción del vector de expresión en E. coli, levadura o célula animal.

dsFv se refiere a uno obtenido por polipéptidos de unión, en que cada uno de los residuos aminoácido está sustituido con un residuo cisteína en VH y VL, a través de enlace S-S. El aminoácido a ser sustituido con residuo de cisteína puede seleccionarse basándose en la predicción de estructura terciaria de anticuerpo de acuerdo con el método indicado por Reiter et al. (Protein Engineering, 7, 697 (1994)). VH o VL, contenida en dsFv utilizado en la presente invención, puede derivarse del anticuerpo monoclonal de la presente invención. dsFv utilizado en la presente invención se puede producir mediante adquiriendo ADNc que codifica VH y VL de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de la presente invención, construyendo un vector de expresión de dsFv insertándolo en un vector de expresión apropiado, y provocando la expresión mediante la introducción del vector de expresión en E. coli, levadura o célula animal.

Diacuerpo es un fragmento de anticuerpo, en donde se forma un dímero de scFv que tiene la misma o diferente especificidad de unión al antígeno, y es un fragmento de anticuerpo que tiene actividad de unión al antígeno bivalente para el mismo antígeno o dos actividades de unión a antígenos específicos para diferentes antígenos. Por ejemplo, el diacuerpo bivalente que reacciona específicamente con el anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede producir adquiriendo ADNc que codifica VH y VL de un anticuerpo monoclonal de la presente invención, construyendo ADN que codifica scFv que tiene un enlazador peptídico de 3 a 10 residuos, insertando el ADN en un vector de expresión para la célula y provocando la expresión de diacuerpo al introducir el vector de expresión resultante en E. coli, levadura o célula animal.

Un anticuerpo monoclonal de la presente invención o una parte del mismo puede ser modificado en la medida en que se utiliza adecuadamente en la presente invención. Como una sustancia modificada, se pueden utilizar anticuerpos unidos a diversas moléculas, incluido polietilenglicol (PEG) o similares. La modificación realizada en el anticuerpo puede ser una modificación por introducción de enlace químico, o puede ser una modificación realizada en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Un anticuerpo monoclonal de la presente invención o una parte del mismo también abarca estas sustancias modificadas en anticuerpo. Para la obtención de sustancias modificadas en anticuerpo, el anticuerpo obtenido puede ser modificado. Estas técnicas han sido ya establecidas en la técnica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica la región variable pesada o la región variable ligera de un anticuerpo monoclonal humanizado (h1F3) de la presente invención. Preferiblemente, el polinucleótido de la presente invención tiene la secuencia de bases de cualquiera de SEQ ID: 29 ó 30. La presente invención también abarca polinucleótidos que se pueden hibridar con dicho polinucleótido en una condición rigurosa, y codifica un anticuerpo que tiene actividad equivalente con el anticuerpo de la presente invención.

El polinucleótido de la presente invención es un polímero que consiste en nucleótidos tales como varios ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN), en la medida en que codifiquen el anticuerpo de la presente invención. Éstos pueden incluir bases distintas de productos naturales. El polinucleótido de la invención puede estar disponible para la producción de anticuerpos de una manera de la tecnología genética. El polinucleótido de la invención puede ser también útil como sonda para el tamizado de anticuerpos que tienen actividad equivalente con el anticuerpo de la presente invención. Así, utilizando como sonda un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la presente invención o una parte del mismo, se puede obtener una técnica de aplicación tal como la técnica de hibridación o amplificación de genes, por ejemplo, PCR, ADN que puede hibridarse con dicho polinucleótido en la condición rigurosa y codifica el anticuerpo que tiene actividad de equivalencia con el anticuerpo de la presente invención. Estos ADNs también están abarcados en el polinucleótido de la presente invención.

Un anticuerpo monoclonal de la presente invención y una parte del mismo es útil como una composición farmacéutica. Por lo tanto, una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo monoclonal de la presente invención y una parte del mismo se pueden administrar de modo sistémico o tóxico por una vía oral o parenteral. Para la administración parenteral, se puede seleccionar, por ejemplo, inyección intravenosa tal como infusión por goteo, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, administración intranasal, inhalación o similares. Sin embargo, dado que es conocido que Pseudomonas aeruginosa se infligirá daños, particularmente a células del epitelio pulmonar y macrófagos de los alvéolos pulmonares por infección del tracto respiratorio (T. Sawa et al., Nature Medicine, 1999, vol. 5, pág. 392), se desean la administración intranasal y la inhalación.

Una composición farmacéutica de la presente invención se administra para la terapia de un paciente que padece fibrosis quística o infección por *Pseudomonas aeruginosa*. Por ejemplo, una dosis eficaz se selecciona en el intervalo de 0,01 mg a 100 mg por 1 kg de peso corporal de una sola vez. Alternativamente, se puede seleccionar una dosis de 1 a 1000 mg, preferiblemente una dosis de 5 a 50 mg por paciente. Sin embargo, una dosis de la composición farmacéutica que contiene el anticuerpo monoclonal de la presente invención o una parte del mismo no se limita a estas dosis. La duración de la administración se puede seleccionar apropiadamente dependiendo de la edad, síntoma o similar del paciente. La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir asimismo un soporte o aditivo farmacéuticamente aceptable dependiendo de la vía de administración.

Ejemplos de soportes y aditivos de este tipo incluyen agua, disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable, colágeno, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, alginato de sodio, dextrano soluble en agua, pectina, metilcelulosa, etil-celulosa, caseína, diglicerol, propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, albúmina de suero humano (HSA - siglas en inglés), manitol, sorbitol, lactosa y tensioactivos permitidos como un aditivo farmacéutico. Un aditivo para su uso se selecciona apropiadamente o se combina a partir de lo anterior, dependiendo de la forma de dosis, pero no se limita a ello.

El método para la preparación de anticuerpo monoclonal de ratón contra PcrV se explica por medio de los siguientes Ejemplos de Referencia.

Ejemplo de referencia 1

Preparación de Mab166 recombinante

Para realizar un experimento comparativo, Mab166 (Solicitud de Patente Japonesa N° 2005-500250 o similar) se preparó como un anticuerpo recombinante.

En primer lugar, el ARNm se extrae de hibridoma que produce un anticuerpo clasificado en una subclase de IgG2a, y regiones constantes de cadena H y cadena L se clonaron por el método de RT-PCR. Cada uno de los fragmentos amplificados por PCR se insertó en el sitio NheI-NotI del vector pcDNA3.1 (+) (disponible de Invitrogen Corporation), y se incorporó adicionalmente un sitio de clonación múltiple para permitir insertar un fragmento de ADN de parte de la región variable.

A continuación, después de dividir en cuatro la secuencia del gen de la cadena H y la cadena L de parte de la región variable de Mab166, se sintetizaron y re-asociaron el ADN sentido y el ADN anti-sentido de éstas. Se provocó mediante ADN ligasa la unión de fragmentos después de la re-asociación, y la clonación se realizó en la región de MfeI-BIpl para la cadena H, y en la región de EcoRV-BsiWI para la cadena L.

Vectores de la cadena H y de la cadena L que tienen secuencias de base identificadas se introdujeron en células HEK 239T utilizando Lipofectamine 2000 (disponible de Invitrogen Corporation), y después de 48 horas, se recogió un sobrenadante de cultivo celular. A partir del sobrenadante celular recogido, Mab166 recombinante se purificó a través de columna de proteína-G (disponible de PIERCE).

Ejemplo de referencia 2

Preparación del antígeno

Se extrajo ADN cromosómico de la cepa estándar PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*, proporcionada por la Universidad de Tokai, Japón, y el gen que codifica la proteína PcrV (SEQ ID NO: 2) se amplificó mediante PCR utilizando el ADN como un molde. Se proporcionó un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SphI en el cebador del lado 5' y se proporcionó un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII en el cebador del lado 3' (SEQ ID NOs: 3, 4), y se realizó un diseño en una inserción en un vector de expresión, de manera que la cisteína se inserta entre la etiqueta histidina y el codón de iniciación para el marcaje con biotina. El fragmento de PCR amplificado se clonó en el vector pWE30 (disponible de GE Healthcare) en los sitios SphI y HindIII. Después de la secuenciación, el vector se introdujo en *E. coli* JM109 para obtener *E. coli* recombinante (PcrV-JM109). PcrV-JM109 se cultivó en 500 mL de medio de cultivo líquido de LB/ampicilina a 37°C y, cuando la DO600 alcanzó 0,5, se añadieron 200 µl de IPTG 0,1 M. Después de cultivar a 37 °C durante 1,5 horas adicionales, las células bacterianas se centrifugaron y se añaden 15 mL de tampón A (Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), NaCl 0,5 M, MgCl₂ 2 mM) que contiene 0,5% de lisozima (disponible de Sigma). Después de la incubación a 0 °C durante 30 minutos, las células fueron tratadas mediante ultrasonidos. Después de la centrifugación, se obtuvo una fracción soluble, se sometió a Columnas His-Bind (disponibles de Novagen), y después se eluyó con tampón B (tampón fosfato 20 mM (pH 7,4), NaCl 500 mM) que contenía imidazol 200 mM. La fracción de elución final se dializó frente a tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) para sustituir el tampón.

Marcaje con biotina de antígeno

5 Proteína PcrV, expresada y purificada como se ha descrito arriba, se dejó que reaccionara en una disolución de mercapto-etilamina de una concentración final de 10 mM a 37 °C durante 150 minutos para reducir el residuo cisteína. Biotina activada con PEO-maleimida (disponible de PIERCE) se añadió en una cantidad de 20 veces por relación molar con respecto a grupos SH reducidos, y se dejó que reaccionara durante la noche a 4 °C, y luego se llevó a cabo una diálisis para separar la biotina que no había reaccionado.

Inmunización con antígeno

10 En cada caso 20 µg de antígeno de PcrV purificado fueron inmunizados por vía intraperitoneal con adyuvante completo de Freund a siete ratones Balb/c hembras de 4 semanas de edad. Se realizó una inmunización de refuerzo administrando 20 µg de PcrV con adyuvante incompleto de Freund después de 14 días y 35 días. Además, inmunización final se llevó a cabo después de 77 días mediante administración intraperitoneal de 20 µg de PcrV y administración en la vena de la cola de 10 µg de PcrV

Preparación de hibridoma

15 El bazo fue extirpado después de 3 días a partir de la inmunización final, y se recogieron células del bazo. Una célula de bazo y una célula de mieloma de ratón (P3 x 63 Ag8.U1, Tokyo mass research laboratory) se fusionaron utilizando polietilenglicol 4000 al 50%, y se seleccionaron en un medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina.

Selección de anticuerpo de PcrV

20 Después de 8 días desde la fusión celular, se rastrearon células productoras de anticuerpos específicos. El inmunoensayo utilizado en el tamizado era como sigue. A cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (disponible de Nunc) se añadieron 200 µL de tampón tris (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) que contiene 2 µg de anticuerpo IgG anti-ratón (disponible de Shibayagi) y se inmovilizaron durante 16 horas a 4°C. Estos pocillos se lavaron dos veces con 300 µl de disolución de lavado (solución salina que contiene Tween 20 al 0,1%), luego se añadieron 300 µl de BlockAce (disponible de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) y se dejó durante dos horas a temperatura ambiente. Después de lavar cada uno de los pocillos dos veces con 300 µl de disolución de lavado, 50 µl de sobrenadante de cultivo de hibridoma se diluyeron con 150 µl de tampón C (tampón tris 50 mM, pH 7,6 que contiene cloruro sódico al 0,9%, azida de sodio al 0,05%, albúmina de suero bovino al 0,5%, Tween 80 al 0,01% y ácido dietilentiámina-N,N,N',N',N"-penta-acético 50 µM) y se añadieron a cada pocillo, y se dejó que reaccionara durante la noche a 4°C. Después de lavar tres veces con 300 µl de disolución de lavado, se añadieron 200 µl de tampón C que contenía 10 ng de estreptavidina marcada con Eu (disponible de PERKIN ELMER) y 25 ng de PcrV marcada con biotina, y se dejó que reaccionara durante 1 hora a la temperatura ambiente. Después de la reacción, lavando tres veces con 300 µl de disolución de lavado, y se añadieron 200 µl de reactivo de potenciación (1,39 g/l de ftalato de potasio, 19,3 mg/l de óxido de tri-n-octilfosfina, 4,59 mg/l de 2-naftoiltrifluoroacetona, 1,0 g/l de Triton-X100, 6,0 g/l de ácido acético) y se midió la fluorescencia de resolución temporal.

35 A partir del resultado del tamizado, se seleccionaron 20 clones de hibridoma que exhibían una fuerte afinidad con PcrV recombinante, y la actividad inhibidora de citotoxicidad por *Pseudomonas aeruginosa* se examinó de acuerdo con el Ejemplo de referencia 5. Como resultado, la actividad inhibidora de citotoxicidad se observó en 10 clones, y estos clones fueron luego clonados dos veces por el método de dilución limitante, y de este modo se seleccionaron células de hibridoma. De los 10 clones obtenidos, se seleccionaron 4 clones que exhibían una alta actividad de inhibición de citotoxicidad, y se denominaron 1F3, 2A4, 6F5 y 7A7, respectivamente. Para estos anticuerpos, la subclase de anticuerpo se determinó utilizando el kit ELISA de isotipado por anticuerpo monoclonal de ratón (disponible de BD Biosciences), y se encontró que era 1F3 era IgG2a, 2A4 era IgG2b, 6F5 era IgG2a, 7A7 era IgG2a.

45 Células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales 1F3 y 2A4 se depositaron en el Instituto Nacional de Ciencia Industrial Avanzada y Tecnología, International Patent Organism Depository (Center N° 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, IBARAGI, JAPÓN) el 15 de enero de 2009, bajo los números de acceso de FERM ABP-11805 y FERM ABP-11806, respectivamente.

Ejemplo de referencia 3

Actividad de unión del anticuerpo

Para medir la actividad de unión de anticuerpos (1F3, 2A4, 6F5, 7A7) se realizó un inmunoensayo competitivo. A cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (disponible de Nunc) se añadieron 100 μ l de tampón de tris (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) que contienen 1,5 μ g de anticuerpo Fc anti-ratón (disponible de Jackson ImmunoResearch) y se inmovilizan durante 16 horas a 4°C. Estos pocillos se lavaron dos veces con 300 μ l de disolución de lavado, a continuación se añadieron 300 μ l de BlockAce (disponible de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) que incluye sacarosa al 10% y se dejaron durante dos horas a temperatura ambiente para lograr el bloqueo (placa en fase sólida de anticuerpo IgG anti-ratón). Después de lavar dos veces con 300 μ l de disolución de lavado, se añadieron 2 ng/pocillo de cada uno de anticuerpo y PcrV no marcada a cinco concentraciones en series de dilución de 10 veces a partir de 500 ng/pocillo. Después, se añadieron 5 ng/pocillo de PcrV biotinilada y se dejó reaccionar durante una noche. Después de lavar cuatro veces con 300 μ l de líquido de lavado y de añadir 100 μ l/pocillo de Reactivo de Potenciación (disponible de Wallac), la fluorescencia de resolución temporal se midió después de agitar durante 1 minuto. Como resultado, 1F3, 2A4, 7A7 y 6F5 mostraron fuerte actividad de unión frente a PcrV que Mab166 (Fig. 1).

Seguidamente, se determinó la afinidad de 1F3, 2A4, 6F5, 7A7 y Mab166 con PcrV mediante análisis de resonancia de plasmón superficial. Anticuerpo anti-ratón se inmovilizó sobre un chip sensor CM5 utilizando el kit de captura de anticuerpos de ratón (disponible de BIACORE). Secuencialmente, se capturó cada uno de los anticuerpos de PcrV. La PcrV recombinante se cargó en el instrumento BIAcore T100 con el chip sensor para determinar la afinidad.

Como resultado, cada clon mostró mayor afinidad que Mab166, según se evidencia a partir de la afinidad de $3,7 \times 10^{-10}$ para 1F3, la afinidad de $3,5 \times 10^{-10}$ para 2A4, la afinidad de $1,1 \times 10^{-10}$ para 6F5 y la afinidad de $1,1 \times 10^{-9}$ para 7A7, en contraposición con la afinidad de $3,0 \times 10^{-9}$ para Mab166 (Fig. 2).

Ejemplo de referencia 4

Inmunoensayo de sándwich con Mab166

Con el fin de demostrar que 1F3, 2A4, 6F5 y 7A7 tienen un epítipo diferente del de Mab166, se examinó inmunoensayo de tipo sándwich entre cada uno de los anticuerpos y Mab166.

En primer lugar, Mab166 se marcó con biotina. Cien μ g de Mab166 y 7,853 μ g de NHS-PEO4 Biotina (disponible de PIERCE) se mezclaron en PBS 0,1M (pH 7,4) y se dejó que reaccionara durante 2 horas en hielo. Después de ello, se llevó a cabo una cromatografía en gel (columna G2000SW (disponible de TOSOH)) para separar la biotina que no había reaccionado de la disolución de reacción.

El inmunoensayo de tipo sándwich se realizó como sigue. A cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (disponible de Nunc) se añadieron 100 μ l de disolución de PBS (-) que contiene en cada caso 500 μ g de anticuerpo de PcrV (1F3, 2A4, 6F5, 7A7) y se inmovilizó durante 16 horas a 4°C. Estos pocillos se lavaron una vez con 300 μ l de una disolución de lavado (solución salina que contiene Tween 20 al 0,01%), y luego se añadieron 300 μ l de BlockAce (disponible de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) y se dejó durante dos horas a temperatura ambiente para lograr el bloqueo. Después de lavar cada uno de los pocillos dos veces con 300 μ l de disolución de lavado, se añadieron 100 μ l de tampón de ensayo (disponible de Wallac) que contiene 50 μ g de PcrV y 50 ng de Mab166 marcado con biotina y se dejó que reaccionara durante la noche a 4°C. Después de lavar cuatro veces con disolución de lavado, se añadieron 100 μ l de tampón de ensayo que contenía 50 ng de estreptavidina marcada con Eu (disponible de Wallac), y se dejó que reaccionara durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con disolución de lavado y de añadir 100 μ l de reactivo de potenciación, de agitar durante 1 minuto, y luego se midió la fluorescencia de resolución temporal.

Como resultado, el inmunoensayo de tipo sándwich era posible entre cualquiera de 1F3, 2A4, 6F5 y 7A7 y Mab166, de modo que se reveló que los presentes anticuerpos tenían epítipos diferentes del de Mab166 (Fig. 3).

Ejemplo de referencia 5

Medición de la actividad inhibidora de citotoxicidad

Para 1F3, 2A4, 6F5 y 7A7 se midió la actividad inhibidora de citotoxicidad. El método es el siguiente.

En primer lugar, 1F3, 2A4, 6F5, 7A7 se diluyeron en serie de dilución doble de 32 μ g/ml, y se dispensaron 10 μ l a cada uno de los pocillos de una microplaca de 96 pocillos. A continuación, células de mieloma de ratón P3U1 (de ATCC) se ajustaron a 5×10^6 células/ml o la línea celular U937 de leucocitos humana U937 (de ATCC) se ajustó a 1×10^6 células/ml en un medio de cultivo celular (RPMI1640 que contiene hidrógeno-carbonato de sodio, y que no contiene L-glutamina y rojo fenol (disponible de Sigma)), y en cada caso se añadieron 100 μ l de suspensión celular a

la microplaca de 96 pocillos. Además, la cepa SR24 de *Pseudomonas aeruginosa* cultivada durante la noche en caldo de Mueller Hinton ajustado en cationes (Difco) se ajustó a 1×10^8 ufc/ml en un medio de cultivo celular, y se añadió en una cantidad de 10 µl/pocillo, y se cultivó durante 3 horas a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Después de agitar durante 3 horas, se añadieron en cada caso 10 µl de WST-8 (disponible de Kishida Chemical Co., Ltd.) y se cultivaron a 37°C en presencia de 5% de CO₂ durante 3 horas para el caso de células de mieloma P3U1, o durante 1 hora para el caso de células U937. Después de la compleción del cultivo, la absorbancia se midió a 450 nm.

Como resultado, cuando se utilizaron células U937 de leucocitos, la actividad inhibidora de citotoxicidad (CI50) era de 5,3 nM para 1F3, de 20,7 nM para 2A4, de 12,7 nM para 6F5 y de 14,7 nM para 7A7, en contraposición con más de 213 nM para Mab166, y cuando se utilizaron células de mieloma U3P1, la actividad inhibidora de citotoxicidad (CI50) era de 4,0 nM para 1F3, de 16 nM para 2A4, de 7,3 nM para 6F5 y de 6,0 nM para 7A7 en contraposición con 54 nM para Mab166. Es decir, 1F3, 2A4, 6F5 y 7A7 tenían mayor actividad inhibidora de citotoxicidad para ambas células que Mab 166 que se ha descrito previamente (Frank et al., *The Journal of Infectious Diseases*, 2002, vol. 186, pág. 66) (Fig. 4 y Fig. 5).

15 Ejemplo de referencia 6

Preparación de PcrV truncada

PcrV truncada (136-233) se preparó de la siguiente manera.

Un fragmento amplificado por PCR con cebador en el lado 5' GCTCGAGGATCCCAAGGCGCTGACCGC (SEQ ID NO: 5) y cebador en el lado 3' GTTAAGCTTCTCGAAGGGGTACTC (SEQ ID NO: 6) utilizando pQE30-PcrV que es un plásmido de expresión de proteína del antígeno de PcrV como molde se trató con enzimas de restricción BamHI y HindIII, y se insertó en pET32b (disponible de Novagen). Después de la secuenciación, el vector se introdujo en la cepa BL21-DE3 de *E. coli* para obtener *E. coli* recombinante (PcrV-BL21 truncada). Esta cepa de expresión se pre-cultivó durante todo un día y la noche a 37°C en 2 ml de medio de cultivo líquido de LB/ampicilina. Dos ml de líquido de pre-cultivo se añadieron a 500 ml de medio de cultivo líquido de LB/ampicilina y se cultivaron a 37°C, y cuando la DO600 alcanzó 0,5, el líquido de cultivo se mantuvo todavía durante 30 minutos en hielo. Se añadió IPTG a una concentración final de 0,75 mM, y se cultivaron a 160 rpm en una incubadora con agitador rotatorio a 15°C durante todo un día y la noche. Las células bacterianas se recogieron por centrifugación del líquido de cultivo a 4°C, \times 5000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se separó, y al sedimento se añadieron 10 ml de Tampón X (Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM) que contenía lisozima al 0,1% (disponible de Sigma), y se suspendió, se dejó todavía en hielo durante 1 hora y, a continuación, se sometió a ultrasonidos bajo enfriamiento en hielo. A continuación, una fracción soluble se aplicó a una columna de Ni-NTA rellena de agarosa (Quiagen), y se eluyó con Tampón Y (Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, imidazol 200 mM). La fracción eluida se dializó con tampón fosfato 10 mM (pH 7,4).

Determinación de la región de epítipo

A cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (disponible de Nunc) se añadieron 150 µl de tampón tris (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) que contenía 1,5 µg de anticuerpo Fc IgG anti-ratón (disponible de Jackson ImmunoResearch) y se inmovilizó durante 16 horas a 4°C. Estos pocillos se lavaron dos veces con 300 µl de una disolución de lavado (solución salina que contiene Tween 20 al 0,01%), a continuación se añadieron 300 µl de disolución de bloqueo (Tris-HCl 500 mM pH 7,5, BlockAce al 2% (disponible de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.), 10% de sacarosa) y se dejaron durante dos horas a temperatura ambiente para bloquear a cada uno de los pocillos (placa inmovilizada con anticuerpo IgG anti-ratón). Después de lavar cada uno de los pocillos pocillo una vez con 300 µl de líquido de lavado, a cada uno de los pocillos se añadieron 50 µl de solución de anticuerpo de PcrV diluido en una concentración de 80 ng/ml con Tampón C (tampón tris 50 mM que contenía cloruro sódico al 0,9%, azida de sodio al 0,05%, albúmina de suero bovino al 0,5%, Tween 80 al 0,01% y 25 µM de ácido dietilentriamina-N,N,N',N',N"-penta-acético, pH 7,6), seguido de 50 µl de disolución de estreptavidina marcada con Eu (disponible de PERKIN ELMER) diluida en una concentración de 200 ng/ml con tampón C, 100 µl de proteína PcrV truncada diluida en una concentración dada con tampón de ensayo DELFIA y se dejó que reaccionara a 4°C durante la noche. Después de lavar tres veces con 300 µl de disolución de lavado, se añadieron 200 µl de un reactivo de potenciación (1,39 g/l de ftalato de potasio, 19,3mg/l de óxido de tri-n-octilfosfina, 4,59 mg/l de 2-naftioiltrifluoroacetona, 1,0 g/l de Triton X100, 6,0 g/l de ácido acético), y se midió la fluorescencia de resolución temporal (Fig. 6).

Como resultado, los anticuerpos de PcrV 1F3, 2A4, 9D12, 12H9 y m166 de KaloBios Pharmaceuticals, Inc. utilizados como un ejemplo de referencia, exhibían reactividad con PcrV de longitud completa (1-294). Por otro lado, mientras que 1F3 y 2A4 mostraron reactividad con PcrV (136-233), m166, así como 9D12 y 12H9 que carecen de actividad neutralizante, no mostraron reactividad.

También se realizó el análisis de unión por transferencia Western. Proteína PcrV purificada recombinante se aplicó a SDS-PAGE, y luego se transfirió a una membrana de PVDF. La membrana transferida se bloqueó con Block Ace (disponible de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) a temperatura ambiente durante 2 horas bajo agitación. Disolución de anticuerpo de PcrV diluida en 1 µg/mL se añadió a la membrana, se dejó que reaccionara durante la noche a 4°C, y después se lavó con tampón de lavado B (tampón fosfato 10 mM (pH 7,4), Tween 20 al 0,05%). Como anticuerpo secundario se añadió a la membrana, anticuerpo IgG anti-ratón marcado (disponible de GE Healthcare), y se dejó que reaccionara durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de ello, la membrana se lavó con tampón de lavado B, y la señal se detectó mediante el sistema ECL Plus Western Blot Detection System (disponible de GE Healthcare) y se visualizó mediante LAS-1000 (disponible de FUJIFILM) (Fig. 7). Mientras que los anticuerpos de neutralización de PcrV 1F3 y 2A4 reaccionaban tanto con PcrV de longitud completa y como con PcrV truncada, m166, así como 9D12 y 12H9 reaccionaban sólo con PcrV de longitud completa, y no reaccionaban con PcrV truncada.

Esto demostró que la región de epítipo de anticuerpos de neutralización de PcrV 1F3 y 2A4 era una región correspondiente a los residuos de aminoácidos 136-233, y m166, 9D12 y 12H9 no tienen exclusivamente una región de epítipo correspondiente a los residuos aminoácidos 136-233.

Ejemplo de referencia 7

Correlación entre la región específica de la proteína PcrV y la fuerza de la citotoxicidad

Utilizando la proteína PcrV de longitud completa (SEQ ID NO: 1) y la proteína PcrV truncada (que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 136 a 233 en SEQ ID NO: 1), el ensayo de supresión de la actividad inhibidora de citotoxicidad en 1F3, 2A4 y m166 se llevó a cabo de la siguiente manera.

En primer lugar, 1F3, 2A4 y m166 se diluyeron mediante dilución doble en serie partiendo de 200 nM, 200 nM y 400 nM, respectivamente, y 10 µl de estos anticuerpos se añadieron a la placa de 96 pocillos. En este ensayo, el intervalo de concentración de ensayo de 1F3, 2A4 y m166 se ajustó a 1,56-6,25 nM, 6,25-25 nM y 50-200 nM, respectivamente. Para cada uno de los intervalos de concentración de ensayo, en cada caso 10 µl de proteína PcrV de longitud completa o proteína PcrV truncada se añadieron en relaciones molares de 30, 10, 3, 1 y 0,3 veces a la placa de 96 pocillos, y se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se prepararon células de mieloma P3U1 en 5×10^6 células/ml en medio de cultivo celular (RPMI1640 que contiene hidrógeno-carbonato de sodio, y que no contenía L glutamina ni rojo fenol (disponible de Sigma)), y en cada caso 70 µl se añadieron a la microplaca de 96 pocillos. Además, un líquido bacteriano de la cepa SR24 de *Pseudomonas aeruginosa*, cultivado durante la noche en caldo de Mueller Hinton (Difco) ajustado a 1×10^8 ufc/mL con un medio de cultivo celular se añadió en una cantidad de 10 µl/pocillo, y se cultivó durante 3 horas a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Después de un lapso de 3 horas, se añadieron en cada caso 10 µl de WST-8 (disponible de Kishida Chemical Co., Ltd.), y se cultivaron a 37°C en presencia de 5% de CO₂ durante 3 horas. Después de la compleción del cultivo, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm.

Como resultado, cuando no se añadió proteína PcrV, 1F3 y 2A4 exhibían mayor actividad inhibidora de citotoxicidad que m166. Por otro lado, cuando se añadió proteína PcrV de longitud completa, los efectos de inhibición de todos los anticuerpos anti-PcrV fueron suprimidos de una manera dependiente de la dosis de PcrV (Fig. 8). Cuando se añadió proteína PcrV truncada, aunque las actividades inhibidoras de 1F3 y 2A4 también fueron suprimidas de una manera dependiente de la dosis, la actividad inhibidora de m166, que no tiene el epítipo, no cambió (Fig. 9).

A partir de estos resultados, se puede considerar que anticuerpos que reconocen un epítipo en los residuos aminoácidos 136-233 (1F3 y 2A4) tienen una mayor actividad inhibidora de citotoxicidad que los anticuerpos que no reconocen el epítipo (m166). En otras palabras, se puede concluir que la actividad inhibidora de citotoxicidad depende de la región del epítipo reconocida por el anticuerpo de PcrV, y el anticuerpo que reacciona solamente con la región 136-233 de la proteína PcrV tiene una fuerte actividad neutralizante.

Ejemplo de referencia 8

Análisis de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal de ratón contra PcrV humana (1F3 y 2A4)

A partir de las células de hibridoma establecidas, el ARN se extrajo utilizando el Mini Kit RNeasy (disponible de QIAGEN). A partir de 1 µg de ARN extraído, el fragmento de ADN se amplificó utilizando el Sistema 5'RACE para la Amplificación Rápida de extremos de ADNc, Versión 2.0 (disponible de Invitrogen). En este momento, los cebadores utilizados para la síntesis de ADNc eran TAGAGTCACCGAGGAGCCAGTTGT (SEQ ID NO: 7) para 1F3 y TCCAGAGTTCCAAGTCACAGTCAC (SEQ ID NO: 8) para 2A4. Los cebadores utilizados en el método 5'RACE eran AGGGGCCAGTGGATAGACCGATGGGGCTGT (SEQ ID NO: 9) para 1F3 y

AGGGGCCAGTGGATAGACTGATGGGGGTGT (SEQ ID NO: 10) para 2A4. Los fragmentos amplificados se clonaron mediante el Kit de Clonación TOPO TA (disponible de Invitrogen), y se secuenciaron mediante el Analizador Genético Applied Biosystems 3130 (disponible de Applied Biosystems). El resultado del análisis se muestra en la Fig. 10 para 1F3 y en la Fig. 11 para 2A4. Como resultado del rastreo de homología de la secuencia de aminoácidos de una región variable utilizando la base de datos de aminoácidos del anticuerpo, la Secuencia de Proteínas de Interés Inmunológico (Depto. de EE.UU. de Salud y Servicios Humanos, 1983) producido por Kabat, la región determinante de complementariedad en la región variable pesada de 1F3 es SFTSYWMH (SEQ ID NO: 15), INPSNGRRTNYNEKFNT (SEQ ID NO: 16) e YGNYVVYYTMDY (SEQ ID NO: 17): aquella en la región variable ligera es SASTSVSYME (SEQ ID NO: 18), TTSKLAS (SEQ ID NO: 19) y HQWRNYPFT (SEQ ID NO: 20). Como resultado del rastreo de una manera similar, la región determinante de complementariedad en la región variable pesada de 2A4 es SITSDYAWN (SEQ ID NO: 21), YITYNGDTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 22) y SRNYGAWFAY (SEQ ID NO: 23): aquella en la región variable ligera es KASQYVGTVA (SEQ ID NO: 24), RASTRHT (SEQ ID NO: 25) y QQYCSSLT (SEQ ID NO: 26).

La presente invención se explicará concretamente por medio de los siguientes Ejemplos no limitativos.

15 Como una técnica de preparación de anticuerpo, se utilizaron métodos descritos en Inmunoquímica en la práctica (Blackwell Scientific Publications) a menos que se especifique lo contrario.

Como una técnica de ingeniería genética, métodos descritos en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Cold Spring Harbor Laboratory) se usaron a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1

20 (1) Humanización del anticuerpo monoclonal de ratón 1F3

Para la humanización del anticuerpo monoclonal de ratón (1F3), preparado como se describe arriba, CDRs de un anticuerpo de ratón se injertaron en las secuencias aceptoras de línea germinal humana.

25 Específicamente, se utilizó el programa IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) para rastrear una secuencia aceptora de la línea germinal humana que muestra la mayor homología con la secuencia de aminoácidos de la región V del gen de cada una de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de ratón. Para la región J del gen, se seleccionó a partir de IMGt (<http://imgt.cines.fr/>) una secuencia altamente homóloga a la secuencia de ADN del anticuerpo de ratón.

30 Como resultado del rastreo, el nombre de gen de IMGt; IGHV1-46*01 se obtuvo como la secuencia del gen de anticuerpo que se deriva de una secuencia aceptora de la línea germinal humana y muestra la mayor homología con la región V del gen de la cadena pesada del anticuerpo de ratón, y el nombre de gen de IMGt; IGHJ6*01 como la secuencia de gen de anticuerpo que se deriva de una secuencia aceptora de la línea germinal humana y muestra la mayor homología con la región J del gen; estas secuencias se utilizaron como la secuencia de marco humana para injertar la cadena pesada. De una manera similar, el nombre de gen de IMGt; IGKV1-9*01 se obtuvo como la secuencia del gen de anticuerpo que se deriva de una secuencia aceptora de la línea germinal humana y muestra la mayor homología con la región V del gen de la cadena ligera del anticuerpo de ratón, y el nombre del gen de IMGt; IGKJ2*02 como la secuencia de gen de anticuerpo que se deriva de una secuencia aceptora de la línea germinal humana y muestra la mayor homología con la región J del gen; estas secuencias se utilizaron como la secuencia de marco humana para injertar la cadena ligera.

40 Subsiguientemente, las cadenas pesadas CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y las cadenas ligeras CDRL1, CDRL2 y CDRL3 del anticuerpo de ratón se definieron por la numeración de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Numeración de Kabat (Wu, T.T. y Kabat, E.A., J. Exp. Med. Ago1; 132 (2): 211-50. (1970)). Estas regiones CDR se injertaron en las secuencias de marco humanas, que luego fueron diseñadas como un anticuerpo humanizado molde. La diferencia entre el anticuerpo humanizado molde así diseñado y la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de ratón se confirmó en el número de secuencia de aminoácidos

45 H5, H7, H11, H12, H20, H38, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H75, H78, H81, H83, H87, H93, H94, H108, L1, L3, L9, L10, L11, L15, L17, L18, L19, L21, L40, L42, L43, L46, L70, L71, L72, L78, L79, L80, L83, L85 y L100 de acuerdo con la numeración de Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196:901-917, Chothia, C. et al., Nature, 342:877-883. (1989)).

50 Para identificar los sitios de mutación somática en el anticuerpo de ratón, se rastreó la secuencia de aminoácidos de la región V del gen de cada una de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de ratón utilizando IgBLAST y, como resultado, se obtuvieron el nombre de Gen; J558.33 y el nombre de Gen; IGKV4-80*01 como las secuencias de

cadena pesada y ligera más homólogas, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la región D del gen de la cadena pesada del anticuerpo de ratón fue rastreada utilizando IgBLAST, y se obtuvo el nombre de Gen; IGHD2-1*01 como la secuencia de cadena pesada más homóloga. La secuencia de ADN de la región J del gen de cada una de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de ratón fue rastreada utilizando IMGT, y se obtuvieron el nombre de gen IMGT; IGHJ4*01 y el nombre de gen IMGT; IGKJ4*01 como las secuencias de las cadenas pesada y ligera más homólogas, respectivamente. Estas secuencias de la línea germinal del ratón se compararon con el anticuerpo de ratón, y los residuos con diferentes cadenas laterales se definieron como los sitios de mutación somática, entre los que se confirmó que H93, H94, L9 y L46 tenían diferentes cadenas laterales entre el anticuerpo del ratón y el anticuerpo humanizado molde.

H71 y H94 fueron confirmadas como las cadenas laterales canónicas (<http://www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html>) que difieren entre el anticuerpo de ratón y el anticuerpo humanizado molde. Entre las cadenas laterales que difieren entre el anticuerpo de ratón y el anticuerpo humanizado molde, las situadas en la zona de Vernier (Foote et al., J. Mol. Biol., 224,487 (1992)) eran H48, H67, H69, H71, H78, H93, H94, L46 y L71. No se identificó residuo de empaque entre cadenas alguno que difiere entre el anticuerpo de ratón y el anticuerpo humanizado molde. Tomados estos resultados en conjunto, los autores de la invención diseñaron un anticuerpo humanizado mutante en el que las cadenas laterales de aminoácidos en H48, H67, H69, H71, H78, H93, H94, L9, L46 y L71 del anticuerpo humanizado molde están todos reemplazados por los del anticuerpo de ratón (retromutaciones). Se diseñaron secuencias de ADN en las que la secuencia de la región constante de IgG4Pro humana se conjuga como la secuencia de región constante de la cadena pesada, y la secuencia de la región constante Igkappa humana se conjuga como la secuencia de región constante de la cadena ligera para las regiones variables del anticuerpo humanizado molde arriba diseñadas (Fig. 12; Molde) y el anticuerpo humanizado mutante (Fig. 12; Retromutación). Se utilizó cada una de las secuencias de ADN para construir un plásmido que expresa la cadena pesada del anticuerpo humanizado molde (Fig. 13; HT), un plásmido que expresa la cadena ligera del anticuerpo humanizado molde (Fig. 13; LT), un plásmido que expresa la cadena pesada del anticuerpo humanizado mutante (Fig. 13; HB), o un plásmido que expresa la cadena ligera del anticuerpo humanizado mutante (Fig. 13; LB), de acuerdo con el método descrito a continuación.

(2) Preparación del vector para expresar genes de anticuerpos

Inicialmente, el residuo serina en la posición 228 fue reemplazado por prolina para prevenir la escisión del enlace S-S en la región de bisagra (Angal et al., 1993, Mol. Immunol. 30 (1):105-108, Schuurman et al, 2001, Mol. Immunol., 38:1-8.), y el ADN de la región constante de IgG4 se dividió en cuatro partes, para las cuales se sintetizaron y reasociaron ADNs sentido y antisentido. Los fragmentos reasociados se ligaron utilizando ADN ligasa y se insertaron en el vector pcDNA3.1(+) (Invitrogen) en los sitios NheI/NotI. También se incorporó un sitio de multiclonación, de manera que se puede insertar un fragmento de ADN de la región variable.

A continuación, las secuencias de genes de las cadenas pesada y ligera de la región variable del anticuerpo de PcrV humanizado fueron respectivamente divididas en cuatro, y sus ADNs sentido y antisentido fueron sintetizados y reasociados. Los fragmentos reasociados se ligaron utilizando DNAligase y las cadenas pesada y ligera ligadas se clonaron en las regiones MfeI/BlnI y EcoRV/BsiWI, respectivamente. A continuación, se confirmaron las secuencias de nucleótidos de los anticuerpos.

Un anticuerpo quimérico de ratón-humano 1F3 se preparó como una referencia positiva de la humanización de anticuerpos. La secuencia de la región constante IgG4Pro humana se diseñó en una cadena pesada de la región variable de un anticuerpo de ratón como la secuencia de la región constante de la cadena pesada, y se construyó un plásmido de expresión utilizando el método descrito a continuación para obtener un plásmido que expresa la cadena pesada del anticuerpo quimérico de ratón/ser humano (Fig. 13; quimera H). Una secuencia de ADN de conjugado de la secuencia de la región constante Igkappa humana se diseñó en una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo de ratón como la secuencia de la región constante de la cadena ligera, y se construyó un vector de expresión utilizando el método descrito anteriormente para obtener un plásmido que expresa la cadena ligera del anticuerpo quimérico de ratón/ser humano (Fig. 13; quimera L). Los plásmidos de expresión de las cadenas pesada y ligera se co-transfectaron en el cultivo celular de mamífero con una cualquiera de las combinaciones de los plásmidos que expresan las cadenas pesada y ligera del anticuerpo quimérico de ratón-ser humano; los plásmidos que expresan las cadenas pesada y ligera del anticuerpo humanizado molde; los plásmidos que expresan la cadena pesada del anticuerpo humanizado molde y la cadena ligera del anticuerpo humanizado mutante; los plásmidos que expresan la cadena pesada del anticuerpo humanizado mutante y la cadena ligera del anticuerpo humanizado molde; y los plásmidos que expresan la cadena pesada del anticuerpo humanizado mutante y la cadena ligera del anticuerpo humanizado mutante. Cada uno de los sobrenadantes del cultivo se utilizaron para determinar la afinidad con el antígeno PcrV recombinante mediante análisis de resonancia de plasmón superficial (BIAcoreT-100, GE Healthcare) (Fig. 13).

El valor KD del anticuerpo quimérico de ratón-ser humano, obtenido mediante el análisis de afinidad, era $2,6 \times 10^{-10}$ M. El valor KD del anticuerpo, incluidas las cadenas pesada y ligera del anticuerpo humanizado molde era $2,2 \times 10^{-7}$ M; y el del anticuerpo que incluye la cadena pesada del anticuerpo humanizado molde y la cadena ligera del anticuerpo humanizado mutante era $6,5 \times 10^{-7}$ M, confirmando que la afinidad se redujo significativamente. En
 5 contraposición, el valor KD del anticuerpo, incluida la cadena pesada del anticuerpo humanizado mutante y la cadena ligera del anticuerpo humanizado molde, era $3,3 \times 10^{-10}$ M, y la del anticuerpo, incluidas las cadenas pesada y ligera del anticuerpo humanizado mutante, era $3,4 \times 10^{-10}$ M, lo que indica que estos anticuerpos retienen la afinidad próxima a la del anticuerpo quimérico de ratón-ser humano. A partir de estos resultados, los autores de la invención concluyeron que la cadena pesada del anticuerpo humanizado mutante es crítica para la retención de la
 10 afinidad y que la cadena ligera del anticuerpo humanizado molde o el anticuerpo humanizado mutante se puede utilizar sin alterar la afinidad. Por lo tanto, para la cadena ligera, los autores de la invención seleccionaron la cadena ligera del anticuerpo humanizado molde, que está más estrechamente relacionada con la secuencia derivada de la línea germinal humana. Para la cadena pesada, se preparó un anticuerpo humanizado en el que cada una de las retromutaciones de las cadenas laterales de aminoácidos en H48, H67, H69, H71, H78, H93 y H94 revirtieron a las de la secuencia derivada de la línea germinal humana, respectivamente, y la afinidad con el antígeno se evaluó mediante análisis de resonancia de plasmón superficial (Fig. 14). Como resultado, el anticuerpo humanizado en el que Val en H93 está reemplazado por Ala mostró el valor KD de $1,0 \times 10^{-9}$ M, y el anticuerpo humanizado en el que Leu en H94 está reemplazado por Arg mostró el valor KD de $3,2 \times 10^{-7}$ M. A pesar de que estos anticuerpos mostraron una afinidad reducida, no se observó reducción significativa alguna en la afinidad en los otros anticuerpos
 15 humanizados retro-mutados a los de la secuencia derivada de la línea germinal humana.

Estos resultados han verificado la secuencia del anticuerpo humanizado utilizando la secuencia derivada de anticuerpo de ratón para H93 y H94, y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal humana para H48, H67, H69, H71 y H78 (Figs. 15 y 16). Un anticuerpo que tiene esta secuencia se preparó de acuerdo con el método descrito a continuación en (3), y su afinidad se confirmó mediante análisis de resonancia de plasmón superficial.
 20 Como resultado, se ha confirmado que este anticuerpo tiene la misma afinidad que el anticuerpo de ratón (Fig. 17).

(3) Preparación de anticuerpo recombinante

Los genes de las cadenas pesada y ligera, preparados como el método arriba descrito, se transfectaron en células HEK293F utilizando Lipofectamine2000 (Invitrogen). Después de 72 horas, se recogió el sobrenadante celular. El anticuerpo recombinante se purificó mediante columna de afinidad de Proteína G (PIERCE) a partir del
 30 sobrenadante celular recogido.

Ejemplo 2

Un ensayo de actividad inhibidora citotóxica se realizó en m1F3 (anticuerpo de ratón), h1F3 (anticuerpo humanizado) y m166. El método es el siguiente:

Inicialmente, m1F3, h1F3 y m166 se diluyeron mediante dilución doble en serie partiendo con 200 nM, 200 nM y 800 nM, respectivamente. Cada una de las diluciones (10 μ l) se dispuso en los pocillos de una microplaca de 96 pocillos. A continuación, las células de mieloma U3P1 o células U937 se prepararon a una densidad celular de 5×10^6 ó 1×10^6 células/ml, respectivamente, mediante el uso de un medio de cultivo celular (PRMI1640 (producido por Sigma Corporation), que contiene hidrógeno-carbonato de sodio y que no contiene L-glutamina ni rojo de fenol) y en cada caso 70 μ l de la suspensión se añadieron a la microplaca de 96 pocillos. Subsiguientemente, la cepa SR24 de Pseudomonas aeruginosa, cultivada durante la noche en Caldo de Mueller Hinton Broth (Difco) ajustado en cationes se preparó en la densidad celular de 1×10^8 ufc/ml en el medio de cultivo celular, se añadió al pocillo en una cantidad de 10 μ l/pocillo, y se cultivó durante 3 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Tres horas más tarde, se añadieron en cada caso 10 μ l de WST-8 (producido por Kishida Chemical Co., Ltd.), y se continuó el cultivo durante 1 hora a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Después de haberse completado el cultivo, se determinó la absorbancia en la longitud de onda de 450 nm. Los resultados demostraron que la actividad citotóxica (CI50) de m166 era 98,4 nM, mientras que m1F3 y h1F3 mostraron 1,4 nM y 1,5 nM, respectivamente, cuando se utilizaron células U937 (Fig. 18), y m166 mostró 85,4 nM, mientras que m1F3 y h1F3 mostraron 1,5 nM y 1,3 nM, respectivamente, cuando se utilizaron las células de mieloma (Fig. 19). Por lo tanto, las actividades inhibidoras citotóxicas de m1F3 y h1F3 eran casi las mismas, y mostraron mayor actividad que m166.
 45

50 Aplicabilidad industrial

El anticuerpo monoclonal humanizado de la presente invención o una parte del mismo no sólo tenía una alta afinidad con PcrV, sino que también exhibía una fuerte actividad inhibidora sobre la citotoxicidad a células eucariotas de Pseudomonas aeruginosa. Por lo tanto, la composición farmacéutica que contiene el anticuerpo monoclonal o una

parte del mismo es útil como un fármaco terapéutico para la infección relacionada con *Pseudomonas aeruginosa*, que se considera actualmente como difícil de ser tratada en el sector médico.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	SHIONOGI., LTD
5	<120>	Anticuerpo PcrV humanizado con actividad anti-pseudomonas
	<130>	CMD/FP6784789
	<140>	EP 10750805.3
10	<141>	2010-03-09
	<150>	PCT/JP2010/053828
	<151>	2010-03-09
	<150>	JP2009-057929
	<151>	2009-03-11
15	<160>	30
	<170>	PatentIn version 3.1
	<210>	1
20	<211>	294
	<212>	PRT
	<213>	Pseudomonas aeruginosa
	<400>	1

ES 2 529 734 T7

Ala Leu Leu Ser Asn Leu Asp Thr Phe Ser Gly Lys Leu Ser Ile Lys
 195 200 205

Asp Phe Leu Ser Gly Ser Pro Lys Gln Ser Gly Glu Leu Lys Gly Leu
 210 215 220

Ser Asp Glu Tyr Pro Phe Glu Lys Asp Asn Asn Pro Val Gly Asn Phe
 225 230 235 240

Ala Thr Thr Val Ser Asp Arg Ser Arg Pro Leu Asn Asp Lys Val Asn
 245 250 255

Glu Lys Thr Thr Leu Leu Asn Asp Thr Ser Ser Arg Tyr Asn Ser Ala
 260 265 270

Val Glu Ala Leu Asn Arg Phe Ile Gln Lys Tyr Asp Ser Val Leu Arg
 275 280 285

Asp Ile Leu Ser Ala Ile
 290

<210> 2

<211> 885

<212> ADN

5 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 2

atggaagtca gaaaccttaa tgccgctcgc gagctgttcc tggacgagct cctggccgcg 60
 tcggcggcgc ctgccagtgc cgagcaggag gaactgctgg ccctgttgcg cagcgagcgg 120
 atcgtgctgg cccacgccgg ccagccgctg agcgagggcgc aagtgctcaa ggcgctcgcc 180
 tggttgctcg cggccaatcc gtccgcgcct ccggggcagg gcctcgaggt actccgcgaa 240
 gtctgcagc cactgcggca gcccgggtgc cagtgggatc tgcgcgagtt cctggtgtcg 300
 gcctatttca gcctgcacgg gcgtctcgac gaggatgtca tcggtgtcta caaggatgtc 360
 ctgcagacc aggacggcaa gcgcaaggcg ctgctcgacg agctcaaggc gctgaccgcg 420
 gagttgaagg tctacagcgt gatccagtcg cagatcaacg ccgcgctgtc ggccaagcag 480
 ggcatcagga tcgacgctgg cggatcgcg ctggctcgacc ccacgctata tggctatgcc 540
 gtcggcgatc ccaggtggaa ggacagcccc gagtatgcgc tgctgagcaa tctggatacc 600
 ttcagcggca agctgtcgat caaggatttt ctcagcggct cgccgaagca gagcggggag 660
 ctcaagggcc tcagcgatga gtacccttc gagaaggaca acaaccgggt cggcaatttc 720
 gccaccacgg tgagcgaccg ctcgctccg ctgaacgaca aggtcaacga gaagaccacc 780
 ctgctcaacg acaccagctc ccgctacaac tcggcggctcg aggcgctcaa ccgcttcac 840
 cagaaatcgc acagcgtcct gcgcgacatt ctcagcgcga tctag 885

	<210>	3		
	<211>	33		
	<212>	ADN		
	<213>	cebador		
5	<400>	3		
		attgcatgca tggaagtcag aaaccttaat gcc		33
10	<210>	4		
	<211>	33		
	<212>	ADN		
	<213>	Artificial		
15	<220>			
	<223>	cebador		
	<400>	4		
		tatttcgaag atctagcgcg actcttacag cgc		33
20	<210>	5		
	<211>	27		
	<212>	ADN		
	<213>	Artificial		
25	<220>			
	<223>	cebador		
	<400>	5		
		gctcggaggat cccaaggcgc tgaccgc		27
30	<210>	6		
	<211>	23		
	<212>	ADN		
	<213>	Artificial		
35	<220>			
	<223>	cebador		
	<400>	6		
40		gttaagcttc tcgaagggta ctc		23
45	<210>	7		
	<211>	24		
	<212>	ADN		
	<213>	Artificial		
	<220>			
	<223>	cebador		
50	<400>	7		
		tagagtcacc gaggagccag ttgt		24
55	<210>	8		
	<211>	24		
	<212>	ADN		
	<213>	Artificial		
	<220>			
	<223>	cebador		
60				

<400> 8
tccagagttc caagtcacag tcac 24

5 <210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 9
aggggccagt ggatagaccg atggggctgt 30

15 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 10
aggggccagt ggatagactg atgggggtgt 30

25 <210> 11
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> VH de Anticuerpo 1F3

35 <400> 11

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

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

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Asn Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Leu Tyr Gly Asn Tyr Val Val Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly

ES 2 529 734 T7

100

105

110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
<211> 109
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> VL de Anticuerpo 1F3

10 <400> 12

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

Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Thr Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Arg Asn Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp
100 105

15 <210> 13
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> VH de Anticuerpo 2A4

<400> 13

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

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

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

ES 2 529 734 T7

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

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ala Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Ser Cys
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Asn Tyr Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

5 <210> 14
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> VL de Anticuerpo 2A4
<400> 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Asn Tyr Lys Ala Ser Gln Tyr Val Gly Thr Thr
20 25 30

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

Tyr Arg Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Tyr Leu Glu Val Lys Arg Ala Asp
100 105 110

15 <210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> CDR1 de la cadena pesada de 1F3

<400> 15

Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
1 5

5 <210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CDR2 de la cadena pesada de 1F3

<400> 16

Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Asn Thr
1 5 10 15

15 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> CDR3 de la cadena pesada de 1F3

<400> 17

Tyr Gly Asn Tyr Val Val Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

25 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> CDR1 de la cadena ligera de 1F3

<400> 18

Ser Ala Ser Thr Ser Val Ser Tyr Met Glu
1 5 10

35 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> CDR2 de la cadena ligera de 1F3

45 <400> 19

Thr Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

50 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> CDR3 de la cadena ligera de 1F3

5 <400> 20

His Gln Trp Arg Asn Tyr Pro Phe Thr
1 5

10 <210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> CDR1 de la cadena pesada de 2A4

<400> 21

Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

20 <210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> CDR2 de la cadena pesada de 2A4

<400> 22

Tyr Ile Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

30 <210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> CDR3 de la cadena pesada de 2A4

40 <400> 23

Ser Arg Asn Tyr Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

45 <210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR1 de la cadena ligera de 2A4

50 <400> 24

Lys Ala Ser Gln Tyr Val Gly Thr Thr Val Ala
1 5 10

55 <210> 25
<211> 7
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de la cadena ligera de 2A4

5 <400> 25

Arg Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 26

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> CDR3 de la cadena ligera de 2A4

<400> 26

Gln Gln Tyr Cys Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

20 <210> 27

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> VH de anticuerpo humanizado

<400> 27

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

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Asn Thr Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

30 Val Leu Tyr Gly Asn Tyr Val Val Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr
115

<210> 28

ES 2 529 734 T7

<211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> VL de anticuerpo humanizado
 <400> 28

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Thr Ser Val Ser Tyr Met
           20           25           30

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Arg Asn Tyr Pro Phe Thr
           85           90           95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100           105
    
```

10 <210> 29
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Región VH codificada por ADN
 <400> 29

```

20 cagggtgcaat tgggtgcagtc tggagccgag gtgaaaaaagc caggagcttc cgtaaaagta      60
    agctgtaagg cttccgggta tagcttcaact tcctactgga tgcactgggt tagacaagca      120
    ccaggccagg gcttggagtg gatgggogag atcaatccat ctaatggcag acaaaactac      180
    aacgagaagt tcaatactag agtgaccatg actagagaca caagtacctc caccgtgtat      240

    atggagctgt ccagcctgag aagcgaggat actgccgtgt actactgcgt gctgtacggg      300
    aactacgtgg tgtattacac aatggactat tgggggcagg gcacaaccgt aaccgtgagc      360
    tca                                                    363
    
```

25 <210> 30
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

ES 2 529 734 T7

<223> Región VL codificada por ADN

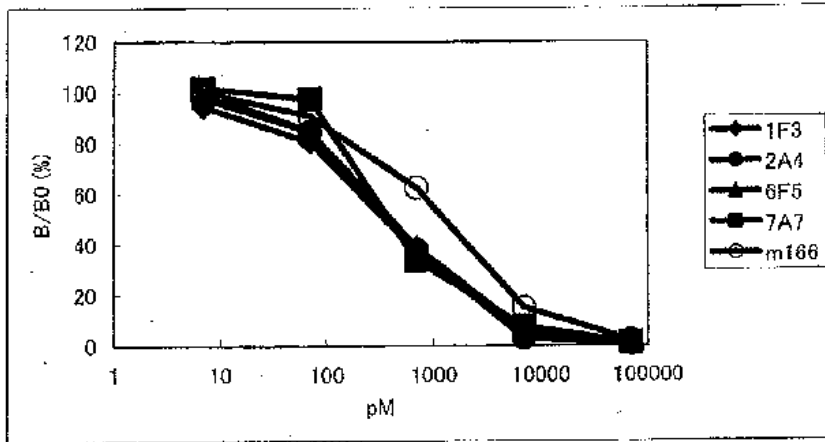
<400> 30

gatatccagc	tcacacagag	tccatccttc	ctgagcgcca	gcgtcggcga	ccgggtaact	60
attacctgct	ctgcttcaac	cagcgtgtcc	tacatggagt	ggatcaaca	gaagcccggc	120
aaggctcca	aactcctgat	ctacactaca	tccaaactgg	ccagcggggt	gccagccgg	180
ttcagcggaa	gtgggagtgg	aacagagttc	acactgacca	tttcctccct	gcagccagag	240
gatttcgcta	cctactattg	ccatcagtgg	agaaattacc	ccttcacett	cggacagggc	300
5 acaaagctgg	agatcaagcg	tgct				324

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humanizado contra PcrV o una parte de dicho anticuerpo, que tiene
- 1) en una región variable de la cadena pesada, regiones determinantes de la complementariedad que incluyen las siguientes secuencias de aminoácidos: SFTSYWMH (SEQ ID NO: 15) para CDR-H1, INPSNGRTNYNEKFNT (SEQ ID NO: 16) para CDR-H2 e YGNVYVYYTMDY (SEQ ID NO: 17) para CDR-H3 y
- 2) en una región variable de la cadena ligera, regiones determinantes de la complementariedad que incluyen las siguientes secuencias de aminoácidos: SASTSVSYME (SEQ ID NO: 18) para CDR-L1, TTSKLAS (SEQ ID NO: 19) para CDR-L2 y HQWRNYPFT (SEQ ID NO: 20) para CDR-L3;
- y que tiene al menos una característica seleccionada de (A) a (C):
- (A) inhibe 50% o más de citotoxicidad a células de leucocitos de *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 1 nM a 200 nM in vitro;
- (B) inhibe 50% o más de citotoxicidad a células de mieloma de *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 1 nM a 50 nM in vitro; y
- (C) tiene una constante de disociación (Kd) con PcrV de 2×10^{-9} (M) o menor.
2. Un anticuerpo monoclonal humanizado o una parte del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene
- 3) una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, y
- 4) una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.
3. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o una parte del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en calidad de un ingrediente activo.
4. El anticuerpo o parte del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en un método de tratamiento médico.
5. El anticuerpo o parte del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad infecciosa inducida por *Pseudomonas aeruginosa*.
6. Uso del anticuerpo o parte del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de una enfermedad infecciosa inducida por *Pseudomonas aeruginosa*.
7. Un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
8. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 7, bajo el control de una región de control de la expresión.

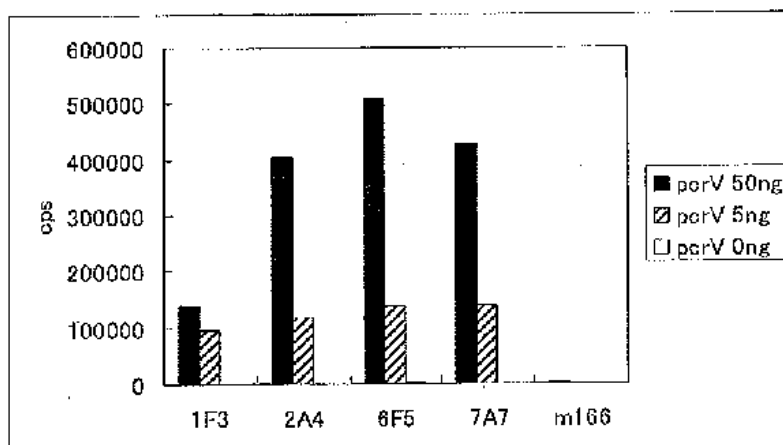
[Figura 1]



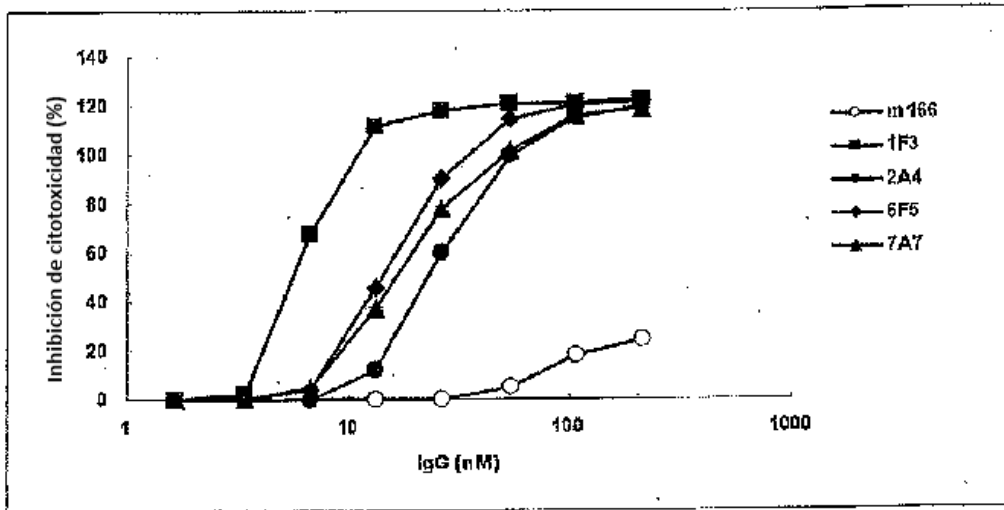
[Figura 2]

Clon	K d (M)
m166	$3,0 \times 10^{-9}$
1F3	$3,7 \times 10^{-10}$
2A4	$3,5 \times 10^{-10}$
6F5	$1,1 \times 10^{-10}$
7A7	$1,1 \times 10^{-9}$

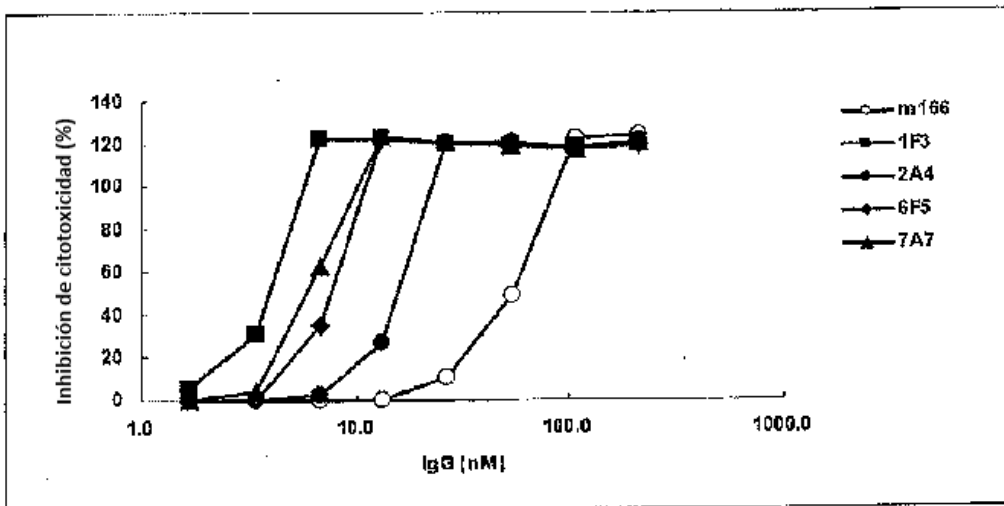
[Figura 3]



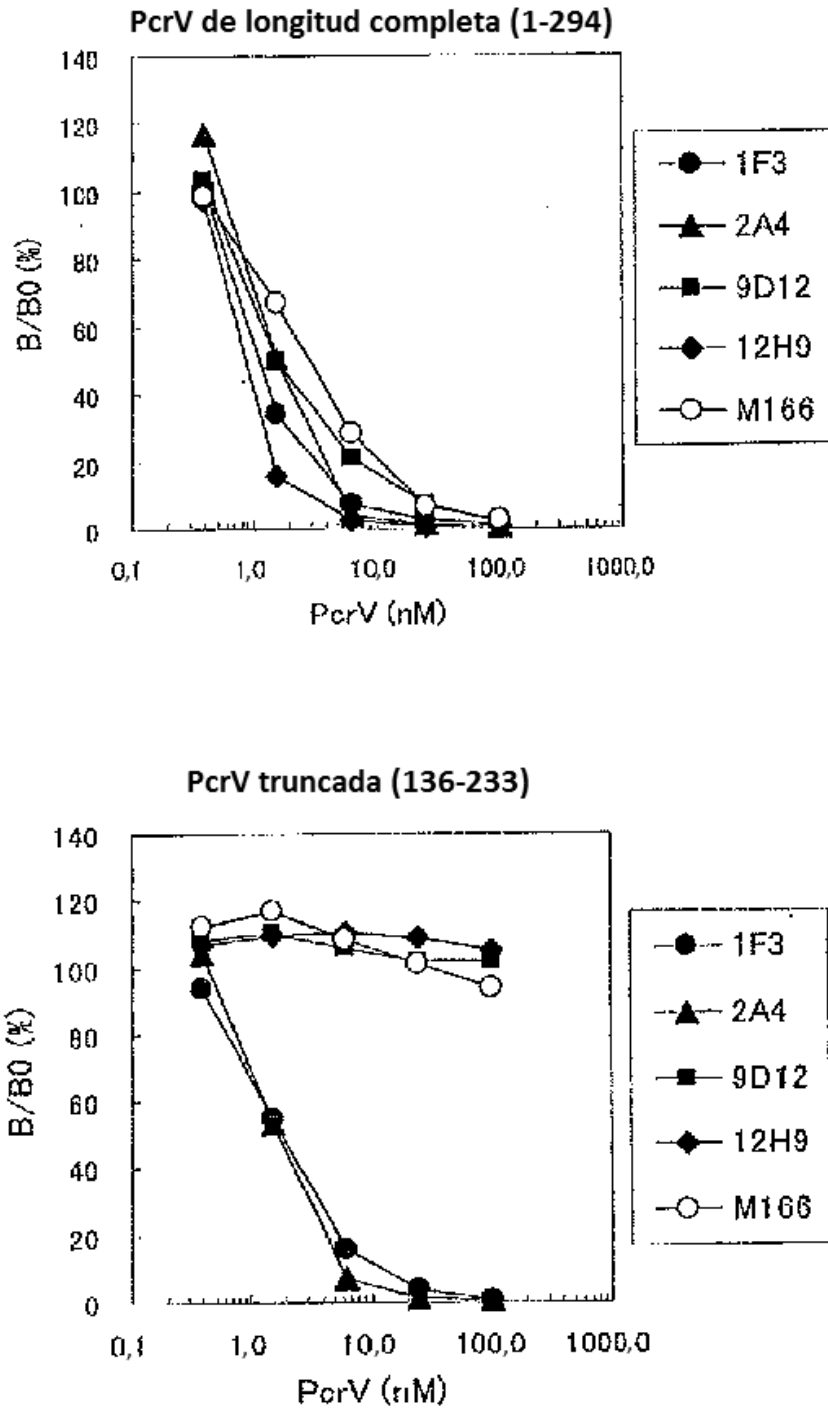
[Figura 4]



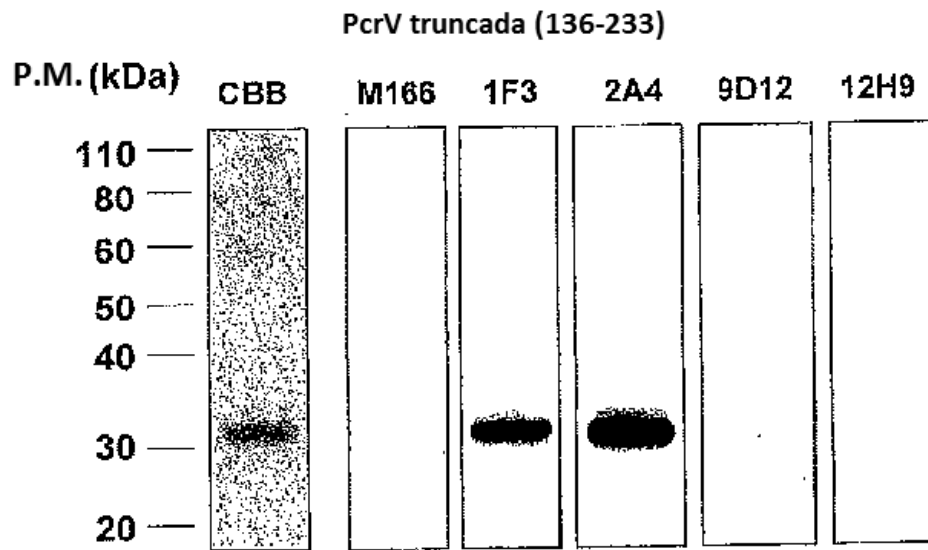
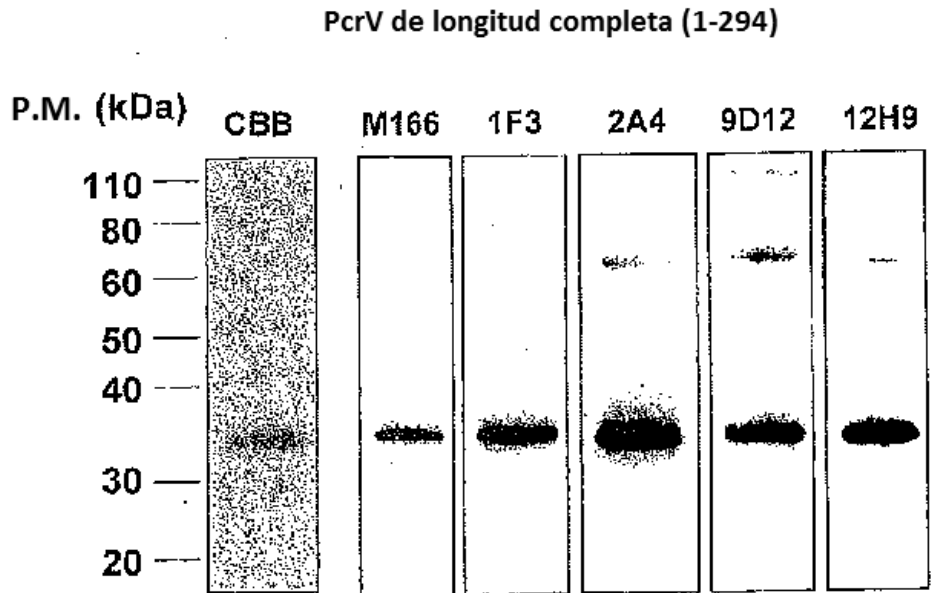
[Figura 5]



[Figura 6]

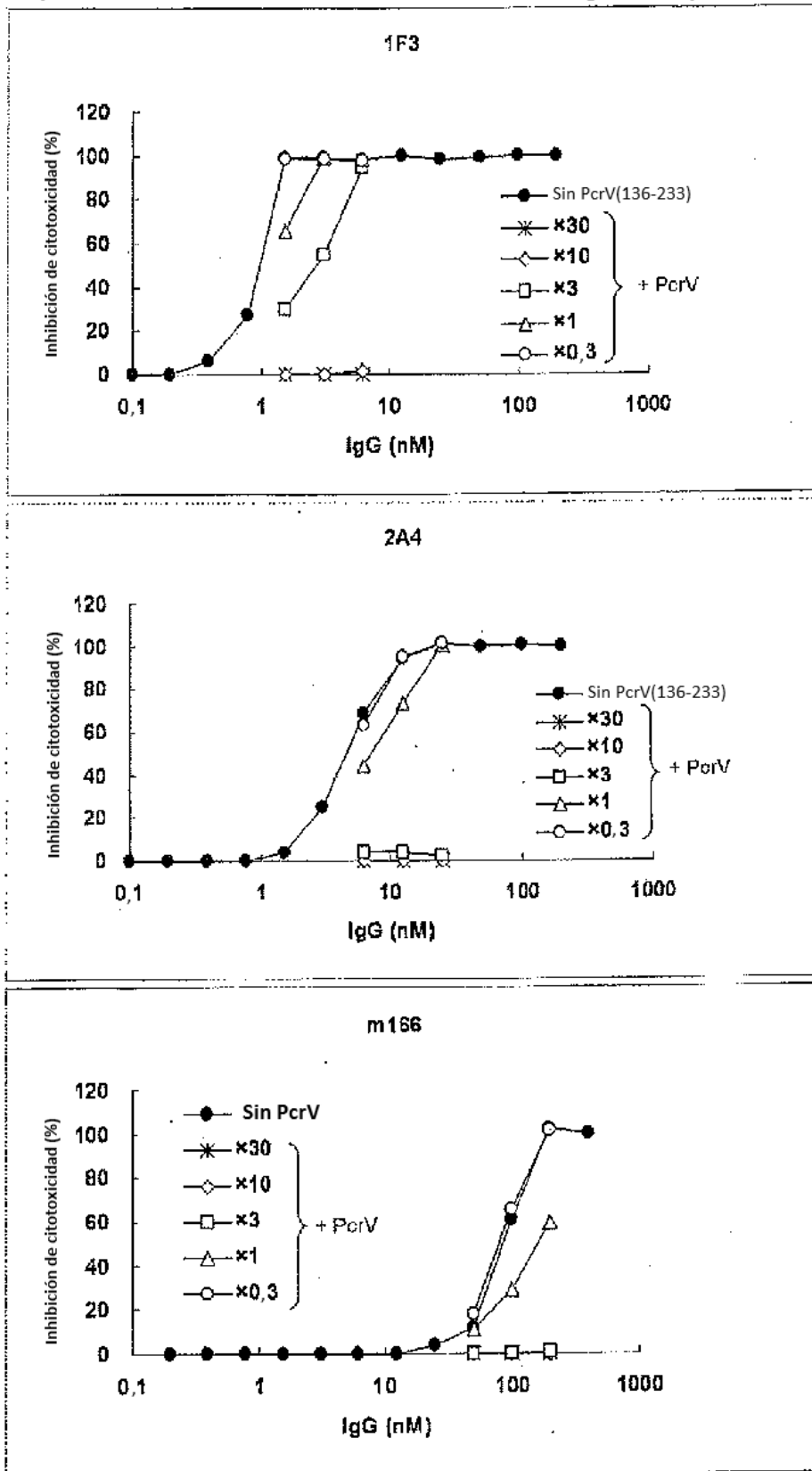


[Figura 7]



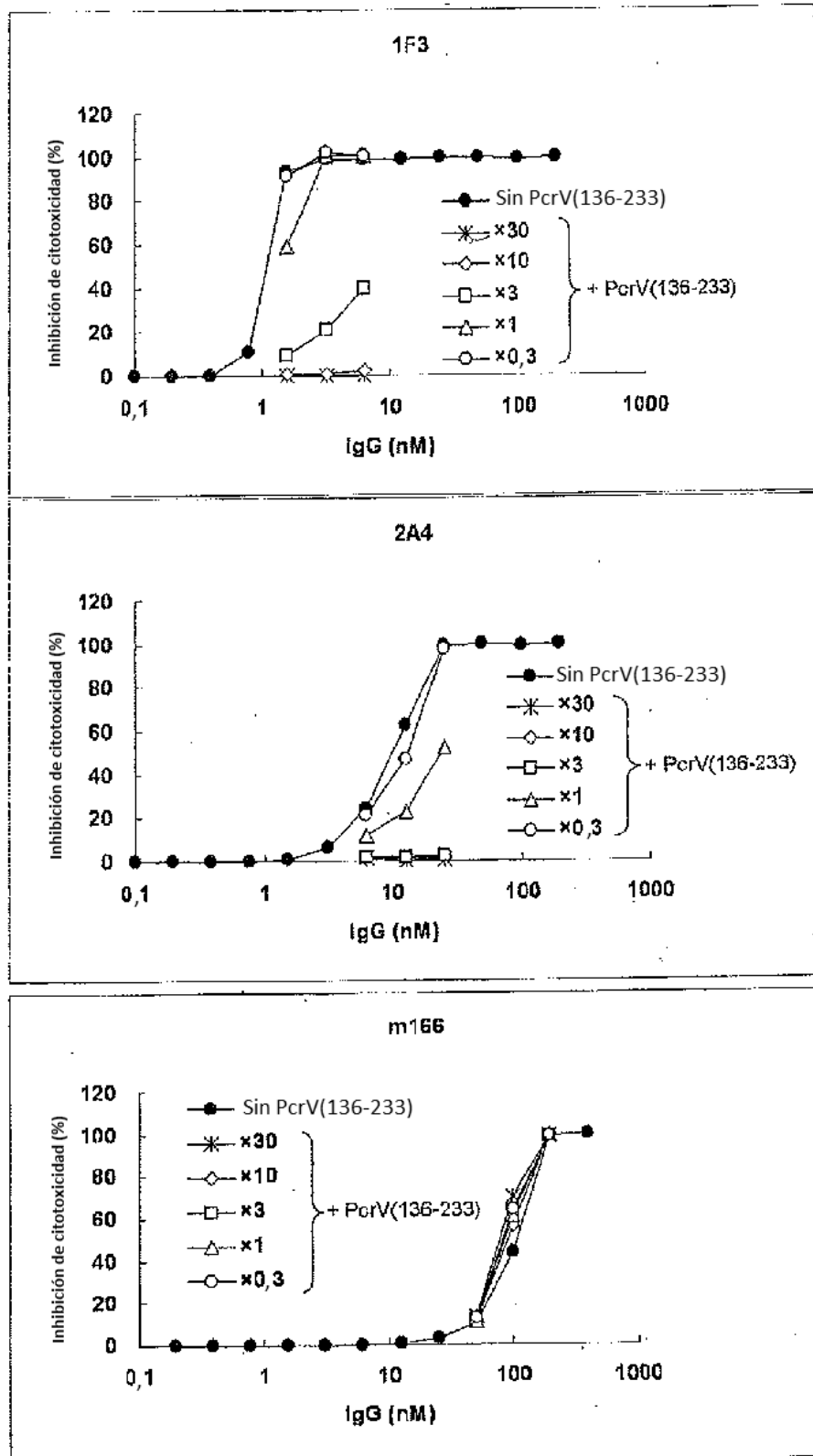
[Figura 8]

Supresión de la actividad neutralizante con PcrV de longitud completa



[Figura 9]

Supresión de la actividad neutralizante con PcrV truncada



[Figura 10]

(SEQ ID NO: 11, 12)

Cadena Pesada

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYSFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPSN
GRFTNYNEKFKTKATLTVDITSSSTAYMQLSSITSEDSAVYYCVLYGNYVYYTMDYW
GQGTSVTVSS

Cadena Ligera

QIVLTQSPFTIMASLGRFTITCSASTSVSYMEWYQQKSGTSPKILITTSKLASGVPS
RFSGSGSGTFYSLTSSVFAEDDAADYYCHQWRNYPFTFGSGTKLEIKRAD

[Figura 11]

(SEQ ID NO: 13, 14)

Cadena Pesada

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPGNKLEWIMGYITYNG
DTSYNPSLKSRILARDTSKNQFFLQINSVTTEDTATYSCAGSRNYYGAWFAYWGQG
TLVTVSA

Cadena Ligera

DIVMTQSHKFMSTSIGDRVSINYKASQYVGTTVAWYQQKSGHSPKLLIYRASTRHTG
VPDRFTGSGSGTDFTLNISNVQSEDIADYFCQQYCSSPLTFGAGTYLEVKRAD

[Figura 14]

Cadena Pesada	Cadena Ligera	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
Quimera H	Quimera L	$8,5 \times 10^5$	$2,3 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-10}$
HB	LT	$5,4 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-10}$
I48M	LT	$8,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-10}$
A67V	LT	$7,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-10}$
L69M	LT	$6,8 \times 10^5$	$1,7 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-10}$
V71R	LT	$7,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-10}$
A78V	LT	$1,9 \times 10^6$	$4,6 \times 10^{-5}$	$2,4 \times 10^{-11}$
V93A	LT	$2,0 \times 10^6$	$5,1 \times 10^{-4}$	$2,6 \times 10^{-10}$
L94R	LT	$6,2 \times 10^4$	$4,0 \times 10^{-2}$	$6,5 \times 10^{-7}$

[Figura 15]

SEQ ID NO: 27

QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKASGYSFTSYWMLHWVRQAPGGGLEWMGEINPS
 NGRITNYNEKFNTRVTMTTRDTSTSTVYMEISSLRSEDVAVYYCVLYGNVYVYDTMDY
 WGQG

[Figura 16]

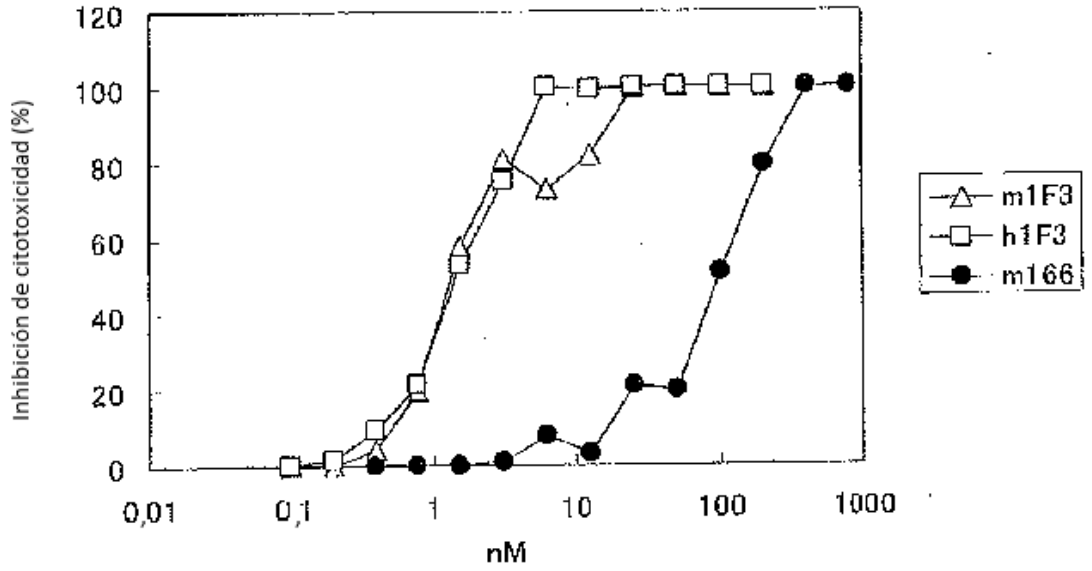
SEQ ID NO: 28

DIQLTQSPSFLSASVGDRTVITCSASTSYVSYMEWYQQKPKGKAPKLLIYTTSKLASGVP
 SRFSGSGSGTEFILTISSLQPEDFATYYCHQWRNYPFTFGGGTELEIK

[Figura 17]

Cadena Pesada	Cadena Ligera	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
Quimera H	Quimera L	$7,4 \times 10^5$	$3,7 \times 10^{-4}$	$4,9 \times 10^{-10}$
h1F3 H	h1F3 L	$8,7 \times 10^5$	$3,3 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^{-10}$

[Figura 18]



[Figura 19]

