

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 725**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/10** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2005 E 10180375 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013 EP 2314620**

54 Título: **Método para identificar moléculas de unión que pueden neutralizar el virus de la rabia**

30 Prioridad:

**27.05.2004 US 575023 P**

**25.01.2005 WO PCT/EP2005/050310**

**03.11.2004 WO PCT/EP2004/052772**

**23.09.2004 WO PCT/EP2004/052286**

**29.07.2004 WO PCT/EP2004/051661**

**27.05.2004 WO PCT/EP2004/050943**

**03.03.2005 WO PCT/EP2005/050953**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.10.2013**

73 Titular/es:

**CRUCCELL HOLLAND B.V. (100.0%)**

**Archimedesweg 4**

**2333 CN Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**BAKKER, ALEXANDER, BERTHOLD, HENDRIK;**

**MARISSSEN, WILLEM EGBERT;**

**KRAMER, ROBERT ARJEN y**

**DE KRUIF, CORNELIS ADRIAAN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 426 725 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para identificar moléculas de unión que pueden neutralizar el virus de la rabia

### CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a la medicina. En particular, la invención se refiere a moléculas de unión que neutralizan el virus de la rabia. Las moléculas de unión son útiles en la profilaxis tras la exposición de la rabia.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La rabia es una infección viral con distribución casi mundial que afecta principalmente a animales salvajes y domésticos pero que también implica a seres humanos, dando como resultado una encefalitis devastadora, letal de manera casi invariable. Anualmente, se estiman más de 70.000 víctimas mortales humanas, y millones de otras personas requieren tratamiento tras la exposición.

El virus de la rabia es un virus de ARN monocatenario, con envuelta, con forma de bala, clasificado en la familia de los *Rhabdovirus* y del género *Lyssavirus*. El genoma del virus de la rabia codifica para cinco proteínas virales: ARN polimerasa dependiente de ARN (L); una nucleoproteína (N); una proteína fosforilada (P); una proteína de matriz (M) ubicada en el lado interno de la envuelta proteica viral; y una glicoproteína de superficie externa (G).

15 La proteína G (62-67 KDa) es una glicoproteína de tipo I compuesta por 505 aminoácidos que tiene de dos a cuatro posibles sitios de N-glicosilación, de los cuales solamente uno o dos se glicosilan dependiendo de las cepas del virus. La proteína G forma los salientes que cubren la superficie externa de la envuelta del virión y se sabe que induce anticuerpos que neutralizan el virus.

20 La rabia puede tratarse o prevenirse mediante inmunizaciones tanto pasivas como activas. La profilaxis tras la exposición a la rabia incluye el cuidado inmediato de la herida local y la administración de inmunizaciones tanto pasivas (inmunoglobulinas anti-rabia) como activas (vacunas).

25 Actualmente, las inmunoglobulinas anti-rabia (RIG) se preparan a partir de las muestras de suero de o bien seres humanos inmunizados contra el virus de la rabia (HRIG) o bien caballos inmunizados contra el virus de la rabia (ERIG). Una desventaja de ERIG así como de HRIG es que no están disponibles en cantidades suficientes y, en el caso de HRIG, es demasiado cara. Además, el uso de ERIG puede conducir a reacciones adversas tales como choque anafiláctico. La posibilidad de contaminación por patógenos conocidos o desconocidos es un problema adicional asociado con HRIG. Para superar estas desventajas se ha sugerido usar anticuerpos monoclonales que pueden neutralizar el virus de la rabia en profilaxis tras la exposición. Los anticuerpos monoclonales murinos que neutralizan el virus de la rabia se conocen en la técnica (véase Schumacher *et al.*, 1989). Sin embargo, el uso de anticuerpos murinos *in vivo* está limitado debido a problemas asociados con la administración de anticuerpos murinos a seres humanos, tales como vida media en suero corta, una incapacidad para provocar ciertas funciones efectoras humanas y producción de una respuesta inmunitaria drástica no deseada contra el anticuerpo murino en un ser humano (la reacción de "anticuerpo humano anti-ratón" (HAMA)).

35 Recientemente, se han descrito anticuerpos monoclonales humanos que neutralizan el virus de la rabia (véase Dietzschold *et al.*, 1990, Champion *et al.*, 2000, y Hanlon *et al.*, 2001). Para que los anticuerpos monoclonales humanos anti-rabia sean tan eficaces como HRIG en la profilaxis tras la exposición debe usarse una mezcla de anticuerpos monoclonales. En una mezcla de este tipo cada anticuerpo debe unirse a un epítipo o sitio diferente en el virus para prevenir el escape de variantes resistentes del virus.

40 Actualmente, todavía existe una necesidad significativa de nuevos anticuerpos monoclonales humanos que neutralizan el virus de la rabia que tengan potencial profiláctico tras la exposición mejorado, particularmente anticuerpos que tengan diferentes especificidades de reconocimiento de epítipo. La presente invención proporciona tales anticuerpos monoclonales humanos que ofrecen la posibilidad de usarse en mezclas útiles en la profilaxis tras la exposición de una amplia variedad de virus de la rabia y variantes resistentes a la neutralización de los mismos.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 La figura 1 muestra la comparación de las secuencias de aminoácidos de la cepa CVS-11 del virus de la rabia y los virus de escape E57. Se recogieron células infectadas por el virus 2 días tras la infección y se aisló el ARN total. Se generó ADNc y se usó para la secuenciación del ADN. Se muestran las regiones que contienen mutaciones y las mutaciones se indican en negrita. La figura 1A muestra la comparación de las secuencias de nucleótidos. Los números por encima de los aminoácidos indican los números de aminoácidos de la glicoproteína del virus de la rabia  
50 incluyendo el péptido señal. La figura 1B muestra la comparación de las secuencias de aminoácidos. En la parte superior se muestra la representación esquemática de la glicoproteína del virus de la rabia. El recuadro negro indica el péptido señal, mientras que el recuadro gris indica el dominio transmembrana. Las secuencias en la figura 1 también están representadas por las SEQ ID No: 130-141.

La figura 2 muestra la comparación de las secuencias de aminoácidos de la cepa CVS-11 del virus de la rabia y los

- 5 virus de escape EJB. Se recogieron células infectadas por el virus 2 días tras la infección y se aisló el ARN total. Se generó ADNc y se usó para la secuenciación del ADN. Se muestran las regiones que contienen mutaciones y las mutaciones se indican en negrita. La figura 2A muestra la comparación de las secuencias de nucleótidos. Los números por encima de los aminoácidos indican los números de aminoácidos de la glicoproteína del virus de la rabia incluyendo el péptido señal. La figura 2B muestra la comparación de las secuencias de aminoácidos. En la parte superior se muestra la representación esquemática de la glicoproteína del virus de la rabia. El recuadro negro indica el péptido señal, mientras que el recuadro gris indica el dominio transmembrana. Las secuencias en la figura 2 también están representadas por las SEQ ID No: 142-151.
- La figura 3 muestra el vector PDV-C06.
- 10 La figura 4 muestra un ELISA de competición de scFv anti-virus de la rabia y anticuerpo biotilado anti-virus de la rabia denominado CR-57. Las placas de ELISA recubiertas con proteína G purificada del virus de la rabia se incubaron con scFv respectivos antes de la adición de CR-57bio (0,5 µg/ml). Posteriormente, se monitorizó la unión de CR-57bio en ausencia y presencia de scFv.
- 15 La figura 5 muestra un ELISA de competición de scFv anti-virus de la rabia y anticuerpo anti-virus de la rabia denominado CR-57. Las placas de ELISA recubiertas con proteína G purificada del virus de la rabia se incubaron con CR-57 (1 µg/ml) antes de la adición de scFv en exceso. Posteriormente, se monitorizó la unión de svFv en ausencia y presencia de CR-57.
- 20 La figura 6 muestra un ensayo de ELISA de competición de IgG anti-proteína G del virus de la rabia y el anticuerpo anti-virus de la rabia denominado CR-57. Se incubó proteína G (cepa ERA) con IgG no marcadas (mostrado en el eje X). Se añadió CR57 biotilado (CR57bio) y se permitió que se uniera a la proteína G antes de visualización por medio del estreptavidina-HRP. Las señales de ELISA se muestran como porcentaje de unión de CR57bio solo.
- 25 La figura 7 muestra un ensayo de FACS de competición de IgG anti-proteína G del virus de la rabia y el anticuerpo anti-virus de la rabia denominado CR-57. Se incubaron células PER.C6 que expresan proteína G (cepa ERA) con IgG no marcadas (mostrado en el eje X). Se añadió CR57 biotilado (CR57bio) y se permitió que se uniera a las células que expresan la proteína G antes de visualización por medio de estreptavidina-PE. Las señales de FACS se muestran como porcentaje de unión de CR57bio solo.
- 30 La figura 8 muestra la comparación de las secuencias de aminoácidos de virus de escape E98 y CVS-11. Se recogieron células infectadas por el virus 2 días tras la infección y se aisló el ARN total. Se generó ADNc y se usó para la secuenciación del ADN. Se muestra la región que contiene una mutación puntual y la mutación se indica en negrita. La figura 8A muestra la comparación de las secuencias de nucleótidos. El número por encima del nucleótido indica el nucleótido mutado (indicado en negrita) del marco de lectura abierto de la glicoproteína del virus de la rabia sin secuencia de péptido señal. La figura 8B muestra la comparación de las secuencias de aminoácidos. El número por encima del aminoácido indica el aminoácido mutado (indicado en negrita) de la glicoproteína del virus de la rabia sin secuencia de péptido señal.
- 35 La figura 9 muestra un árbol filogenético de 123 virus naturales de la rabia (123 secuencias de glicoproteína G del virus de la rabia, método de Kimura con 2 parámetros de unión al vecino "*neighbor joining*", 500 cebadores). La negrita indica los virus que alojan la mutación N>D tal como se observa en los virus de escape E98.
- 40 La figura 10 muestra epítomos neutralizantes sobre la glicoproteína de la rabia. Se muestra una representación esquemática de la glicoproteína del virus de la rabia que representa los sitios antigénicos incluyendo el epítomo de CR57 novedoso. El péptido señal (19 aminoácidos) y el dominio transmembrana se indican mediante recuadros negros. Se indican los puentes disulfuro. La numeración de los aminoácidos es desde la proteína madura menos la secuencia del péptido señal.

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

A continuación en el presente documento siguen definiciones de términos tal como se usan en la invención.

#### 45 DEFINICIONES

##### Molécula de unión

- 50 Tal como se usa en el presente documento la expresión "molécula de unión" se refiere a una inmunoglobulina intacta incluyendo anticuerpos monoclonales, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados o humanos, o a un dominio de unión a antígeno y/o variable que comprende un fragmento de una inmunoglobulina que compite con la inmunoglobulina intacta para la unión específica a la pareja de unión de la inmunoglobulina, por ejemplo el virus de la rabia o un fragmento del mismo tal como por ejemplo la proteína G. Independientemente de la estructura el fragmento de unión a antígeno se une con el mismo antígeno que reconoce la inmunoglobulina intacta. Un fragmento de unión a antígeno puede comprender un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 2 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20

residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 30 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 35 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de la molécula de unión.

La expresión "molécula de unión", tal como se usa en el presente documento incluye todas las clases y subclases de inmunoglobulinas conocidas en la técnica. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las moléculas de unión pueden dividirse en cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Los fragmentos de unión a antígeno incluyen, entre otros, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, dAb, Fd, fragmentos la región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios bivalentes, anticuerpos monocatenarios de fagos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, (poli)péptidos que contienen al menos un fragmento de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específica al (poli)péptido, etc. Los fragmentos anteriores pueden producirse sintéticamente o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas o pueden obtenerse genéticamente mediante técnicas de ADN recombinante. Los métodos de producción se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Antibodies: A Laboratory Manual*, editado por: E. Harlow y D. Lane (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. Una molécula de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma puede tener uno o más sitios de unión. Si existe más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes.

La molécula de unión puede ser una molécula de unión desnuda o no conjugada, pero también puede formar parte de un inmunocongugado. Una molécula de unión desnuda o no conjugada pretende referirse a una molécula de unión que no está conjugada, operativamente unida o asociada física o funcionalmente de otro modo con un marcador o resto efector, tal como, entre otros, una sustancia tóxica, una sustancia radiactiva, un liposoma, una enzima. Se entenderá que moléculas de unión desnudas o no conjugadas no excluyen moléculas de unión que se han estabilizado, multimerizado, humanizado o manipulado de cualquier otra forma, distinto de mediante la unión de un marcador o resto efector. En consecuencia, en el presente documento están incluidas todas las moléculas de unión desnudas y no conjugadas modificadas tras la traducción, incluyendo cuando las modificaciones se realizan en el entorno de la célula que produce la molécula de unión natural, mediante una célula que produce la molécula de unión recombinante y se introducen manualmente tras la preparación de la molécula de unión inicial. Naturalmente, la expresión molécula de unión desnuda o no conjugada no excluye la capacidad de la molécula de unión para formar asociaciones funcionales con moléculas y/o células efectoras tras la administración al organismo, ya que algunas de tales interacciones son necesarias con el fin de ejercer un efecto biológico. Por tanto, la falta de marcador o grupo efector asociado se aplica en la definición a la molécula de unión desnuda o no conjugada *in vitro*, no *in vivo*.

#### Regiones determinantes de la complementariedad (CDR)

La expresión "regiones determinantes de la complementariedad" tal como se usa en el presente documento significa secuencias dentro de las regiones variables de las moléculas de unión, tales como las inmunoglobulinas, que habitualmente contribuyen en gran medida al sitio de unión al antígeno que es complementario en forma y distribución de carga al epítipo reconocido en el antígeno. Las regiones CDR pueden ser específicas para epítopos lineales, epítopos discontinuos o epítopos conformaciones de proteínas o fragmentos de proteínas, o bien tal como se presentan en la proteína en su conformación nativa, o bien en algunos casos, tal como se presentan en las proteínas cuando se desnaturalizan, por ejemplo, mediante solubilización en SDS. Los epítopos también pueden consistir en modificaciones postraduccionales de las proteínas.

#### Variante funcional

La expresión "variante funcional", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de unión que comprende un nucleótido y/o secuencia de aminoácidos que está alterada por uno o más nucleótidos y/o aminoácidos en comparación con las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos de la molécula de unión original y que todavía puede competir por la unión a la pareja de unión, por ejemplo el virus de la rabia o un fragmento del mismo, con la molécula de unión original. En otras palabras, las modificaciones en la secuencia de aminoácidos y/o nucleótidos de la molécula de unión original no afectan ni alteran significativamente las características de unión de la molécula de unión codificada por la secuencia de nucleótidos o que contiene la secuencia de aminoácidos, es decir, la molécula de unión todavía puede reconocer y unirse a su diana. La variante funcional puede tener modificaciones de secuencia conservativas incluyendo sustituciones, adiciones y deleciones de nucleótidos y aminoácidos. Estas modificaciones pueden introducirse mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR aleatoria, y pueden comprender nucleótidos y aminoácidos naturales así como no naturales.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido se sustituye con un residuo de aminoácido que tiene propiedades químicas o estructurales similares. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano). Resultará claro para el experto que también pueden emplearse otras clasificaciones de familias de residuos de aminoácidos aparte de la usada anteriormente. Además, una variante puede tener sustituciones de aminoácidos no conservativas, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene propiedades químicas o estructurales diferentes. Variaciones menores similares también pueden incluir deleciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. Puede encontrarse una orientación en la determinación de qué residuos de aminoácidos pueden sustituirse, insertarse o deleccionarse sin suprimir la actividad inmunológica usando programas informáticos bien conocidos en la técnica.

Una mutación en una secuencia de nucleótidos puede ser una única alteración realizada en un locus (una mutación puntual), tal como mutaciones por transición o transversión, o alternativamente, pueden insertarse, deleccionarse o cambiarse múltiples nucleótidos en un único locus. Además, pueden realizarse una o más alteraciones en cualquier número de loci dentro de una secuencia de nucleótidos. Las mutaciones pueden realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica.

#### Huésped

El término "huésped", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a un microorganismo o una célula en el que se ha introducido un vector tal como un vector de clonación o un vector de expresión. El microorganismo o célula puede ser procarionta o eucariota. Debe entenderse que este término pretende referirse no sólo al microorganismo o célula objeto particular, sino también a la progenie de tal microorganismo o célula. Puesto que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido o bien a mutación o bien a influencias medioambientales, puede que de hecho tal progenie no sea idéntica al microorganismo o célula original, pero todavía se incluye dentro del alcance de la expresión "huésped" tal como se usa en el presente documento.

#### Humano

El término "humano", cuando se aplica a moléculas de unión tal como se definen en el presente documento, se refiere a moléculas que o bien se derivan directamente de un ser humano o bien están basadas en una secuencia humana. Cuando una molécula de unión se deriva de o está basada en una secuencia humana y posteriormente se modifica, todavía debe considerarse humana tal como se usa a lo largo de toda la memoria descriptiva. En otras palabras, el término humano, cuando se aplica a moléculas de unión pretende incluir moléculas de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana basadas en regiones variables o constantes ya se produzcan o no en un ser humano o linfocito humano o en forma modificada. Por tanto, las moléculas de unión humanas pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana, comprender sustituciones y/o deleciones (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante por ejemplo mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). "Basado en" tal como se usa en el presente documento se refiere a la situación en la que puede copiarse exactamente una secuencia de ácido nucleico a partir de un molde, o con mutaciones menores, tal como mediante métodos de PCR propensos a errores, u obtenerse sintéticamente apareando el molde exactamente o con modificaciones menores. Las moléculas semisintéticas basadas en secuencias humanas también se consideran humanas tal como se usa en el presente documento.

#### Anticuerpo monoclonal

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única, es decir estructura primaria, es decir que tiene una secuencia de aminoácidos única. Un anticuerpo monoclonal presenta una especificidad y afinidad de unión únicas por un epítipo particular. En consecuencia, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a un anticuerpo que presenta una especificidad de unión única que tiene regiones variables y constantes derivadas de o basadas en secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana o derivadas de secuencias completamente sintéticas. El método de preparación del anticuerpo monoclonal no es relevante.

#### Molécula de ácido nucleico

La expresión "molécula de ácido nucleico" tal como se usa en la presente invención se refiere a una forma polimérica de nucleótidos e incluye tanto cadenas sentido como antisentido de ARN, ADNc, ADN genómico, y formas sintéticas y polímeros mixtos de los anteriores. Un nucleótido se refiere a un ribonucleótido, desoxinucleótido o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. La expresión también incluye formas mono y bicatenarias de ADN. Además, un polinucleótido puede incluir cualquiera o tanto nucleótidos que se producen de manera natural

como modificados unidos entre sí mediante enlaces de nucleótidos que se producen de manera natural y/o que no se producen de manera natural. Las moléculas de ácido nucleico pueden modificarse de manera química o bioquímica o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas, tal como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos que se producen de manera natural con un análogo, modificaciones entre nucleótidos tales como enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), restos colgantes (por ejemplo, polipéptidos), moléculas de intercalación (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), quelantes, alquilantes, y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). La expresión anterior también pretende incluir cualquier conformación topológica, incluyendo conformaciones monocatenarias, bicatenarias, de dúplex parcial, triples, de horquilla, circulares y de candado. También se incluyen moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia designada a través de puentes de hidrógeno y otras interacciones químicas. Tales moléculas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellas en las que los enlaces fosfato se sustituyen por enlaces peptídicos en la estructura principal de la molécula. Una referencia a una secuencia de ácido nucleico engloba a su complemento a menos que se especifique otra cosa. Por tanto, debe entenderse que una referencia a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia particular engloba a su cadena complementaria, con su secuencia complementaria. La cadena complementaria también es útil, por ejemplo, para terapia antisentido, sondas de hibridación y cebadores de PCR.

#### Excipiente farmacéuticamente aceptable

Por “excipiente farmacéuticamente aceptable” se quiere decir cualquier sustancia inerte que se combina con una molécula activa tal como un fármaco, agente, o molécula de unión para preparar una forma farmacéutica adecuada o conveniente. El “excipiente farmacéuticamente aceptable” es un excipiente que no es tóxico, o al menos cuya toxicidad es aceptable para su uso deseado, para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y que es compatible con otros componentes de la formulación que comprende el fármaco, agente o molécula de unión.

#### Profilaxis tras la exposición

La “profilaxis tras la exposición” (PEP) se indica para personas posiblemente expuestas a un animal con rabia. Las posibles exposiciones incluyen exposición a mordedura (es decir, cualquier penetración de la piel por los dientes) incluyendo mordeduras de animales, y exposición sin mordedura. Las exposiciones sin mordedura incluyen exposición a grandes cantidades de virus de la rabia pulverizado en laboratorios o cuevas y receptores quirúrgicos de córneas trasplantadas de pacientes que murieron por la rabia. La contaminación de heridas abiertas, abrasiones, membranas mucosas, o teóricamente, arañazos, con saliva u otro material potencialmente infeccioso (tal como tejido nervioso) de un animal con rabia también constituye una exposición sin mordedura. Otro contacto por sí mismo, tal como acariciar a un animal con rabia y el contacto con sangre, orina o heces de un animal con rabia, no constituye una exposición y no es una indicación para profilaxis. PEP debe comenzar lo antes posible tras una exposición. Si no se ha producido exposición, no es necesaria la profilaxis tras la exposición. En todos los regímenes de profilaxis tras la exposición, excepto para personas previamente inmunizadas, deben usarse simultáneamente inmunizaciones activas y pasivas.

#### Unión específica

La expresión “unión específica”, tal como se usa en el presente documento, en referencia a la interacción de una molécula de unión, por ejemplo un anticuerpo, y su pareja de unión, por ejemplo un antígeno, significa que la interacción depende de la presencia de una estructura particular, por ejemplo un determinante antigénico o epitopo, en la pareja de unión. En otras palabras, el anticuerpo se une o reconoce preferiblemente la pareja de unión incluso cuando la pareja de unión está presente en una mezcla de otras moléculas o microorganismos. La unión puede estar mediada por interacciones covalentes o no covalentes o por una combinación de ambas. En otras palabras, la expresión “unión específica” significa unión inmuno-específica a un antígeno o a un fragmento del mismo y unión no inmuno-específica a otros antígenos. Una molécula de unión que se une inmuno-específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con afinidad menor tal como se determina mediante, por ejemplo, radioinmunoensayos (RIA), ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), BIACORE, u otros ensayos conocidos en la técnica. Las moléculas de unión o fragmentos de las mismas que se unen inmuno-específicamente a un antígeno pueden reaccionar de manera cruzada con antígenos relacionados. Preferiblemente, las moléculas de unión o fragmentos de las mismas que se unen inmuno-específicamente a un antígeno no reaccionan de manera cruzada con otros antígenos.

#### Cantidad terapéuticamente eficaz

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de la molécula de unión tal como se define en el presente documento que es eficaz para la profilaxis tras la exposición de la rabia.

#### Vector

El término “vector” indica una molécula de ácido nucleico en la que puede insertarse una segunda molécula de ácido

nucleico para su introducción en un huésped en el que se replicará, y en algunos casos se expresará. En otras palabras, un vector puede transportar una molécula de ácido nucleico a la que se ha unido. El término "vector", tal como se usa en el presente documento contempla vectores de clonación así como de expresión. Los vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y cromosomas artificiales de levaduras (YAC) y vectores derivados de bacteriófagos o virus de plantas o animales (incluyendo del ser humano). Los vectores comprenden un origen de replicación reconocido por el huésped propuesto y en caso de los vectores de expresión, un promotor y otras regiones reguladoras reconocidas por el huésped. Un vector que contiene una segunda molécula de ácido nucleico se introduce en una célula por ejemplo mediante transformación, transfección, o haciendo uso de mecanismos de entrada bacterianos o virales. Se conocen otras formas de introducir ácido nucleico en las células, tales como electroporación o bombardeo con partículas a menudo usadas con células vegetales, y similares. El método de introducir ácido nucleico en las células depende entre otras cosas del tipo de células, etc. Esto no es crítico para la invención. Ciertos vectores pueden realizar replicación autónoma en un huésped en el que se introducen (por ejemplo, los vectores que tienen un origen de replicación bacteriano pueden replicarse en bacterias). Otros vectores pueden integrarse en el genoma de un huésped al introducirse en el huésped, y de ese modo se replican junto con el genoma del huésped.

### SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona un método para identificar moléculas de unión que pueden unirse específicamente a, y neutralizar, virus de la rabia.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención engloba un método para identificar moléculas de unión que puede unirse específicamente al virus de la rabia que potencialmente tiene actividad neutralizante contra el virus de la rabia. Las moléculas de unión también tienen actividad neutralizante contra el virus de la rabia. Las moléculas de unión son moléculas de unión humanas. Alternativamente, también pueden ser moléculas de unión de otros animales. El virus de la rabia pertenece al género *Lyssavirus*. En total, al género *Lyssavirus* incluye once genotipos: virus de la rabia (genotipo 1), virus del murciélago de Lagos (genotipo 2), virus Mokola (genotipo 3), virus Duvenhage (genotipo 4), *Lyssavirus* del murciélago europeo 1 (genotipo 5), *Lyssavirus* del murciélago europeo 2 (genotipo 6), *Lyssavirus* del murciélago australiano (genotipo 7), virus Aravan (genotipo 8), virus Khujand (genotipo 9), virus Irkut (genotipo 10) y virus caucásico del oeste (genotipo 11). Además de unirse al virus de la rabia, las moléculas de unión también pueden ser capaces de unirse a otros genotipos del género *Lyssavirus*. Preferiblemente, las moléculas de unión también pueden ser capaces de neutralizar otros genotipos del género *Lyssavirus*. Además, las moléculas de unión pueden incluso ser capaces de unirse a y/o neutralizar virus, distintos de *Lyssavirus*, de la familia de *Rhabdovirus*. Esta familia incluye los géneros *cytorhabdovirus*, *ephemerovirus*, *lyssavirus*, *nucleorhabdovirus*, *rhabdovirus* y *vesiculovirus*.

Las moléculas de unión pueden ser capaces de unirse específicamente al virus de la rabia en su forma natural o en su forma inactivada/atenuada. La inactivación del virus de la rabia puede realizarse mediante tratamiento con, entre otros, beta-propiolactona (BPL) (White y Chappel, 1982), calentamiento a 56°C durante más de 30 minutos, irradiación gamma, tratamiento con acetiletlenimina o etilenimina o tratamiento con ácido ascórbico y sulfato de cobre durante 72 horas (Madhusudana *et al.*, 2004). También pueden usarse métodos de inactivación viral general conocidos por el experto tales como, entre otros, pasteurización (calentamiento en húmedo), tratamiento térmico en seco, tratamiento térmico por vapor, tratamiento con pH bajo, tratamiento con disolvente orgánico/detergente, nanofiltración; irradiación con luz UV. Preferiblemente, la inactivación se realiza mediante tratamiento con beta-propiolactona (BPL). El experto en la técnica conoce bien métodos para someter a prueba si el virus de la rabia todavía es infeccioso o está parcial o completamente inactivado y pueden encontrarse, entre otros, en Laboratory techniques in rabies, editado por: F.-X Meslin, M.M. Kaplan y H. Koprowski (1996), 4ª edición, Capítulo 36, Organización Mundial de la Salud, Ginebra.

Las moléculas de unión también pueden ser capaces de unirse específicamente a uno o más fragmentos del virus de la rabia tales como, entre otros, una preparación de una o más proteínas y/o (poli)péptidos derivados del virus de la rabia o una célula transfectada con una proteína y/o (poli)péptido del virus de la rabia. Para los métodos de tratamiento y/o prevención tales como métodos para la profilaxis tras la exposición del virus de la rabia, las moléculas de unión preferiblemente pueden unirse específicamente a proteínas accesibles de superficie del virus de la rabia tales como la proteína M (véase Ameyama *et al.* 2003) o G. Para fines de diagnóstico, las moléculas de unión humanas también pueden ser capaces de unirse específicamente a proteínas no presentes sobre la superficie del virus de la rabia. La secuencia de aminoácidos de las proteínas de superficie accesibles e internas de diversas cepas conocidas del virus de la rabia puede encontrarse en la base de datos EMBL y/o en otras bases de datos.

Preferiblemente, el fragmento comprende al menos un determinante antigénico reconocido por las moléculas de unión humanas de la invención. Un "determinante antigénico" tal como se usa en el presente documento es un resto tal como un (poli)péptido, (glico)proteína, o análogo o fragmento de los mismos del virus de la rabia, que puede unirse a una molécula de unión humana de la invención con afinidad suficientemente alta para formar un complejo antígeno-molécula de unión detectable.

Las moléculas de unión pueden ser moléculas de inmunoglobulina intacta tales como anticuerpos monoclonales o

5 policlonales, en particular anticuerpos monoclonales humanos, o las moléculas de unión pueden ser fragmentos de unión a antígeno incluyendo, pero sin limitarse a, Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, Fv, dAb, Fd, fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios bivalentes, anticuerpos monocatenarios de fagos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, y (poli)péptidos que  
 10 contienen al menos un fragmento de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específica al virus de la rabia o fragmento del mismo. Las moléculas de unión pueden usarse de forma aislada o no aislada. Además, las moléculas de unión pueden usarse solas o en una mezcla que comprende al menos una molécula de unión humana (o variante o fragmento del mismo). En otras palabras, las moléculas de unión pueden usarse en combinación, por ejemplo, como una composición farmacéutica que comprende dos o más moléculas de unión,  
 15 variantes o fragmentos de las mismas. Por ejemplo, las moléculas de unión que tienen actividad neutralizante contra el virus de la rabia pueden combinarse en una terapia única para lograr un efecto profiláctico, terapéutico o de diagnóstico deseado.

20 Los virus de ARN tales como el virus de la rabia hacen uso de su propia ARN polimerasa durante la replicación del virus. Estas ARN polimerasas tienden a ser propensas a cometer errores. Esto conduce a la formación de las denominadas cuasiespecies durante una infección viral. Cada cuasiespecie tiene un genoma de ARN único, que podría dar como resultado diferencias en la composición de aminoácidos de las proteínas virales. Si se producen tales mutaciones en las proteínas virales estructurales, el virus podría escapar potencialmente del sistema inmunitario del huésped debido a un cambio en los epítomos de las células T o B. La posibilidad de que esto ocurra es superior cuando los individuos se tratan con una mezcla de dos moléculas de unión, tales como anticuerpos monoclonales humanos, que cuando se tratan con una mezcla de anticuerpos policlonales (HRIG). Por tanto, un requisito previo para una mezcla de dos anticuerpos monoclonales humanos para el tratamiento de la rabia es que los dos anticuerpos reconozcan epítomos no solapantes, no competitivos en su antígeno diana, es decir, la glicoproteína del virus de la rabia. De este modo se minimiza la posibilidad de que se produzcan virus de escape de la rabia. Como consecuencia, las moléculas de unión pueden reaccionar preferiblemente con diferentes epítomos no solapantes, no competitivos del virus de la rabia, tales como epítomos en la proteína G del virus de la rabia. La mezcla de moléculas de unión puede comprender además al menos otro agente terapéutico tal como un medicamento adecuado para la profilaxis tras la exposición de la rabia.

25 Normalmente, las moléculas de unión según la invención pueden unirse a sus parejas de unión, es decir al virus de la rabia o a fragmentos del mismo tales como proteínas del virus de la rabia, con una constante de afinidad (valor de  $K_d$ ) que es inferior a  $0,2 \cdot 10^{-4}$  M,  $1,0 \cdot 10^{-5}$  M,  $1,0 \cdot 10^{-6}$  M,  $1,0 \cdot 10^{-7}$  M, preferiblemente inferior a  $1,0 \cdot 10^{-8}$  M, más preferiblemente inferior a  $1,0 \cdot 10^{-9}$  M, más preferiblemente inferior a  $1,0 \cdot 10^{-10}$  M, incluso más preferiblemente inferior a  $1,0 \cdot 10^{-11}$  M, y en particular inferior a  $1,0 \cdot 10^{-12}$  M. Las constantes de afinidad pueden variar para los isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, la unión con afinidad de un isotipo de IgM se refiere a una afinidad de unión de al menos aproximadamente  $1,0 \cdot 10^{-7}$  M. Las constantes de afinidad pueden medirse por ejemplo usando resonancia de plasmón superficial, es decir, un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo usando el sistema BIACORE (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia).

30 Las moléculas de unión pueden unirse al virus de la rabia en forma purificada/aislada o no purificada/no aislada. Las moléculas de unión pueden unirse al virus de la rabia en forma soluble tal como por ejemplo en una muestra o pueden unirse al virus de la rabia unidas o asociadas a un portador o sustrato, por ejemplo, placas de microtitulación, membranas y perlas, etc. Los portadores o sustratos pueden estar compuestos por vidrio, plástico (por ejemplo, poliestireno), polisacáridos, nailon, nitrocelulosa, o teflón, etc. La superficie de tales soportes puede ser sólida o porosa y de cualquier forma conveniente. Alternativamente, las moléculas de unión también pueden unirse a fragmentos del virus de la rabia tales como proteínas o (poli)péptidos del virus de la rabia. En una realización, las moléculas de unión pueden unirse específicamente a la proteína G del virus de la rabia o a un fragmento de la misma. Las proteínas o (poli)péptidos del virus de la rabia o bien pueden estar en forma soluble o bien pueden unirse al virus de la rabia unido o asociado a un portador o sustrato tal como se describió anteriormente. En otra realización, pueden usarse células transfectadas con la proteína G como pareja de unión para las moléculas de unión.

35 40 45 50 Las moléculas de unión de la invención neutralizan la infectividad del virus de la rabia. Esto puede lograrse evitando la unión del virus de la rabia a sus receptores en células huésped, tales como, entre otros, el receptor de neurotrofina p75 murino, la molécula de adhesión celular neuronal (CD56) y el receptor de acetilcolina, o la inhibición de la liberación del ARN en el citoplasma de la célula o evitando la transcripción o traducción del ARN. En una realización específica, las moléculas de unión evitan que el virus de la rabia infecte las células huésped en al menos el 99%, al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 60%, al menos el 50%, al menos el 45%, al menos el 40%, al menos el 35%, al menos el 30%, al menos el 25%, al menos el 20%, o al menos el 10% con respecto a la infección de las células huésped por el virus de la rabia en ausencia de dichas moléculas de unión. La neutralización puede medirse por ejemplo tal como se describe en Laboratory techniques in rabies, editado por: F.-X Meslin, M.M. Kaplan y H. Koprowski (1996), 4ª edición, Capítulos 15-17, Organización Mundial de la Salud, Ginebra. Además, las moléculas de unión humanas pueden moléculas de unión de fijación al complemento que pueden ayudar en la lisis del virus de la rabia con envuelta. Las moléculas de unión humanas también podrían actuar como opsoninas y aumentar la fagocitosis del virus de la rabia o bien potenciando su captación a través de receptores de Fc o C3b o bien aglutinando el virus de

la rabia para hacer que se fagocite más fácilmente.

En una realización preferida, las moléculas de unión que tienen actividad neutralizante contra el virus de la rabia se administran en formato de IgG, preferiblemente en formato de IgG1.

5 Otro aspecto de la presente divulgación es proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifica para al menos una molécula de unión. Tales moléculas de ácido nucleico pueden usarse como productos intermedios para fines de clonación, por ejemplo en el proceso de maduración por afinidad descrito anteriormente. En una realización preferida, las moléculas de ácido nucleico se aíslan o se purifican.

10 Otro aspecto de la divulgación es proporcionar vectores, es decir, constructos de ácido nucleico, que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico según la presente invención. Los vectores pueden derivarse de plásmidos tales como, entre otros, F, R1, RP1, Col, pBR322, TOL, Ti, etc; cósmidos; fagos tales como lambda, lambdaide, M13, Mu, P1, P22, Q<sub>β</sub>, T-even, T-odd, T2, T4, T7, etc; virus de plantas tales como, entre otros, el virus del mosaico de la alfalfa, *bromovirus*, *capillovirus*, *carlavirus*, *carmovirus*, *caulivirus*, *clostervirus*, *comovirus*, *cryptovirus*, *cucumovirus*, *dianthovirus*, *fabavirus*, *fijivirus*, *furovirus*, *geminivirus*, *hordeivirus*, *ilarvirus*, *luteovirus*, *machlovirus*, *marafivirus*, *necrovirus*, *nepovirus*, *phytoreovirus*, *rhabdovirus* de plantas, *potexvirus*, *potyvirus*, *sobemovirus*, *tenuivirus*, *tobamovirus*, *tobravirus*, virus del bronceado del tomate, *tombusvirus*, *tymovirus*, etc; o virus de animales tales como, entre otros, *adenovirus*, *arenaviridae*, *baculoviridae*, *birnaviridae*, *bunyaviridae*, *calciviridae*, *cardiovirus*, *coronaviridae*, *corticoviridae*, *cystoviridae*, virus Epstein-Barr, *enterovirus*, *filoviridae*, *flaviviridae*, virus de la glosopeda, *hepadnaviridae*, virus de la hepatitis, *herpesviridae*, virus de inmunodeficiencia, virus influenza, *inoviridae*, *iridoviridae*, *orthomyxoviridae*, *papovavirus*, *paramyxoviridae*, *parvoviridae*, *picornaviridae*, *poliovirus*, *polydnaviridae*, *poxviridae*, *reoviridae*, *retrovirus*, *rhabdoviridae*, *rhinovirus*, virus del bosque Semliki, *tetraviridae*, *togaviridae*, *toroviridae*, virus vaccinia, virus de la estomatitis vesicular, etc. Los vectores pueden usarse para la clonación y/o para la expresión de las moléculas de unión humanas y pueden incluso usarse para fines de terapia génica. También se divulgan vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico según la invención unidas operativamente a una o más moléculas de ácido nucleico que regulan la expresión. La elección del vector depende de los procedimientos recombinantes seguidos y del huésped usado. La introducción de vectores en células huésped puede realizarse, entre otros, mediante transfección con fosfato de calcio, infección con virus, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección con lipofectamina o electroporación. Los vectores pueden replicarse de manera autónoma o pueden replicarse junto con el cromosoma en el que se han integrado. Preferiblemente, los vectores contienen uno o más marcadores de selección. La elección de los marcadores puede depender de las células huésped de elección, aunque esto no es crítico para la invención tal como conocen bien los expertos en la técnica. Incluyen, pero no se limitan a, kanamicina, neomicina, puromicina, higromicina, zeocina, gen de timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-TK), el gen de la dihidrofolato reductasa de ratón (dhfr). La invención también cubre vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico que codifican para las moléculas de unión humanas tal como se describió anteriormente unidas operativamente a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican para proteínas o péptidos que pueden usarse para aislar las moléculas de unión. Estas proteínas o péptidos incluyen, pero no se limitan a, glutatión-S-transferasa, proteína de unión a maltosa, polihistidina de unión a metales, proteína fluorescente verde, luciferasa y beta-galactosidasa.

40 Un objeto adicional de la divulgación son huéspedes que contienen una o más copias de los vectores mencionados anteriormente. Preferiblemente, los huéspedes son células huésped. Las células huésped incluyen, pero no se limitan a, células de origen mamífero, vegetal, de insecto, fúngico o bacteriano. Las células bacterianas incluyen, pero no se limitan a, células de bacterias Gram positivas tales como varias especies de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus* o células de bacterias Gram negativas tales como varias especies de los géneros *Escherichia*, tales como *E. coli*, y *Pseudomonas*. En el grupo de las células fúngicas, preferiblemente se usan células de levadura. La expresión en levaduras puede lograrse usando cepas de levadura tales como entre otras *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hansenula polymorpha*. Además, pueden usarse como células huésped células de insecto tales como células de *Drosophila* y Sf9. Además de esto, las células huésped pueden ser células vegetales. Las plantas o células vegetales transformadas (transgénicas) se producen mediante métodos conocidos, por ejemplo, transferencia génica mediada por *Agrobacterium*, transformación de discos de las hojas, transformación de protoplastos mediante transferencia de ADN inducida por polietilenglicol, electroporación, sonicación, microinyección o transferencia génica balística. Adicionalmente, un sistema de expresión adecuado puede ser un sistema de baculovirus. En la presente invención se prefieren sistemas de expresión que usan células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, células BHK o células de melanoma de Bowes. Las células de mamífero proporcionan proteínas expresadas con modificaciones tras la traducción que son muy similares a las moléculas naturales de origen mamífero. Puesto que la presente invención trata de moléculas que pueden tener que administrarse a seres humanos, un sistema de expresión completamente humano sería particularmente preferido. Por tanto, incluso más preferiblemente, las células huésped son células humanas. Ejemplos de células humanas son, entre otras, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 y HEK293T. Células de mamífero preferidas son células de retina humana tales como células 911 o la línea celular depositada en la Colección europea de cultivos celulares (ECACC), CAMR, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Gran Bretaña el 29 de febrero de 1996 con el número 96022940 y comercializada con la marca PER.C6® (PER.C6 es una marca registrada de Crucell Holland B.V.). Para los fines de esta solicitud "PER.C6" se refiere a células depositadas con el número 96022940 o ancestros, pasos hacia adelante o hacia atrás así como descendientes de ancestros de células depositadas, sí como derivados de cualquiera de los anteriores.

Las células productoras humanas pueden comprender al menos una parte funcional de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región E1 de adenovirus en formato que puede expresarse. Dichas células huésped se derivan de una retina humana y están inmortalizadas con ácidos nucleicos que comprenden secuencias E1 adenovirales, tales como la línea celular depositada en la Colección europea de cultivos celulares (ECACC), CAMR, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Gran Bretaña el 29 de febrero de 1996 con el número 96022940 y comercializada con la marca PER.C6<sup>®</sup> (PER.C6 es una marca registrada de Crucell Holland B.V.). La producción de proteínas recombinantes en células huésped puede realizarse según métodos bien conocidos en la técnica. El uso de las células comercializadas con la marca PER.C6<sup>®</sup> como plataforma de producción para proteínas de interés se ha descrito en el documento WO 00/63403.

Un método de producción de una molécula de unión o una variante funcional según la invención es una parte adicional de la divulgación. El método comprende las etapas de a) cultivar un huésped en condiciones que conducen a la expresión de la molécula de unión o variante funcional de la misma, y b) opcionalmente recuperar la molécula de unión o variante funcional de la misma expresadas. Las moléculas de unión o variantes funcionales de las mismas expresadas pueden recuperarse del extracto libre de células, pero preferiblemente se recuperan del medio de cultivo. El experto en la técnica conoce bien métodos para recuperar proteínas, tales como moléculas de unión, a partir de extractos libres de células o medio de cultivo.

Alternativamente, además de la expresión en huéspedes, tales como células huésped, las moléculas de unión o variantes funcionales de las mismas pueden producirse de manera sintética mediante sintetizadores peptídicos convencionales o en sistemas de traducción libres de células usando ácido nucleico de ARN derivado de moléculas de ADN.

En otra realización, las moléculas de unión o variantes funcionales de las mismas pueden generarse mediante mamíferos no humanos transgénicos, tales como por ejemplo ratones o conejos transgénicos, que expresan genes de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, los mamíferos no humanos transgénicos tienen un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana que codifican para todas o una parte de las moléculas de unión humanas tal como se describió anteriormente. Los mamíferos no humanos transgénicos pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida del virus de la rabia o un fragmento del mismo. Los protocolos para inmunizar mamíferos no humanos están bien establecidos en la técnica. Véase *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, editado por: E. Harlow, D. Lane (1998), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York y *Current Protocols in Immunology*, editado por: J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober (2001), John Wiley & Sons Inc., Nueva York.

La presente invención proporciona un método de identificación de moléculas de unión tales como anticuerpos monoclonales humanos o fragmentos de los mismos o ácido nucleico como se reivindica en la reivindicación 1. La etapa de selección puede llevarse a cabo en la presencia de virus de la rabia. El virus de la rabia puede estar aislado o no aislado, por ejemplo, presente en el suero y/o de la sangre de un individuo infectado. En otra forma de realización el virus de la rabia está inactivado. Alternativamente, la etapa de selección se puede realizar en la presencia de un fragmento de virus de la rabia tales como una parte extracelular del virus de la rabia, uno o más (poli) péptidos derivados de virus de la rabia tales como la proteína G, proteínas de fusión que comprenden estas proteínas o (poli) péptidos, y similares. En otra realización, las células transfectadas con la proteína G del virus de la rabia se utilizan para los procedimientos de selección.

Una vez que un nuevo anticuerpo monoclonal se ha establecido o identificado con el método mencionado para la identificación de moléculas de unión o moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de unión, el ADN que codifica el scFv o Fab se puede aislar de la bacteria o paquetes genéticos replicables y se puede combinar con técnicas estándar de biología molecular para hacer construcciones que codifican scFv bivalentes o inmunoglobulinas humanas completos de una especificidad deseada (por ejemplo, IgG, IgA o IgM). Estas construcciones pueden ser transfectadas en líneas celulares adecuadas y anticuerpos monoclonales humanos completos pueden ser producidos (ver Hüls et al, 1999; Boel et al, 2000).

Un paquete genético replicable, tal y como se usa en este documento, puede ser procariota o eucariota, e incluye células, esporas, bacterias, virus, (bacterio) fagos y polisomas. Un paquete genético replicable preferido es un fago. Las moléculas de unión humanas, tales como, por ejemplo, Fv de cadena sencilla, se muestran en el paquete genético replicable, es decir, están unidos a un grupo o una molécula situada en una superficie exterior del paquete genético replicable. El paquete genético replicable es una unidad detectable que comprende una molécula de unión humana a ser detectada ligada a una molécula de ácido nucleico que codifica la molécula de unión. La molécula de ácido nucleico debe ser replicable ya sea *in vivo* (por ejemplo, como un vector) o *in vitro* (por ejemplo, por PCR, transcripción y traducción). La replicación *in vivo* puede ser autónoma (como para una célula), con la ayuda de factores del huésped (como para un virus) o con la ayuda de huésped y virus auxiliar (como para un fagémido). Los paquetes genéticos replicables que muestran una colección de moléculas de unión humanas se forman mediante la introducción de moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de unión exógenas a ser mostradas en los genomas de los paquetes genéticos replicables, para formar proteínas de fusión con proteínas endógenas que normalmente se expresan de la superficie exterior de la replicable paquetes genéticos. La expresión de las proteínas de fusión, el transporte a la superficie exterior y el ensamblaje resulta en una presentación de moléculas de unión exógenas desde la superficie exterior de los paquetes genéticos replicables. En un aspecto adicional, la invención se

refiere a una molécula de unión humana capaz de unirse al virus de la rabia o a un fragmento del mismo y siendo obtenible por el método de identificación como se describió anteriormente.

En aún un aspecto adicional, la invención se relaciona con un método de identificación de una molécula de unión que potencialmente tiene actividad neutralizante contra el virus de la rabia, en donde el método comprende las etapas de (a) poner en contacto una colección de moléculas de unión en la superficie de paquetes genéticos replicables con el virus de la rabia en condiciones que conducen a la unión, (b) separar y recuperar moléculas de unión que se unen al virus de la rabia de moléculas de unión que no se unen, (c) aislar al menos una molécula de unión recuperada, (d) verificar si la molécula de unión aislada tiene actividad neutralizante contra el virus de la rabia, caracterizado porque el virus de la rabia en la etapa a se inactiva. El virus de la rabia inactivado puede purificarse antes de ser inactivado. La purificación puede llevarse a cabo por medio de métodos de purificación bien conocidos adecuados para virus tales como, por ejemplo, centrifugación a través de un cojín de glicerol. El virus de la rabia inactivado en la etapa a se puede inmovilizar a un material adecuado antes de su uso. Alternativamente, el virus de la rabia en la etapa a puede estar aún activo. En otra forma de realización alternativa, un fragmento de un virus de la rabia, tal como un polipéptido de un virus de la rabia como la proteína G, se utiliza en la etapa a. En otra realización, las células transfectadas con la proteína G del virus de la rabia se utilizan para seleccionar molécula de unión que potencialmente puede tener actividad neutralizante contra el virus de la rabia. Como se indica en este documento, cuando las células que expresan la proteína G del virus de la rabia se incluyeron en el método de selección, el número de anticuerpos neutralizantes seleccionados fue mayor en comparación con los métodos de selección en el que sólo se utilizó proteína G del virus de la rabia purificada y/o virus de la rabia inactivado.

De acuerdo con la invención, el método de identificación de una molécula de unión que potencialmente tiene actividad neutralizante contra el virus de la rabia como se ha descrito anteriormente comprende además la etapa de separar y recuperar, y opcionalmente aislar, las moléculas de unión humanas que contienen un gen de la línea germinal pesada variable 3-30. Un experto en la técnica puede identificar el gen de la línea germinal específica por métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, la secuenciación de nucleótidos. El paso de separar y recuperar moléculas de unión que contienen un gen de la línea germinal pesada variable 3-30 se puede realizar antes o después de la etapa c. Como se indica debajo, la mayoría de anticuerpos monoclonales humanos que neutralizan virus de la rabia que se han encontrado en la presente invención comprende este gen de VH de línea germinal específico.

Métodos de presentación en fagos para la identificación y obtención de moléculas de unión (neutralizantes), por ejemplo, anticuerpos, son por ahora métodos bien establecidos conocidos por el experto en la técnica. Están, por ejemplo, descritos en la patente en EE.UU. número 5.696.108; Burton y Barbas, 1994; de Kruif et al, 1995b; y Phage Display: A Laboratory Manual. Editado por: CF Barbas, RD Burton, JK Scott y GJ Silverman (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Para la construcción de bibliotecas de presentación en fagos, colecciones de genes de región variable de cadena pesada y ligera de anticuerpos monoclonales humanos se expresan en la superficie del bacteriófago, preferiblemente bacteriófago filamentosos, partículas, por ejemplo en formato Fv de cadena sencilla (scFv) o Fab (véase de Kruif et al., 1995b). Las bibliotecas grandes de de fagos que expresan fragmentos de anticuerpo contienen normalmente más de  $1,0 \times 10^9$  especificidades de anticuerpos y pueden ser ensambladas a partir de las regiones V de inmunoglobulina expresadas en los linfocitos B de individuos inmunizados o no inmunizados. En una forma de realización específica de la invención, la librería de fagos de moléculas de unión humanas, preferiblemente de la biblioteca de fagos scFv, se prepara a partir de ARN aislado a partir de células obtenidas de un sujeto que ha sido vacunado contra la rabia o expuesto a un virus de la rabia. El ARN se puede aislar a partir de, entre otros, médula ósea o sangre periférica, preferiblemente linfocitos de sangre periférica. El sujeto puede ser un animal vacunado o expuesto al virus de la rabia, pero es preferiblemente un sujeto humano que ha sido vacunado o se ha expuesto al virus de la rabia. Preferiblemente, el ser humano ha sido vacunado. Una colección de moléculas de unión humanas en la superficie de paquetes genéticos replicables, tal como una biblioteca de fagos scFv, como se describió anteriormente es otro aspecto de la presente invención.

Alternativamente, las librerías de presentación de fagos pueden ser construidas a partir de regiones variables de inmunoglobulina que han sido parcialmente ensambladas *in vitro* para introducir la diversidad de anticuerpos adicional en la librería (librerías semi-sintéticas). Por ejemplo, regiones variables ensambladas *in vitro* contienen tramos de ADN producido sintéticamente, al azar o parcialmente al azar en aquellas regiones de las moléculas que son importantes para la especificidad del anticuerpo, por ejemplo, las regiones CDR. Fagos de anticuerpos específicos del virus de la rabia pueden ser seleccionados de las librerías mediante la inmovilización antígenos diana, tales como antígenos de virus de la rabia, en una fase sólida y, posteriormente, la exposición de los antígenos diana a una librería de fago para permitir la unión de los fagos que expresan fragmentos de anticuerpos específicos para el(los) antígeno(s) unido(s) a la fase sólida. Los fagos no unidos se eliminan mediante lavado y los fagos unidos se eluyen de la fase sólida para la infección de bacterias de *Escherichia coli* (*E. coli*) y la posterior propagación. Suelen ser necesarias múltiples rondas de selección y propagación para enriquecer suficientemente para fagos que se unen específicamente al (a los) antígeno(s) diana. Si se desea, antes de exponer la librería de fagos a los antígenos diana, la librería de fagos puede ser primero sustraída mediante la exposición de la librería de fagos a los antígenos que no son diana unidos a una fase sólida. Los fagos también se pueden seleccionar para unirse a antígenos complejos, tales como mezclas complejas de proteínas de virus de la rabia o (poli)péptidos, células

huésped que expresan una o más proteínas del virus de la rabia o (poli)péptidos del virus de la rabia, o el virus de la rabia (inactivado) en sí. Se pueden seleccionar de la librería anticuerpos de fagos específicos de antígenos mediante la incubación de una fase sólida, con una preparación de virus de la rabia inactivado unida a la misma, con la librería de anticuerpos de fago para permitir, por ejemplo, que la parte de scFv o Fab del fago se una a las proteínas/polipéptidos de la preparación de virus de la rabia. Después de la incubación y de varios lavados para eliminar los fagos sin unir y los poco adheridos, los fagos que se han unido con su parte scFv o Fab a la preparación se eluyen y se utilizan para infectar *Escherichia coli* para permitir la amplificación de la nueva especificidad. Por lo general, se requieren una o más rondas de selección para separar los fagos de interés del gran exceso de fagos que no se unen. Alternativamente, las proteínas o (poli)péptidos conocidos del virus de la rabia pueden ser expresados en células huésped y estas células se pueden utilizar para la selección de anticuerpos de fagos específicos para las proteínas o (poli)péptidos. Un método de presentación en fagos que utiliza estas células huésped puede ser ampliado y mejorado mediante la sustracción de moléculas de unión no relevantes durante el cribado por la adición de un exceso de células huésped que no comprenden moléculas diana o comprenden moléculas no diana que son similares, pero no idénticas, a la diana, y de ese modo mejorar fuertemente la probabilidad de encontrar moléculas de unión relevantes (Este proceso se conoce como el proceso de MAbstract<sup>®</sup>. MAbstract<sup>®</sup> es una marca registrada de Crucell Holland BV, véase también la Patente de EE.UU. Número 6.265.150).

Las moléculas de unión o composiciones farmacéuticas de la invención pueden someterse a prueba en sistemas de modelos animales adecuados antes de su uso en seres humanos. Tales sistemas de modelos animales incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, hámsteres, monos, etc.

Las moléculas o composiciones mencionadas anteriormente pueden emplearse junto con otras moléculas útiles en el diagnóstico, profilaxis y/o tratamiento del virus de la rabia. Pueden usarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por ejemplo, las moléculas de unión humanas, variantes funcionales, inmunoconjugados o composiciones farmacéuticas pueden administrarse conjuntamente con una vacuna frente a la rabia. Alternativamente, la vacuna también puede administrarse antes o después de la administración de las moléculas o composiciones. La administración de las moléculas o composiciones con una vacuna es adecuada para la profilaxis tras la exposición. Las vacunas de la rabia incluyen, pero no se limitan a, vacuna de células embrionarias de pollo purificadas (PCEC) (RabAvert), vacuna de células diploides humanas (HDCV; vacuna Imovax) o vacuna para la rabia adsorbida (RVA).

Las moléculas se formulan normalmente en las composiciones y composiciones farmacéuticas de la invención en una cantidad terapéuticamente eficaz o eficaz para diagnóstico. Pueden ajustarse los regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Un intervalo de dosificación adecuado puede ser por ejemplo de 0,1-100 UI/kg de peso corporal, preferiblemente 1,0-50 UI/kg de peso corporal y más preferiblemente 10-30 UI/kg de peso corporal, tal como 20 UI/kg de peso corporal.

Preferiblemente, se administra un único bolo de las moléculas de unión o composiciones farmacéuticas. Las moléculas y composiciones farmacéuticas son preferiblemente estériles. En la técnica se conocen bien métodos para hacer que estas moléculas y composiciones sean estériles. El régimen de dosificación de profilaxis tras la exposición es la administración de cinco dosis de vacuna para la rabia por vía intramuscular en el músculo deltoides en los días 0, 3, 7, 14 y 28 tras la exposición en individuos no inmunizados previamente frente al virus de la rabia. Las moléculas de unión humanas o composiciones farmacéuticas deben administrarse en y alrededor de las heridas en el día 0 o de lo contrario lo antes posible tras la exposición, administrándose el resto del volumen por vía intramuscular en un sitio distante de la vacuna. Se aconseja a los individuos no vacunados que se administren moléculas de unión humanas anti-virus de la rabia, pero queda claro que también pueden administrarse moléculas de unión humanas anti-virus de la rabia al experto en la técnica que vacunó a los individuos que necesitaban tal tratamiento.

Las moléculas de unión pueden usarse para identificar epítomos de proteínas de virus de la rabia tales como la proteína G. Los epítomos pueden ser lineales, pero también estructurales y/o conformacionales. En una realización, la unión de moléculas de unión de la invención a una serie de péptidos solapantes, tales como péptidos de 15 meros, de una proteína de virus de la rabia tales como la proteína G de virus de la rabia puede analizarse por medio de análisis de PEPSCAN (véase entre otros los documentos WO 84/03564, WO 93/09872, Sloodstra *et al.* 1996). Puede someterse a prueba la unión de moléculas de unión humanas a cada péptido en un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) basado en PEPSCAN. En otra realización, puede examinarse una biblioteca de péptidos al azar que comprende péptidos de proteínas de virus de la rabia para seleccionar péptidos que pueden unirse a las moléculas de unión humanas de la invención. En los ensayos anteriores, el uso de moléculas de unión humanas neutralizantes del virus de la rabia puede identificar uno o más epítomos neutralizantes. Los péptidos/epítomos encontrados pueden usarse como vacunas y para el diagnóstico de la rabia.

## EJEMPLOS

Para ilustrar la invención, se proporcionan los siguientes ejemplos.

### Ejemplo 1

*Reconocimiento de epítomo de anticuerpos humanos CR-57 y CR-JB anti-rabia*

Para tratar si los anticuerpos monoclonales humanos denominados CR-57 y CR-JB reconocen epítomos no solapantes, no competitivos, se generaron virus de escape de los anticuerpos monoclonales humanos denominados CR-57 y CR-JB. CR-57 y CR-JB se generaron esencialmente tal como se describe (véase Jones *et al.*, 2003), mediante introducción de las regiones codificantes de cadena ligera y pesada variable de los genes de anticuerpo correspondientes en un único vector de expresión de IgG1 humana denominado pcDNA3002(Neo). Se usaron los vectores resultantes pgSO57C11 y pgSOJBC1 para la expresión transitoria en células a partir de la línea celular depositada en la Colección europea de cultivos celulares(ECACC), CAMR, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Gran Bretaña el 29 de febrero de 1996 con el número 96022940 y comercializada con la marca PER.C6®. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de estos anticuerpos se muestran en SEQ ID NO: 122 - 129, respectivamente. Se incubaron diluciones en serie (0,5 ml) de la cepa CVS-11 del virus de la rabia (diluciones que oscilaban desde  $10^{-1}$  -  $10^{-8}$ ) con una cantidad constante (~4 UI/ml) de anticuerpo CR-57 o CR-JB (0,5 ml) durante 1 hora a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> antes de la adición a pocillos que contenían células de neuroblastoma de ratón (células MNA) o células BSR (línea celular similar a riñón de cría de hámster). Tras 3 días de selección en presencia de anticuerpo monoclonal humano o bien CR-57 o bien CR-JB, se recogió medio (1 ml) que contenía posibles virus de escape y se almacenó a 4°C hasta su uso adicional. Posteriormente, se fijaron las células en acetona durante 20 minutos a 4°C, y se tiñeron durante la noche a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> con conjugado de anticuerpo anti-rabia con N-FITC (Centocor). Se puntuó el número de focos por pocillos mediante inmunofluorescencia y se eligió el medio de pocillos que contenían de uno a seis focos para la amplificación del virus. Todos los virus de escape E57 se generaron a partir de 1 único foco con la excepción de E57B1 (3 focos). Se aislaron los virus de escape EJB a partir de 1 foco (EJB3F), 3 focos (EJB2B), 4 focos (EJB2C), 5 focos (EJB2E, 2F), o 6 focos (EJB2D), respectivamente. Cada virus de escape se amplificó en cebador lugar a pequeña escala en células BSR o MNA dependiendo de sus características de crecimiento. Entonces se usaron estos pequeños lotes de virus para amplificar adicionalmente el virus a una gran escala en células MNA o BSR. Entonces se tituló el virus amplificado en células MNA para determinar el título de cada lote de virus de escape así como la dilución óptima del virus de escape (que proporciona un 80-100% de infección tras 24 horas) para su uso en un ensayo de neutralización de virus.

Se realizaron ensayos de RFFIT modificada (prueba de inhibición con foco fluorescente rápida) para examinar la protección cruzada de E57 (los virus de escape de CR-57) y EJB (los virus de escape de CR-JB) con CR-JB y CR-57, respectivamente. Por tanto, se diluyó CR-57 o CR-JB mediante diluciones triples en serie comenzando con una dilución 1:5. Se añadió virus de la rabia (cepa CVS-11) a cada dilución a una concentración que proporciona un 80-100% de infección. Se incubó una mezcla de virus/IgG durante 1 hora a 37°C/ 5% de CO<sub>2</sub> antes de la adición a células MNA. 24 horas tras la infección (a 34°C/5% de CO<sub>2</sub>) se fijaron las células en acetona durante 20 minutos a 4°C, y se tiñeron durante un mínimo de 3 horas con un conjugado de anticuerpo anti-virus de la rabia con N-FITC (Centocor). Entonces se analizaron los pocillos para detectar infección por virus de la rabia con un microscopio de fluorescencia para determinar la dilución de criterio de valoración del 50%. Esta es la dilución a la que la infección por virus se bloquea en un 50% en este ensayo. Para calcular la potencia, se incluyó un patrón internacional (lote de inmunoglobulina de la rabia R3, material de referencia del laboratorio de patrones y ensayos DMPQ/CBER/FDA) en cada RFFIT modificada. La dilución de criterio de valoración del 50% de este patrón corresponde a una potencia de 2 UI/ml. Se sometió a prueba la potencia neutralizante de los anticuerpos monoclonales humanos individuales CR-57 y CR-JB así como la combinación de estos anticuerpos.

Los virus EJB ya no se neutralizaban por CR-JB o CR-57 (véase la tabla 1), lo que sugiere que ambos anticuerpos se unen a, e inducen cambios de aminoácido en, regiones similares de la glicoproteína del virus de la rabia. Los virus E57 ya no se neutralizaban por CR-57, mientras que 4 de cada 6 virus E57 todavía se neutralizaban por CR-JB, aunque con una potencia inferior (véase la tabla 1). Una mezcla de los anticuerpos CR-57 y CR-JB (en una razón de 1:1 UI/mg) dio resultados similares a los observados con los anticuerpos individuales (datos no mostrados).

Para identificar posibles mutaciones en la glicoproteína del virus de la rabia se determinó la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto (ORF) de la glicoproteína de cada uno de los virus de escape EJB y E57. Se aisló ARN viral de cada uno de los virus de escape y CVS-11 a partir de células MNA infectadas por virus y se convirtió en ADNc mediante RT-PCR convencional. Posteriormente, se usó ADNc para la secuenciación de nucleótidos de ORF de la glicoproteína del virus de la rabia con el fin de identificar mutaciones.

Los virus de escape tanto E57 como EJB mostraron mutaciones en la misma región de la glicoproteína (véanse las figuras 1 y 2, respectivamente; véanse para todas las secuencias descritas en las figuras 1 y 2 SEQ ID NO: 130 - 151). Esto indica que ambos anticuerpos reconocen epítomos solapantes. A partir de lo anterior puede concluirse que la combinación de CR-57 y CRJB en un cóctel no previene el escape de variantes resistentes a la neutralización y por tanto no es una preparación de inmunoglobulinas ideal para la profilaxis tras la exposición a la rabia.

## 55 **Ejemplo 2**

*Construcción de una biblioteca de presentación en fagos de ScFv usando linfocitos de sangre periférica de donantes vacunados contra la rabia.*

A partir de cuatro sujetos humanos vacunados contra la rabia se extrajeron 50 ml de sangre a partir de una vena una semana tras el último refuerzo. Se aislaron linfocitos de sangre periférica (PBL) a partir de estas muestras de sangre usando fraccionamiento por densidad celular en Ficoll. Se guardó el suero sanguíneo y se congeló a - 20°C. Se

obtuvo un resultado positivo en la prueba para determinar la presencia de anticuerpos anti-rabia en los sueros usando una tinción de FACS con células 293T transfectadas con glicoproteína del virus de la rabia. Se preparó ARN total a partir de los PBL usando separación de fase orgánica (TRIZOL™) y posterior precipitación con etanol. Se disolvió el ARN obtenido en agua ultrapura tratada con DEPC y se determinó la concentración mediante medición de DO a 260 nm. Posteriormente, se diluyó el ARN hasta una concentración de 100 ng/μl. A continuación, se convirtió 1 μg de ARN en ADNc de la siguiente manera: a 10 μl de ARN total, se le añadieron 13 μl de agua ultrapura tratada con DEPC y 1 μl de hexámeros al azar (500 ng/μl) y se calentó la mezcla obtenida a 65°C durante 5 minutos y se enfrió rápidamente en hielo húmedo. Después, se añadieron a la mezcla 8 μl de 5X tampón First-Strand, 2 μl de dNTP (10 mM cada uno), 2 μl de DTT (0,1 M), 2 μl de inhibidor de ARNasa (40 U/ml) y 2 μl de transcriptasa inversa de MMLV Superscript™III (200 U/ml), se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se incubó durante 1 hora a 50°C. Se terminó la reacción mediante inactivación por calor, es decir, incubando la mezcla durante 15 minutos a 75°C.

Se diluyeron los productos de ADNc obtenidos hasta un volumen final de 200 μl con agua ultrapura tratada con DEPC. La DO a 260 nm de una disolución diluida 50 veces (en tampón Tris 10 mM) de la dilución de los productos de ADNc obtenidos dio un valor de 0,1.

Para cada donante se usaron de 5 a 10 μl de los productos de ADNc diluidos como molde para la amplificación por PCR de las secuencias de cadena ligera lambda o kappa y la familia de cadena pesada de inmunoglobulina gamma usando cebadores oligonucleotídicos específicos (véanse las tablas 2-7). Las mezclas de reacción de PCR contenían, además de los productos de ADNc diluidos, 25 pmol de cebador sentido y 25 pmol de cebador antisentido en un volumen final de 50 μl de Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTP 250 mM y 1,25 unidades de Taq polimerasa. En un ciclador térmico de tapa calentada que tenía una temperatura de 96°C, se fundieron rápidamente las mezclas obtenidas durante 2 minutos, seguido por 30 ciclos de: 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 60°C y 60 segundos a 72°C.

En una primera ronda de amplificación, se combinaron cada uno de diecisiete cebadores sentido de región variable de cadena ligera (once para la cadena ligera lambda (véase la tabla 2) y seis para la cadena ligera kappa (véase la tabla 3) con un cebador antisentido que reconocía la región constante de C-kappa denominado HuCk 5'-ACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT-3' (véase SEQ ID NO: 152) o de C-lambda HuCλ2 5'-TGAACATTCTGTAGGGGCCACTG-3' (véase SEQ ID NO: 153) y HuCλ7 5'-AGAGCATTCTGCAGGGGCCACTG-3' (véase SEQ ID NO: 154) (los cebadores antisentido HuCλ2 y HuCλ7 se mezclaron hasta equimolaridad antes de su uso), proporcionando 4 multiplicado por 17 productos de aproximadamente 600 pares de bases. Estos productos se purificaron en un gel de agarosa al 2% y se aislaron del gel usando columnas de extracción en gel de Qiagen. Se usó 1/10 de cada uno de los productos aislados en una reacción de PCR idéntica a la descrita anteriormente usando los mismos diecisiete cebadores sentido, mediante lo cual se combinó cada cebador sentido de cadena ligera lambda con uno de los tres cebadores antisentido específicos de región J-lambda y cada cebador sentido de cadena ligera kappa se combinó con uno de los cinco cebadores antisentido específicos de región J-kappa. Los cebadores usados en la segunda amplificación se extendieron con sitios de restricción (véase la tabla 4) para permitir la clonación directa en el vector de presentación en fagos PDV-C06 (véase la figura 3 y SEQ ID NO: 155). Esto dio como resultado 4 multiplicado por 63 productos de aproximadamente 350 pares de bases que se combinaron para dar un total de 10 fracciones. Se eligió este número de fracciones para mantener la distribución natural de las diferentes familias de cadenas ligeras dentro de la biblioteca y no representar en exceso o en defecto determinadas familias. Se usó el número de alelos dentro de una familia para determinar el porcentaje de representación dentro de una biblioteca (véase la tabla 5). En la siguiente etapa, se digirieron 2,5 μg de fracción combinada y 100 μg de vector PDV-C06 con Sall y NotI y se purificaron a partir de gel. Posteriormente, se realizó la ligación durante la noche a 16°C de la siguiente manera. A 500 ng de vector PDV-C06 se le añadieron 70 ng de fracción combinada en un volumen total de 50 μl de mezcla de ligación que contenían Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM, BSA 25 μg/ml y ADN ligasa de T4 2,5 μl (400 U/μl). Se siguió este procedimiento para cada fracción combinada. Se purificaron las mezclas de ligación mediante fenol/cloroformo, seguido por una extracción en cloroformo y precipitación en etanol, métodos bien conocidos por el experto en la técnica. Se disolvió el ADN obtenido en 50 μl de agua ultrapura y se sometieron a electroporación dos alícuotas de 2,5 μl por mezcla de ligación en 40 μl de bacterias *E. coli* competentes para TG1 según el protocolo del fabricante (Stratagene). Se hicieron crecer los transformantes durante la noche a 37°C en un total de 30 placas (tres placas por fracción combinada; tamaño de la placa: 240 mm x 240 mm) que contenían agar 2TY complementado con ampicilina 50 μg/ml y un 4,5% de glucosa. Se obtuvo una (sub)biblioteca de regiones de cadena ligera variables raspando los transformantes de las placas de agar. Esta (sub)biblioteca se usó directamente para la preparación de ADN de plásmido usando un kit de preparación QIAfilter MAXI de Qiagen™.

Para cada donante se amplificaron las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada a partir de las mismas preparaciones de ADNc en un procedimiento de PCR de dos rondas similar y parámetros de reacción idénticos a los descritos anteriormente para las regiones de cadena ligera con la condición de que se usaron los cebadores representados en las tablas 6 y 7. La primera amplificación se realizó usando un conjunto de nueve cebadores dirigidos sentido (véase la tabla 6; que cubre todas las familias de regiones variables de cadena pesada) cada uno combinado con un cebador antisentido de región constante específico de IgG denominado HuCIgG 5'-GTC CAC

CTT GGT GTT GCT GGG CTT-3' (SEQ ID NO: 156) proporcionando cuatro multiplicado por nueve productos de aproximadamente 650 pares de bases. Estos productos se purificaron en un gel de agarosa al 2% y se aislaron del gel usando columnas de extracción en gel de Qiagen. Se usaron 1/10 de cada uno de los productos aislados en una reacción de PCR idéntica a la descrita anteriormente usando los mismos nueve cebadores sentido, mediante lo cual se combinó cada cebador sentido de cadena pesada con uno de los cuatro cebadores antisentido específicos de región JH. Los cebadores usados en la segunda ronda se extendieron con sitios de restricción (véase la tabla 7) para permitir la clonación dirigida en el vector de (sub)biblioteca de cadena ligera. Esto dio como resultado por donante 36 productos de aproximadamente 350 pares de bases. Se combinaron estos productos para cada donante por cebador sentido (VH) usado en nueve fracciones. Se purificaron los productos obtenidos usando columnas de purificación de PCR de Qiagen. A continuación, se digirieron las fracciones con Sfil y XhoI y se ligaron en el vector de (sub)biblioteca de cadena ligera, que se cortó con las mismas enzimas de restricción, usando el mismo procedimiento de ligación y volúmenes a los descritos anteriormente para la (sub)biblioteca de cadena ligera. Alternativamente, se digirieron las fracciones con NcoI y XhoI y se ligaron en el vector de cadena ligera, que se cortó con las mismas enzimas de restricción, usando el mismo procedimiento de ligación y volúmenes a los descritos anteriormente para la (sub)biblioteca de cadena ligera. La ligación, purificación y posterior transformación de la biblioteca definitiva resultante también se realizaron tal como se describió anteriormente para la (sub)biblioteca de cadena ligera y en este punto se combinaron las mezclas de ligación de cada donante por combinación de VH. Se hicieron crecer los transformantes en 27 placas (tres placas por fracción combinada; tamaño de la placa: 240 mm x 240 mm) que contenían agar 2TY complementado con ampicilina 50 µg/ml y un 4,5% de glucosa. Se recogieron todas las bacterias en medio de cultivo 2TY que contenía ampicilina 50 µg/ml y un 4,5% de glucosa, se mezclaron con glicerol hasta el 15% (v/v) y se congelaron en alícuotas de 1,5 ml a -80°C. Se realizaron el rescate y la selección de cada biblioteca tal como se describe a continuación.

### **Ejemplo 3**

*Selección de fagos que llevan fragmentos Fv monocatenarios que reconocen específicamente glicoproteína del virus de la rabia*

Se seleccionaron fragmentos de anticuerpo usando bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpo, tecnología de presentación en fagos general y tecnología MAbstract<sup>®</sup>, esencialmente tal como se describe en la patente estadounidense n.º 6.265.150 y en el documento WO98/15833. Las bibliotecas de fagos de anticuerpo usadas fueron dos bibliotecas de fagos scFv semisintéticas diferentes (JK1994 y WT2000) y las bibliotecas de fago scFv inmunitario (RAB-03-G01 y RAB-04-G01) preparadas tal como se describió en el ejemplo 2 anterior. La primera biblioteca de fagos scFv semisintética (JK1994) se ha descrito en de Kruif *et al.* (1995b), la segunda (WT2000) se construyó esencialmente tal como se describe en de Kruif *et al.* (1995b). En resumen, la biblioteca tiene un formato semisintético mediante lo cual se incorporó variación en los genes V de cadena ligera y pesada usando oligonucleótidos degenerados que incorporan variación dentro de las regiones CDR. Sólo se usaron genes de cadena pesada VH3, en combinación con genes de cadena ligera kappa y lambda. Se recrearon sintéticamente CDR1 y CDR3 de la cadena pesada y CDR3 de la cadena ligera en un enfoque basado en PCR similar al descrito en de Kruif *et al.* (1995b). Se clonaron secuencialmente los genes de región V así creados en un formato de scFv en un vector fagémido y se amplificaron para generar una biblioteca de fagos tal como se describió anteriormente. Además, se usaron los métodos y fagos cooperadores res descritos en el documento WO02/103012 (incorporado como referencia al presente documento) en la presente invención. Para identificar anticuerpos de fagos que reconocían la glicoproteína del virus de la rabia, se realizaron experimentos de selección de fagos usando virus de la rabia completo (cepa Pitman-Moore del virus de la rabia) inactivado mediante tratamiento con beta-propiolactona, glicoproteína del virus de la rabia purificada (cepa ERA del virus de la rabia), y/o células transfectadas que expresaban proteína G del virus de la rabia (cepa ERA del virus de la rabia).

La proteína G se purificó a partir de la cepa ERA del virus de la rabia de la siguiente manera. A una disolución de virus, se le añadió 1/10 en volumen de octil-beta-glucopiranosido al 10% y se mezcló suavemente. Tras una incubación de 30 minutos a 4°C se centrifugó la muestra de virus (36.000 rpm, 4°C) en un rotor SW51. Se recogió el sobrenadante y se dializó durante la noche a 4°C frente a Tris/EDTA 0,1 M. Posteriormente, se recogió la glicoproteína de la cámara de diálisis, se dividió en alícuotas, y se almacenó a -80°C hasta su uso adicional. Se determinó la concentración de proteína mediante DO a 280 nm y se analizó la integridad de la proteína G mediante SDS-PAGE.

Se diluyeron virus de la rabia inactivado completo o proteína G del virus de la rabia en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se añadieron 2-3 ml a tubos MaxiSorp Nunc-Inmuno (Nunc) y se incubaron durante la noche a 4°C en un agitador rotativo. Se bloqueó una alícuota de una biblioteca de fagos (500 µl, aproximadamente 10<sup>13</sup> ufc, amplificado usando fago cooperador CT (véase el documento WO 02/103012)) en tampón de bloqueo (2% de Protifar en PBS) durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Se añadió la biblioteca de fagos bloqueada al inmunotubo (preincubado o bien con o bien sin scFv de CR-57 para bloquear el epítipo reconocido por CR-57), se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, y se lavó con tampón de lavado (0,1% de Tween-20 (Serva) en PBS) para eliminar fagos no unidos. Entonces se eluyeron los fagos unidos del antígeno mediante incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente con 1 ml de glicina-HCl 50 mM, pH 2,2. Posteriormente, se mezclaron los fagos eluidos con 0,5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 7,5 para neutralizar el pH. Se usó esta mezcla para infectar 5 ml de cultivo de *E. coli* XL1-Blue que se había hecho crecer a 37°C hasta una DO a 600 nm de aproximadamente 0,3. Se

dejó que los fagos infectaran las bacterias XL1-Blue durante 30 minutos a 37°C. Después se centrifugó la mezcla durante 10 minutos, a 3200\*g a temperatura ambiente y se resuspendió el sedimento bacteriano en 0,5 ml de medio de extracto de levadura y 2-triptona (2TY). Se dividió la suspensión bacteriana obtenida en dos placas de agar 2TY complementadas con tetraciclina, ampicilina y glucosa. Tras la incubación durante la noche de las placa a 37°C, se rasparon las colonias de las placas y se usaron para preparar una biblioteca de fagos enriquecida, esencialmente tal como se describe por De Kruif *et al.* (1995a) y el documento WO 02/103012. En resumen, se usaron bacterias raspadas para inocular medio 2TY que contenía ampicilina, tetraciclina y glucosa y se hicieron crecer a una temperatura de 37°C hasta una DO a 600 nm de ~0,3. Se añadieron fagos cooperadores CT y se dejó que infectaran las bacterias tras lo cual se cambió el medio a 2TY que contenía ampicilina, tetraciclina y kanamicina. Se continuó la incubación durante la noche a 30°C. Al día siguiente, se retiraron las bacterias del medio 2TY mediante centrifugación tras lo cual se precipitaron los fagos en el medio usando polietilenglicol (PEG) 6000/NaCl. Finalmente, se disolvieron los fagos en 2 ml de PBS con un 1% de albúmina sérica bovina (BSA), se esterilizaron por filtración y se usaron para la siguiente ronda de selección.

También se realizaron selecciones de fagos con células transfectadas con glicoproteína del virus de la rabia. Las células usadas fueron células de la línea celular depositada en la Colección europea de cultivos celulares (ECACC), CAMR, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Gran Bretaña el 29 de febrero de 1996 con el número 96022940 y comercializada con la marca PER.C6<sup>®</sup>. A continuación en el presente documento se denominan células PER.C6<sup>®</sup>. En este caso, en primer lugar se añadió la biblioteca de fagos bloqueada (2 ml) a 1\*10<sup>7</sup> células sustractoras (en DMEM/10% de FBS) y se incubaron durante 1 hora a 4°C en un agitador rotativo. Las células sustractoras fueron células PER.C6<sup>®</sup> que expresaban el ectodominio de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV) en su superficie fusionado con el dominio citoplásmico y transmembrana del virus de la rabia. Con esta etapa de sustracción se eliminaron de la biblioteca de fagos los fagos que reconocían o bien la glicoproteína de VSV o bien antígenos específicos para células PER.C6<sup>®</sup>. Se centrifugó la mezcla de fagos/células (5 minutos a 4°C a 500xg) para eliminar fagos unidos a células, y se añadió el sobrenadante a un tubo nuevo que contenía 3 ml de 1\*10<sup>7</sup> células sustractoras. Se repitió dos veces la etapa de sustracción con el sobrenadante respectivo. Posteriormente, se incubaron los fagos sustraídos durante 1,5 horas a 4°C en un agitador rotativo con las células transfectadas que expresaban glicoproteína del virus de la rabia (células PER.C6<sup>®</sup> (3\*10<sup>6</sup> células)). Antes de eso, se preincubaron las células transfectadas o bien con o bien sin scFv de CR-57 para bloquear el epítipo reconocido por CR-57. Tras la incubación se lavaron las células cinco veces con 1 ml de DMEM/10% de FBS (para cada lavado, se resuspendieron las células y se transfirieron a un nuevo tubo), se eluyeron los fagos y se procesaron tal como se describió anteriormente.

Normalmente, se realizaron dos rondas de selecciones antes del aislamiento de anticuerpos de fagos individuales. Tras la segunda ronda de selección, se usaron colonias de *E. coli* individuales para preparar anticuerpos de fagos monoclonales. Esencialmente, se hicieron crecer colonias individuales hasta la fase logarítmica en un formato de palcas de 96 pocillos y se infectaron con fagos cooperadores VCSM13 tras lo cual se permitió avanzar la producción de anticuerpos de fagos durante la noche. Los anticuerpos de fagos producidos se precipitaron mediante PBG/NaCl y se esterilizaron por filtración y se sometieron a prueba en ELISA para detectar la unión tanto a virus de la rabia inactivado completo como a proteína G de virus de la rabia purificada. A partir de la selección se obtuvo un gran panel de anticuerpos de fagos que demuestra la unión tanto a virus de la rabia inactivado completo como a proteína G de virus de la rabia (véase el ejemplo a continuación). Se siguieron dos estrategias de selección con las bibliotecas inmunitarias descritas anteriormente. En la primera estrategia se seleccionaron 736 anticuerpos de fagos tras dos rondas de selección usando en la primera y la segunda ronda de selección virus inactivado o proteína G purificada. En la segunda estrategia se seleccionaron 736 anticuerpos de fagos tras dos rondas de selección usando en la primera ronda de selección proteína G recombinante expresada en la superficie celular y en la segunda ronda de selección virus inactivado o proteína G purificada. El número de anticuerpos de fagos únicos obtenidos mediante la primera estrategia fue 97, mientras que la segunda estrategia proporcionó 70 únicos. Los 97 anticuerpos de fagos únicos encontrados por medio de la primera estrategia dieron lugar a 18 anticuerpos neutralizantes y los 70 clones únicos identificados por medio de la segunda estrategia proporcionaron 33 anticuerpos neutralizantes. Esto demuestra claramente que las selecciones que incluyeron células transfectadas con glicoproteína del virus de la rabia, es decir proteína G recombinante expresada en la superficie celular, como antígeno parecieron proporcionar más anticuerpos neutralizantes en comparación con selecciones usando sólo proteína G purificada y/o virus inactivado.

#### **Ejemplo 4**

*Validación de los anticuerpos de fagos monocatenarios específicos para glicoproteína del virus de la rabia.*

Los anticuerpos de fagos monocatenarios seleccionados que se obtuvieron a partir de las selecciones descritas anteriormente, se validaron en ELISA para determinar la especificidad, es decir la unión a proteína G de virus de la rabia purificada tal como se describió anteriormente. Adicionalmente, también se sometieron a prueba los anticuerpos de fagos monocatenarios para determinar la unión a FBS al 5%. Para ello, se recubrió la preparación de proteína G de virus de la rabia o FBS al 5% en placas de ELISA Maxisorp™. Tras el recubrimiento, se bloquearon las placas en PBS/1% de Protifar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron los anticuerpos de fagos monocatenarios seleccionados durante 15 minutos en un volumen igual de PBS/1% de Protifar para obtener anticuerpos de fagos bloqueados. Se vaciaron las placas, y se añadieron los anticuerpos de fagos bloqueados a los

pocillos. Se permitió que la incubación avanzara durante una hora, se lavaron las placas en PBS que contenía un 0,1% de Tween-20 y se detectaron los anticuerpos de fagos unidos (usando medición de DO a 492 nm) usando un anticuerpo anti-M 13 conjugado con peroxidasa. Como control, se realizó simultáneamente el procedimiento sin usar ningún anticuerpo de fago monocatenario, un anticuerpo de fago monocatenario de control negativo dirigido contra CD8 (SC02-007) o un anticuerpo de fago monocatenario de control positivo dirigido contra la glicoproteína del virus de la rabia (scFv SO57). Tal como se muestra en la tabla 8, los anticuerpos de fagos seleccionados denominados SC04-001, SC04-004, SC04-008, SC04-010, SC04-018, SC04-021, SC04-026, SC04-031, SC04-038, SC04-040, SC04-060, SC04-073, SC04-097, SC04-098, SC04-103, SC04-104, SC04-108, SC04-120, SC04-125, SC04-126, SC04-140, SC04-144, SC04-146 y SC04-164 presentaron unión significativa a la proteína G de virus de la rabia purificada inmovilizada, mientras que no se observó ninguna unión a FBS. Se obtuvieron resultados idénticos en ELISA usando el virus de la rabia inactivado completo tal como se describió anteriormente (datos no mostrados).

### **Ejemplo 5**

#### *Caracterización de scFv específicos del virus de la rabia*

A partir de los clones de anticuerpos de fagos monocatenarios específicos seleccionados (scFv) se obtuvo ADN de plásmido y se determinaron secuencias de nucleótidos según técnicas convencionales.

La identidad de genes de VH y VL (véase Tomlinson IM, Williams SC, Ignatovitch O, Corbett SJ, Winter G. V-BASE Sequence Directory. Cambridge United Kingdom: MRC Centre for Protein Engineering (1997)) y composiciones de CDR3 de cadena pesada de los scFv que se unen específicamente a la proteína G de virus de la rabia se representan en la tabla 9.

### **Ejemplo 6**

#### *Neutralización in vitro de virus de la rabia mediante scFv específicos de virus de la rabia (RFFIT modificada)*

Con el fin de determinar si los scFv seleccionados podían bloquear la infección por virus de la rabia, se realizaron ensayos de neutralización *in vitro* (RFFIT modificada). Se diluyeron las preparaciones de scFv mediante diluciones triples en serie comenzando con una dilución 1:5. Se añadió virus de la rabia (cepa CVS-11) a cada dilución a una concentración que proporciona un 80-100% de infección. Se incubó una mezcla de virus/scFv durante 1 hora a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> antes de la adición a células MNA. 24 horas tras la infección (a 34°C/5% de CO<sub>2</sub>) se fijaron las células en acetona durante 20 minutos a 4°C, y se tiñeron durante un mínimo de 3 horas con un conjugado de anticuerpo anti-rabia con N-FITC (Centocor). Entonces se analizaron las células para detectar infección por virus de la rabia con un microscopio de fluorescencia para determinar la dilución de criterio de valoración del 50%. Esta es la dilución a la que la infección por virus se bloquea en un 50% en este ensayo (véase el ejemplo 1). Se identificaron varios scFv que mostraron actividad neutralizante contra el virus de la rabia (véase la tabla 10).

Adicionalmente, se investigó por medio del ensayo de neutralización *in vitro* (RFFIT modificada) tal como se describió anteriormente, si los scFv seleccionados podían neutralizar los virus de escape E57 tal como se prepararon en el ejemplo 1 (E57A2, E57A3, E57B1, E57B2, E57B3 y E57C3). Se identificaron varios scFv que mostraron actividad neutralizante contra a los virus de escape E57 (véanse las tablas 11A y 11B).

### **Ejemplo 7**

#### *ELISA de competición de proteína G de virus de la rabia con scFv*

Para identificar anticuerpos que se unían a epítopos no solapantes, no competitivos, se realizó un ELISA de competición con glicoproteína de la rabia. Se recubrieron placas Maxisorp F96 de Nunc-Inmuno™ (Nunc) durante la noche a 4°C con una dilución 1:1000 de glicoproteína del virus de la rabia purificada (1 mg/ml; cepa ERA del virus de la rabia) en PBS (50 µl). Se eliminó mediante lavado la proteína no recubierta antes de bloquear los pocillos con 100 µl de PBS/1% de Protifar durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se descartó la disolución de bloqueo y se añadieron 50 µl de los scFv anti-virus de la rabia no purificados en PBS/1% de Protifar (diluido dos veces). Se lavaron los pocillos cinco veces con 100 µl de PBS/0,05% de Tween-20. Después, se añadieron 50 µl de IgG competidora biotinilada anti-virus de la rabia, CR-57bio, a cada pocillo, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se lavaron los pocillos cinco veces con 100 µl de PBS/0,05% de Tween-20. Para detectar la unión de CR-57bio, se añadieron 50 µl de una dilución 1:2000 de estreptavidina-anticuerpo con HRP (Becton Dickinson) a los pocillos y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Volvieron a lavarse los pocillos como anteriormente y se desarrolló adicionalmente el ELISA mediante adición de 100 µl de reactivos OPD (Sigma). Se detuvo la reacción añadiendo 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M antes de medir la DO a 492 nm.

La señal obtenida con CR-57bio solo podía reducirse a niveles basales cuando se coincubaba con scFv SO57, es decir la forma de scFv de CR-57 (para las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de SO57 véanse SEQ ID NO: 205 y 206, respectivamente) o scFv SOJB, es decir la forma de scFv de CR-JB (para las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de SOJB véanse SEQ ID NO: 312 y 313, respectivamente). Esto indica que los scFv SO57 y SOJB compiten con la interacción de CR-57bio con la glicoproteína del virus de la rabia uniéndose al mismo epítopo o a un epítopo solapante al de CR-57bio, respectivamente. En cambio, un scFv irrelevante denominado

SC02-007, es decir un scFv que se une a CD8, no compitió por la unión. Los scFv anti-virus de la rabia denominados SC04-004, SC04-010, SC04-024, SC04-060, SC04-073, SC04-097, SC04-098, SC04-103, SC04-104, SC04-120, SC04-125, SC04-127, SC04-140, SC04-144 y SC04-146 tampoco compitieron con CR-57bio, lo que indica que estos scFv se unen a un epítipo diferente al epítipo reconocido por CR-57 (véase la figura 4).

5 Se obtuvieron resultados similares con el siguiente experimento. En primer lugar, se añadió el anticuerpo CR-57 frente al virus de la rabia a pocillos recubiertos con proteína G de virus de la rabia. A continuación, se añadieron los scFv de competición. En esta configuración los scFv anti-virus de la rabia se detectaron con anticuerpo anti-VSV conjugado con HRP en virtud de la presencia de una etiqueta de VSV en las secuencias de aminoácidos de scFv (véase la figura 5).

## 10 **Ejemplo 8**

*Construcción de moléculas de inmunoglobulina completamente humanas (anticuerpos monoclonales humanos anti-virus de la rabia) a partir de Fv monocatenarios seleccionados anti-virus de la rabia*

15 Regiones variables de cadena ligera y pesada de los scFv denominados SC04-001, SC04-008, SC04-018, SC04-040 y SC04-126 se amplificaron mediante PCR usando oligonucleótidos para añadir sitios de restricción y/o secuencias para la expresión en los vectores de expresión de IgG pSyn-C03-HC $\gamma$ 1 (véase SEQ ID NO: 277) y pSyn-C04-C $\lambda$  (véase SEQ ID NO: 278), respectivamente. Se amplificaron los genes de VH y VL usando los oligonucleótidos mostrados en las tablas 12 y 13, respectivamente, y se clonaron los productos de PCR en los vectores pSyn-C03-HC $\gamma$ 1 y pSyn-C04-C $\lambda$ , respectivamente.

20 Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los scFv denominados SC04-004, SC04-010, SC04-021, SC04-026, SC04-031, SC04-038, SC04-060, SC04-073, SC04-097, SC04-098, SC04-103, SC04-104, SC04-108, SC04-120, SC04-125, SC04-140, SC04-144, SC04-146 y SC04-164 también se amplificaron mediante PCR usando oligonucleótidos para añadir sitios de restricción y/o secuencias para la expresión en los vectores de expresión de IgG pSyn-C03-HC $\gamma$ 1 y pSyn-C05-C $\kappa$  (véase SEQ ID NO: 279), respectivamente. Se amplificaron los genes de VH y VL usando los oligonucleótidos facilitados en las tablas 12 y 13, respectivamente, y se clonaron los productos de PCR en los vectores pSyn-C03-HC $\gamma$ 1 y pSyn-C05-C $\kappa$ , respectivamente. Los oligonucleótidos se diseñan de tal manera que corrigen cualquier desviación de la secuencia de la línea germinal que se haya introducido durante la construcción de la biblioteca, debido al conjunto limitado de oligonucleótidos que se han usado para amplificar el gran repertorio de genes de anticuerpos. Las secuencias de nucleótidos para todos los constructos se verificaron según técnicas convencionales conocidas por el experto en la técnica.

30 Los constructos de expresión resultantes pgG104-001C03, pgG104-008C03, pgG104-018C03, pgG104-040C03 y pgG104-126C03 que codifican para las cadenas pesadas de IgG1 humana anti-virus de la rabia en combinación con el constructo pSyn-C04-V $\lambda$  relevante que codifica para la correspondiente cadena ligera, se expresaron de manera transitoria en células 293T y se obtuvieron sobrenadantes que contenían anticuerpos IgG1. Los constructos de expresión pgG104-004C03, pgG104-010C03, pgG104-021C03, pgG104-026C03, pgG104-031C03, pgG104-038C03, pgG104-060C03, pgG104-073C03, pgG104-097C03, pgG104-098C03, pgG104-103C03, pgG104-104C03, pgG104-108C03, pgG104-120C03, pgG104-125C03, pgG104-140C03, pgG104-144C03, pgG104-146C03 y pgG104-164C03 que codifican para las cadenas pesadas de IgG1 humana anti-virus de la rabia en combinación con el constructo pSyn-C05-V $\kappa$  relevante que codifica para la correspondiente cadena ligera, se expresaron de manera transitoria en células 293T y se obtuvieron sobrenadantes que contenían anticuerpos IgG1.

40 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos denominados CR04-001, CR04-004, CR04-008, CR04-010, CR04-018, CR04-021, CR04-026, CR04-031, CR04-038, CR04-040, CR04-060, CR04-073, CR04-097, CR04-098, CR04-103, CR04-104, CR04-108, CR04-120, CR04-125, CR04-126, CR04-140, CR04-144, CR04-146 y CR04-164 se determinaron según técnicas convencionales. Posteriormente, se purificaron los anticuerpos monoclonales humanos recombinantes en una columna de proteína A seguido por un intercambio de tampón en una columna de desalación usando métodos de purificación convencionales usados generalmente para inmunoglobulinas (véase por ejemplo el documento WO 00/63403).

50 Adicionalmente, para CR04-098, se generó un único vector de expresión de IgG1 humana denominado pgG104-098C10 tal como se describió anteriormente para los vectores pgSO57C11 y pgSOJBC11 que codifican para CR-57 y CR-JB, respectivamente (véase el ejemplo 1). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de anticuerpo CR04-098 codificado por el vector pgG104-098C10 se muestran en SEQ ID NO: 334 - 337, respectivamente. Se usaron vectores pgSO57C11 (véase el ejemplo 1) y pgG104-098C10 para la expresión estable de CR-57 y CR04-098, respectivamente, en células a partir de la línea celular depositada en la colección europea de cultivos celulares (ECACC), CAMR, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Gran Bretaña el 29 de febrero de 1996 con el número 96022940 y comercializada con la marca PER.C6®. Los CR-57 y CR04-098 producidos de manera estable tienen un punto isoeléctrico calculado de 8,22 y 8,46, respectivamente. Los puntos isoeléctricos observados de manera experimental son de entre 8,1-8,3 para CR-57 y 9,0-9,2 para CR04-098. Se purificaron los anticuerpos monoclonales humanos recombinantes tal como se describió anteriormente. A menos que se indique lo contrario, para CR04-001, CR04-004, CR04-008, CR04-010, CR04-018, CR04-021, CR04-026, CR04-031, CR04-038, CR04-040, CR04-060, CR04-073, CR04-097, CR04-098, CR04-103, CR04-104, CR04-108, CR04-120, CR04-

125, CR04-126, CR04-140, CR04-144, CR04-146 y CR04-164 se usaron anticuerpos monoclonales humanos recombinantes expresados de manera transitoria por el sistema de dos vectores tal como se describió anteriormente y para CR57 se usó anticuerpo monoclonal humano recombinante expresado de manera transitoria por el sistema de un vector tal como se describe en el ejemplo 1.

## 5 **Ejemplo 9**

### *ELISA de competición de proteína G de virus de la rabia con IgG*

Para tratar si las IgG monoclonales humanas anti-proteína G de virus de la rabia se unen a epítomos no solapantes, no competitivos, se realizaron experimentos de competición. Se incuban pocillos con proteína G de virus de la rabia recubierta con concentraciones crecientes (0-50 µg/ml) de IgG anti-proteína G de virus de la rabia sin marcar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se añaden 50 µl de una IgG biotinilada diferente anti-virus de la rabia (1 µg/ml) a cada pocillo, se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se lava inmediatamente cinco veces con 100 µl de PBS/0,05% de Tween-20. Posteriormente, se incuban los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente con 50 µl de una dilución 1:2000 de estreptavidina-HRP (Becton Dickinson), se lavan y se revelan tal como se describió anteriormente. Una disminución en la señal con el aumento de la concentración de IgG sin marcar indica que los dos anticuerpos están compitiendo entre sí y reconocen el mismo epítomo o epítomos solapantes.

Alternativamente, se incubaron pocillos recubiertos con proteína G de virus de la rabia (cepa ERA) con 50 µg/ml de IgG anti-proteína G de virus de la rabia sin marcar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se añadieron 50 µl de CR57 biotinilado (0,5-5 µg/ml; a niveles subsaturados) a cada pocillo. Las etapas adicionales se realizaron tal como anteriormente. Se compararon las señales obtenidas con la señal obtenida sólo con CR57 biotinilado (véase la figura 6; sin competidor). A partir de la figura 6 puede deducirse que la señal no podía reducirse con el anticuerpo denominado CR02-428 que sirvió como control negativo. En cambio, la competición con CR57 sin marcar (control positivo) o CR-JB redujo la señal a niveles basales. A partir de la figura 6 puede deducirse adicionalmente que ninguna de las IgG anti-proteína G de virus de la rabia compitió significativamente con CR-57, lo que concuerda con los datos de competición de scFv tal como se describieron en el ejemplo 7.

Además, se realizaron experimentos de competición con células PER.C6 transfectadas con proteína G de virus de la rabia (cepa ERA) por medio de citometría de flujo. Se incubaron células transfectadas con 20 µl de IgG anti-proteína G de virus de la rabia sin marcar (50 µg/ml) durante 20 minutos a 4°C. Tras lavar las células con PBS que contenía un 1% de BSA, se añadieron 20 µl de CR57 biotinilado (0,5-5 µg/ml; a nivel de sustrato) a cada pocillo, se incubó durante 5 minutos a 4°C, y se lavó inmediatamente dos veces con 100 µl de PBS que contenía un 1% de BSA. Posteriormente, se incubaron los pocillos durante 15 minutos a 4°C con 20 µl de una dilución 1:200 de estreptavidina-PE (Caltag), se lavaron y se revelaron tal como se describió anteriormente. La señal obtenida con CR57 biotinilado no pudo reducirse significativamente con el anticuerpo CR02-428 de control negativo (véase la figura 7). En cambio, la competición con CR57 sin marcar (control positivo) o CR-JB redujo la señal hasta niveles basales. Ninguna de las IgG anti-proteína G de virus de la rabia compitió significativamente con CR-57, con la excepción de CR04-126 que redujo la señal hasta aproximadamente un 30% (véase la figura 7). Este último no compitió en ELISA (véase la figura 6). Esto puede estar provocado por la diferencia en la manera en que la glicoproteína se presenta al anticuerpo en experimentos de FACS en comparación con experimentos de ELISA. La unión de CR04-126 podía depender más de la conformación de la glicoproteína, dando como resultado el efecto competitivo observado con CR04-126 en el ensayo de competición basado en FACS y no en el ensayo de competición basado en ELISA. Adicionalmente, CR04-008 y CR04-010 redujeron la señal hasta aproximadamente un 50% (véase la figura 7) en el ensayo de competición basado en FACS lo que indica que podrían competir con CR57. Sin embargo, esto no se confirmó para CR04-010 mediante los datos de competición de scFv o el ensayo de competición basado en ELISA. Para las demás IgG, los datos de FACS correspondían con los datos de ELISA respectivos tanto de los scFv como de las IgG.

## 45 **Ejemplo 10**

### *Efectos sinérgicos aditivos de IgG anti-rabia en la neutralización in vitro de virus de la rabia (RFFIT modificada)*

Con el fin de determinar si las IgG anti-proteína G de virus de la rabia tenían efectos aditivos o sinérgicos en la neutralización de virus de la rabia, se sometieron a prueba diferentes combinaciones de las IgG. En primer lugar, se determina la potencia (en UI/mg) de cada anticuerpo individual en una RFFIT modificada (véase el ejemplo 1). Después, se preparan combinaciones de anticuerpos basándose en cantidades iguales de UI/mg y se someten a prueba en la RFFIT modificada. Las potencias de cada combinación de anticuerpos pueden determinarse y compararse con las potencias esperadas. Si la potencia de la combinación de anticuerpos es igual a la suma de las potencias de cada anticuerpo individual presente en la combinación, los anticuerpos tienen un efecto aditivo. Si la potencia de la combinación de anticuerpos es superior, los anticuerpos tienen un efecto sinérgico en la neutralización de virus de la rabia.

Alternativamente, pueden determinarse efectos aditivos o sinérgicos mediante el siguiente experimento. En primer lugar, se determina la potencia de los anticuerpos que van a someterse a prueba, por ejemplo CR-57 y CR04-098, en una RFFIT convencional (véase Laboratory techniques in rabies, editado por: F-X Meslin, M.M. Kaplan y H.

Koprowski (1996), 4ª edición, capítulo 15, Organización Mundial de la Salud, Ginebra). Después, se mezclan los anticuerpos en una razón 1:1 basándose en UI/ml. Se somete a prueba esta mezcla de anticuerpos, junto con los anticuerpos individuales a la misma concentración, en seis experimentos de RFFIT independientes para determinar el criterio de valoración de neutralización al 50%. Posteriormente, se determina el índice de combinación (CI) para la mezcla de anticuerpos usando la fórmula  $CI = (C1/Cx1) + (C2/Cx2) + (C1C2/Cx1Cx2)$  tal como se describe por Chou *et al.* (1984). C1 y C2 son la cantidad (en µg) de anticuerpo monoclonal 1 y anticuerpo monoclonal 2 que conduce a una neutralización del 50% cuando se usan en combinación y Cx1 y Cx2 son las cantidades (en µg) de anticuerpo monoclonal 1 y anticuerpo monoclonal 2 que conducen a una neutralización del 50% cuando se usan solos. CI=1, indica un efecto aditivo, CI<1 indica un efecto sinérgico y CI>1 indica un efecto antagonista de los anticuerpos monoclonales.

### **Ejemplo 11**

#### *Identificación de epítomos reconocidos por anticuerpos humanos recombinantes anti-virus de la rabia mediante PEPSCAN-ELISA*

Se sintetizaron péptidos en bucle/cíclicos y lineales de 15 meros a partir del dominio extracelular de la proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia (véase SEQ ID NO: 207 para la secuencia de aminoácidos completa de la glicoproteína G de la cepa ERA del virus de la rabia, el dominio extracelular consiste en los aminoácidos 20-458; la ID de proteína de la glicoproteína de la cepa ERA del virus de la rabia en la base de datos EMBL es J02293) y se examinaron usando tarjetas mini-PEPSCAN en formato de tarjeta de crédito (formatos/tarjeta de 455 péptidos) tal como se describió anteriormente (Slootstra *et al.*, 1996; documento WO 93/09872). Se acetilaron todos los péptidos en el extremo amino-terminal. En todos los péptidos en bucle se sustituyeron la posición 2 y la posición 14 por una cisteína (acetil-XCXXXXXXXXXXCX-minitarjeta). Si había presentes otras cisteínas además de las cisteínas en la posición 2 y la posición 14 en un péptido preparado, las otras cisteínas se sustituyeron por una alanina. Se sintetizaron los péptidos en bucle usando química de Fmoc convencional y se desprotegeron usando ácido trifluoroacético con eliminadores. Posteriormente, se hicieron reaccionar los péptidos desprotegidos en las tarjetas con una disolución 0,5 mM de 1,3-bis(bromometil)benceno en bicarbonato de amonio (20 mM, pH 7,9/acetonitril (1:1 (v/v))). Se agitaron suavemente las tarjetas en la disolución durante 30-60 minutos, mientras estaban completamente cubiertas en la disolución. Finalmente, se lavaron ampliamente las tarjetas con un exceso de H<sub>2</sub>O y se sonicaron en tampón de alteración que contenía un 1% de SDS/0,1% de beta-mercaptoetanol en PBS (pH 7,2) a 70°C durante 30 minutos, seguido por sonicación en H<sub>2</sub>O durante otros 45 minutos.

Se prepararon los anticuerpos monoclonales humanos tal como se describió anteriormente. Se sometió a prueba la unión de estos anticuerpos a cada péptido lineal y en bucle en un inmunoensayo ligado a enzimas basado en PEPSCAN (ELISA). Se incubaron las tarjetas de polipropileno en formato de tarjeta de crédito de 455 pocillos, que contenían los péptidos covalentemente unidos, con los anticuerpos (10 µg/ml; diluidos en disolución de bloqueo, que contenía un 5% de suero de caballo (v/v) y un 5% de ovoalbúmina (p/v)) (4°C, durante la noche). Tras el lavado, se incubaron los péptidos con anticuerpo anti-ser humano con peroxidasa (dilución 1/1000) (1 hora, 25°C), y posteriormente, tras el lavado de la peroxidasa, se añadió sustrato sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina (ABTS) y 2 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. Se incubaron controles (para lineal y en bucle) con anticuerpo anti-ser humano con peroxidasa únicamente. Tras 1 hora se midió el desarrollo del color. El desarrollo del color del ELISA se cuantificó con una cámara CCD y un sistema de procesamiento de imágenes. La configuración consistió en una cámara CCD y una lente de 55 mm (videocámara CCD de Sony XC-77RR, lente de Nikon micronikkor 55 mm f/2,8), un adaptador de cámara (adaptador de cámara de Sony DC-77RR) y el paquete de software de procesamiento de imágenes Optimas, versión 6.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, EE.UU.). Optimas se ejecutó en un sistema informático pentium II.

Se sometieron a prueba los anticuerpos monoclonales humanos anti-proteína G de virus de la rabia para determinar la unión a los péptidos en bucle/cíclicos y lineales de 15 meros sintetizados tal como se describió anteriormente. Se considera que un péptido se une de manera relevante a un anticuerpo cuando los valores de DO son iguales o superiores al doble del valor de DO promedio de todos los péptidos (por anticuerpo). Véase la tabla 14 para resultados de la unión de los anticuerpos monoclonales humanos denominados CR57, CRJB y CR04-010 a los péptidos lineales del dominio extracelular de glicoproteína G de cepa ERA del virus de la rabia. Las regiones que muestran unión significativa a los anticuerpos respectivos están destacadas en gris (véase la tabla 14).

El anticuerpo CR57 se unió a los péptidos lineales que tenían una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SLKGACKLKLCGVLG (SEQ ID NO: 314), LKGACKLKLCGVLGL (SEQ ID NO: 315), KGACKLKLCGVLGLR (SEQ ID NO: 316), GACKLKLCGVLGLRL (SEQ ID NO: 317), ACKLKLCGVLGLRLM (SEQ ID NO: 318), CKLKLCGVLGLRLMD (SEQ ID NO: 319), KKLKLCGVLGLRLMDG (SEQ ID NO: 320), LKLCGVLGLRLMDGT (SEQ ID NO: 321) y KLCGVLGLRLMDGTW (SEQ ID NO: 322) (véase la tabla 14). Los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos GACKLKLCGVLGLRL (SEQ ID NO: 317), ACKLKLCGVLGLRLM (SEQ ID NO: 318) tienen un valor de DO que es inferior al doble del valor promedio. No obstante, se reivindican estos péptidos porque están en la proximidad cercana a una región de péptidos antigénicos reconocidos por el anticuerpo CR57. La unión fue lo más prominente al péptido con la secuencia de aminoácidos KLCGVLGLRLMDGTW (SEQ ID NO: 322).

El anticuerpo CR04-010 se unió a los péptidos lineales que tenían una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GFGKAYTIFNKTLME (SEQ ID NO: 323), FGKAYTIFNKTLMEA (SEQ ID NO: 324), GKAYTIFNKTLMEAD (SEQ ID NO: 325), KAYTIFNKTLMEADA (SEQ ID NO: 326), AYTIFNKTLMEADAH (SEQ ID NO: 327), YTIFNKTLMEADAHY (SEQ ID NO: 328), TIFNKTLMEADAHYK (SEQ ID NO: 329), IFNKTLMEADAHYKS (SEQ ID NO: 330) y FNKTLMEADAHYKSV (SEQ ID NO: 331). Los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos AYTIFNKTLMEADAH (SEQ ID NO: 327), YTIFNKTLMEADAHY (SEQ ID NO: 328) tienen un valor de DO que es inferior al doble del valor promedio. No obstante, estos péptidos se reivindican porque están en la proximidad cercana a una región de péptidos antigénicos reconocidos por el anticuerpo CR04-010. La unión fue lo más prominente a los péptidos con la secuencia de aminoácidos TIFNKTLMEADAHYK (SEQ ID NO: 329), IFNKTLMEADAHYKS (SEQ ID NO: 330) y FNKTLMEADAHYKSV (SEQ ID NO: 331).

CRJB y los anticuerpos denominados CR04-040, CR04-098 y CR04-103 (datos no mostrados) no reconocieron una región de péptidos antigénicos lineales.

Cualquiera de los péptidos anteriores o partes de los mismos representa buenos candidatos de un epítipo neutralizante contra el virus de la rabia y podría formar la base para una vacuna o para preparar anticuerpos neutralizantes para tratar y/o prevenir una infección por virus de la rabia.

SLKGACKLKLKCGVLGLRLMDGTW (SEQ ID NO: 332) y GFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSV (SEQ ID NO: 333) son regiones particularmente interesantes de la glicoproteína basándose en su alta reactividad en PEPSCAN.

A partir de los datos de PEPSCAN anteriores puede deducirse adicionalmente que los anticuerpos monoclonales humanos denominados CR57 y CR04-010 se unen a diferentes regiones de la proteína G del virus de la rabia lo que indica que reconocen epítipos no competitivos.

### **Ejemplo 12**

*Determinación de potencia neutralizante de IgG anti-proteína G de la rabia usando un ensayo de neutralización in vitro (RFFIT modificada).*

Se determinó la potencia neutralizante de cada uno de los anticuerpos monoclonales humanos producidos en una RFFIT modificada tal como se describió en el ejemplo 1. Dieciséis IgG neutralizaron la cepa CVS-11 de la rabia con una potencia superior a 1000 UI/mg, mientras que sólo dos IgG tenían una potencia inferior a 2 UI/mg (véase la tabla 15). Ocho de los dieciséis anticuerpos funcionaron mejor que CR-57 producido de manera transitoria con respecto a la potencia, lo que sugiere una eficacia superior en la profilaxis tras la exposición de virus de la rabia que CR-57. La potencia de CR-57 producido de manera transitoria fue de aproximadamente 3800 UI/mg de proteína (véanse las tablas 1 y 15), mientras que CR-57 producido de manera estable presentó una potencia de 5400 UI/mg de proteína (datos no mostrados). De manera interesante, la mayoría de los anticuerpos neutralizantes monoclonales humanos identificados contenían un gen de línea germinal 3-30 pesado variable (véase la tabla 9).

Basándose en la afinidad de los anticuerpos por el virus de la rabia (datos no mostrados) y una dilución de criterio de valoración del 100% de los anticuerpos en un ensayo de RFFIT modificada (datos no mostrados), se eligió un panel de seis IgG únicas, es decir CR04-010, CR04-040, CR04-098, CR04-103, CR04-104, y CR04-144, para un desarrollo posterior. Dentro de este panel, el anticuerpo CR04-098 fue particularmente interesante porque mostraba la mayor potencia, es decir aproximadamente 7300 UI/mg de proteína (véase la tabla 15). También se encontró una potencia similar para CR04-098 producido de manera estable (datos no mostrados).

### **Ejemplo 13**

*Neutralización in vitro de virus de escape E57 mediante IgG anti-virus de la rabia*

Para caracterizar adicionalmente los anticuerpos monoclonales humanos anti-rabia novedosos, se sometió a prueba la actividad neutralizante de las IgG frente a virus de escape E57 en una RFFIT modificada tal como se describió anteriormente. La mayoría de las IgG anti-virus de la rabia tenían buena actividad neutralizante frente a los seis virus de escape E57 (véase la tabla 16). En cambio, CR04-008, CR04-018 y CR04-126 no neutralizaron 6/6, 2/6 y 3/6 virus de escape E57, respectivamente. Ausencia de neutralización significa que no se alcanzó el criterio de valoración del 50% a una dilución de anticuerpo de 1:100. CR04-021, CR04-108, CR04-120, CR04-125, y CR04-164 mostraron una disminución significativa en la actividad neutralizante frente a varios virus de escape. Esto sugiere que el epítipo de estos anticuerpos se ha incluido o bien directa o bien indirectamente en la glicoproteína de virus de escape E57. Basándose en lo anterior, varias IgG anti-virus de la rabia pueden ser compatibles con CR-57 en un cóctel anti-rabia para el tratamiento de profilaxis tras la exposición. En particular, el panel de seis IgG únicas tal como se definió anteriormente, es decir anticuerpos CR04-010, CR04-040, CR04-098, CR04-103, CR04-104, y CR04-144, presentó buena potencia neutralizante frente a los virus de escape E57 lo que sugiere que ese/esos epítipo(s) reconocido(s) por esos anticuerpos no se veía(n) afectados por las mutaciones de aminoácidos inducidas por CR-57. El anticuerpo CR04-098 pareció el más prometedor ya que tenía una potencia superior a 3000 UI/mg para cada uno de los virus de escape.

### **Ejemplo 14**

*Reconocimiento de epítomos de anticuerpos CR-57 y CR04-098 anti-rabia*

Para confirmar que los anticuerpos monoclonales humanos denominados CR-57 y CR04-098 reconocen epítomos no solapantes, no competitivos, se generaron virus de escape del anticuerpo monoclonal humano denominado CR04-098 esencialmente tal como se describió para los virus de escape de CR57 (véase el ejemplo 1). En resumen, se puntuó el número de focos por pocillo mediante inmunofluorescencia y se eligió el medio de pocillos que contenían preferiblemente un foco para la amplificación del virus. Todos los virus de escape E98 se generaron a partir de 1 único foco con la excepción de E98-2 (2 focos) y E98-4 (4 focos). Un virus se definió como una variante de escape si el índice de neutralización era  $<2,5$  log. El índice de neutralización se determinó restando el número de partículas de virus infecciosas/ml producido en cultivos de células BSR infectadas con virus más anticuerpo monoclonal ( $\sim 4$  UI/ml) del número de partículas de virus infecciosas/ml producido en cultivos de células BSR o MNA infectadas con virus solo virus ([log de unidades formadoras de focos/ml de virus en ausencia de anticuerpo monoclonal menos log de uff/ml de virus en presencia de anticuerpo monoclonal]). Se consideró que un índice inferior a 2,5 log era evidencia de escape.

Para investigar adicionalmente que CR04-098 se une a un epítomo no solapante, no competitivo, diferente en comparación con CR-57, se sometió CR-57 a prueba frente a virus de escape E98 en un ensayo de RFFIT modificada tal como se describió anteriormente. Tal como se muestra en la tabla 17, CR-57 tenía buena actividad neutralizante frente a los cinco virus de escape E98. Adicionalmente, se sometieron los anticuerpos CR04-010 y CR04-144 a prueba para determinar la actividad neutralizante frente a los virus de escape E98. Ninguno de los anticuerpos neutralizó los virus de escape E98 (datos no mostrados) lo que sugiere que el epítomo reconocido por ambos anticuerpos se ve afectado o bien directa o bien indirectamente por la mutación de aminoácidos inducida por el anticuerpo CR04-098. Se sometieron los anticuerpos CR04-018 y CR04-126 a prueba para determinar la actividad neutralizante frente a sólo uno de los virus de escape E98, es decir E98-4. CR04-018 podría neutralizar el virus de escape, mientras que CR04-126 sólo tenía una débil potencia neutralizante frente al virus de escape. Esto sugiere que el epítomo reconocido por CR04-018 no se ve afectado por la mutación inducida por el anticuerpo CR04-098. Adicionalmente, los anticuerpos CR04-010, CR04-038, CR04-040, CR04-073, CR04-103, CR04-104, CR04-108, CR04-120, CR04-125, CR04-164 no neutralizaron E98-4 lo que sugiere que reconocen el mismo epítomo que CR04-098 (datos no mostrados).

Para identificar posibles mutaciones en la glicoproteína de la rabia de cada uno de los virus de escape E98, se determinó la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto (ORF) de la glicoproteína tal como se describió anteriormente para los virus de escape E57 y EJB. Todos los virus de escape E98 mostraron la mutación N a D en la posición de aminoácido 336 de la glicoproteína de la rabia (véase la figura 8). Esta región de la glicoproteína se ha definido como sitio antigénico III que consiste en los aminoácidos 330-338 (numeración sin péptido señal). En cambio, CR-57 reconoció un epítomo ubicado en los aminoácidos 226-231 (numeración sin péptido señal), que se solapa con el sitio antigénico I. Además de la mutación N336D del virus de escape E98 denominado E98-5 mostró la mutación H a Q en la posición de aminoácido 354 (cambio de codón de CAT a CAG) de la glicoproteína de la rabia (datos no mostrados).

Además, un análisis de Pepscan de la unión de CR57 a péptidos que alojan el epítomo de CR57 mutado (tal como se observa en los virus de escape E57) no mostró que se eliminará la interacción de CR57 (datos no mostrados). Sorprendentemente, CR04-098 todavía podía unirse a la glicoproteína mutada (que comprende la mutación N336D) expresada en células PER.C6®, según se mide mediante citometría de flujo (datos no mostrados), aunque los virus que contenían esta mutación ya no se neutralizaban.

Además, se realizaron estudios de mapeo de epítomo y estudios de clasificación de afinidad usando un análisis de resonancia de plasmón superficial usando un sistema analítico BIAcore3000™. Se inmovilizó la glicoproteína de la rabia purificada (cepa ERA) como ligando en un chip sensor de 4 canales de flujo CM5 de calidad para investigación (Fc) (Biacore AB, Suecia) usando acoplamiento con amina. La clasificación se realizó a 25°C con HBS-EP (Biacore AB, Suecia) como tampón de ejecución. Se inyectaron 50  $\mu$ l de cada anticuerpo a una velocidad de flujo constante de 20  $\mu$ l/min. Después, se aplicó tampón de ejecución durante 750 segundos seguido por regeneración del chip CM5 con 5  $\mu$ l de NaOH 2 M, 5  $\mu$ l de HCl 45 mM y 5  $\mu$ l de NaOH 2 mM. Se trazaron las señales de resonancia expresadas como unidades de resonancia (UR) como función del tiempo y se determinaron el aumento y la disminución de UR como una medida de la asociación y disociación, respectivamente, y se usaron para la clasificación de los anticuerpos. Los valores de KD reales para CR57 y CR04-098 según se determinaron mediante análisis de resonancia de plasmón superficial fueron de 2,4 nM y 4,5 nM, respectivamente. Los estudios de mapeo de epítomo confirmaron adicionalmente que CR57 y CR04-098 se unen a diferentes epítomos en la glicoproteína de la rabia. La inyección de CR57 dio como resultado una respuesta de 58 UR (datos no mostrados). Tras la inyección de CR04-098 se obtuvo un aumento adicional del nivel de respuesta (24 UR), lo que sugiere que los sitios de unión para CR04-098 no estaban ocupados (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares cuando se aplicó el orden inverso lo que muestra que cada anticuerpo alcanzó niveles de UR similares independientemente del orden de inyección (datos no mostrados). Estos resultados demuestran adicionalmente que CR57 y CR04-098 pueden unirse simultáneamente y reconocer diferentes epítomos en la glicoproteína del virus de la rabia.

En general, los datos anteriores confirman adicionalmente que los anticuerpos CR-57 y CR04-098 reconocen epítomos no solapantes distintos epítomos, es decir epítomos en el sitio antigénico I y III, respectivamente. Los datos

concuerdan bien con los datos de competición de ELISA/FACS que indican que CR-57 y CR04-098 no compiten por la unión a la proteína G de la cepa ERA y la buena actividad neutralizante del anticuerpo CR04-098 frente a todos los virus de escape E57. Basándose en estos resultados y el hecho de que la exposición *in vitro* de virus de la rabia a la combinación de CR57 y CR04-098 (selección en presencia de 4 UI/ml de cualquier anticuerpo) no proporcionó virus de escape (datos no mostrados), se concluyó que los anticuerpos CR-57 y CR04-098 reconocen epítomos no solapantes, no competitivos, y pueden usarse ventajosamente en un cóctel de anticuerpos anti-virus de la rabia para el tratamiento de profilaxis tras la exposición.

**Ejemplo 15**

*Evaluación de la conservación del epítopo reconocido por CR57 y CR04-098*

Se alineó la región de unión mínima de CR-57 (aminoácidos KLCGVL dentro de SEQ ID NO: 332, la región de la glicoproteína de virus de la rabia reconocida por CR57 según se determina por medio de PEPSCAN y tecnología de exploración de alanina) con secuencias de nucleótidos de 229 aislados de virus de la rabia de genotipo 1 para evaluar la conservación del epítopo (véase la tabla 18). El conjunto de muestras contenía aislados humanos, aislados de murciélago y aislados de perros o de animales domésticos muy probablemente mordidos por perros con rabia. Un análisis de frecuencia de los aminoácidos en cada posición dentro de la región de unión mínima reveló que los residuos críticos que constituyen el epítopo estaban altamente conservados. La lisina en la posición uno se conservó en un 99,6% de los aislados, mientras que sólo en 1/229 aislados se observó una mutación K>R conservativa. Las posiciones dos y tres (L y C) se conservaron completamente. Se cree que el residuo de cisteína central participa estructuralmente en el plegamiento de la glicoproteína y se conserva en todos los *lyssavirus* (véase Badrane y Tordo, 2001). La glicina en la posición cuatro se conservó en un 98,7% de los aislados, mientras que en 3/229 aislados se observaron mutaciones hacia aminoácidos cargados (G>R en 1/229; G>E en 2/229). La quinta posición también se conservó con la excepción de un aislado en el que se observó una mutación V>I conservativa. En la sexta posición, que no es un residuo crítico según se determinó mediante exploración de sustitución con alanina, se observó una heterogeneidad significativa en los aislados naturales: L en el 70,7%, P en el 26,7% y S en el 2,6% de las cepas, respectivamente. En conjunto, se predice que aproximadamente el 99 por ciento de los virus de la rabia que pueden encontrarse se reconocen por el anticuerpo CR-57.

Se analizaron 123 de estos 229 aislados de virus para determinar la presencia de mutaciones tanto en el epítopo de CR-57 como en el CR04-098. Ninguno de estos 123 virus naturales contenía mutaciones en ambos epítomos. La mutación N>D según se observó en los virus de escape E98 sólo estaba presente en cinco aislados de virus. Estos virus eran geográficamente distintos y se aislaron de animales en África (véase la figura 9 para un árbol filogenético; los cinco aislados de virus, es decir AF325483, AF325482, AF325481, AF325480 y AF325485, se indican en negrita). El análisis filogenético de secuencias de glicoproteína reveló que los virus de la rabia con epítomos de CR57 mutados sólo están relacionados de manera distante con virus de la rabia que llevan un epítopo de CR04-098 mutado. Por tanto, la probabilidad de encontrar un virus de la rabia resistente a la neutralización mediante un cóctel de CR-57 y CR04-098 es prácticamente inexistente.

Tabla 1: Potencia neutralizante de CR-57 y CR-JB frente a virus de tipo natural y de escape

Virus	Potencia CR-57 (UI/mg)	Potencia CR-JB (UI/mg)	Virus	Potencia CR-57 (UI/mg)	Potencia CR-JB (UI/mg)
CVS-11	3797	605	CVS-11	3797	605
E57A2	0	<0,2	EJB2B	0,004	0,6
E57A3	0	419	EJB2C	<0,004	2
E57B1	0	93	EJB2D	<0,004	3
E57B2	0	<0,3	EJB2E	<0,2	<0,3
E57B3	0	419	EJB2F	<0,06	3
E57C3	0	31	EJB3F	<0,04	0,06

Tabla 2: Cebadores de región variable de cadena lambda humana (sentido).

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos del cebador	SEQ ID NO
HuVλ1A	5'-CAGTCTGTGCTGACT CAGCCACC-3'	SEQ ID NO: 208
HuVλ1B	5'-CAGTCTGTGYTGACG CAGCCGCC-3'	SEQ ID NO: 209
HuVλ1C	5'-CAGTCTGTCGTGACG CAGCCGCC-3'	SEQ ID NO: 210

HuVλ2	5'-CARTCTGCCCTGACT CAGCCT-3'	SEQ ID NO: 211
HuVλ3A	5'-TCCTATGWGCTGACT CAGCCACC-3'	SEQ ID NO: 212
HuVλ3	5'-TCTTCTGAGCTGACT CAGGACCC-3'	SEQ ID NO: 213
HuVλ4	5'-CACGTTATACTGACT CAACCGCC-3'	SEQ ID NO: 214
HuVλ5	5'-CAGGCTGTGCTGACT CAGCCGTC-3'	SEQ ID NO: 215
HuVλ6	5'-AATTTTATGCTGACT CAGCCCCA-3'	SEQ ID NO: 216
HuVλ7/8	5'-CAGRCTGTGGTGACY CAGGAGCC-3'	SEQ ID NO: 217
HuVλ9	5'-CWGCCTGTGCTGACT CAGCCMCC-3'	SEQ ID NO: 218

Tabla 3: Cebadores de región variable de cadena kappa humana (sentido).

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos del cebador	SEQ ID NO
HuVκ1B	5'- GACATCCAGWTGACCC AGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 219
HuVκ2	5'-GATGTTGTGATGACT CAGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 220
HuVκ3	5'-GAAATTGTGWTGACR CAGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 221
HuVκ4	5'-GATATTGTGATGACC CACACTCC-3'	SEQ ID NO: 222
HuVκ5	5'-GAAACGACACTCACG CAGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 223
HuVκ6	5'-GAAATTGTGCTGACTC AGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 224

5 Tabla 4: Cebadores de región variable de cadena kappa humana extendidos con sitios de restricción Sall (sentido), cebadores de región J de cadena kappa humana extendidos con sitios de restricción NotI (antisentido), cebadores de región variable de cadena lambda humana extendidos con sitios de restricción Sall (sentido) y cebadores de región J de cadena lambda humana extendidos con sitios de restricción NotI (antisentido).

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos del cebador	SEQ ID NO
HuVκB-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCG ACGGACATCCAGWTGACC CAGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 225
HuVκ2-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCG ACGGATGTTGTGATGACT CAGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 226
HuVκ3B-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCG ACGGAAATTGTGWTGACR CAGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 227
HuVκ4B-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCG ACGGATATTGTGATGACC CACACTCC-3'	SEQ ID NO: 228

ES 2 426 725 T3

HuVκ5-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG GAAACGACACTCACGCAGTCT CC-3'	SEQ ID NO: 229
HuVκ6-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCG ACGGAAATTGTGCTGACT CAGTCTCC-3'	SEQ ID NO: 230
HuVκ1-NotI	5'-GAGTCATTCTCGACTTGC GGCCGCACGTTTGATTTCCAC CTTGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 231
HuJκ2-NotI	5'-GAGTCATTCTCGACT TGCGGCCGCACGTTTGAT CTCCAGCTTGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 232
HuJκ3-NotI	5'-GAGTCATTCTCGACTTGC GGCCGCACGTTTGATATCCAC TTTGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 233
HuVκ4-NotI	5'-GAGTCATTCTCGACT TGCGGCCGCACGTTTGAT CTCCACCTTGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 234
HuVκ5-NotI	5'-GAGTCATTCTCGACTTGC GGCCGCACGTTTAATCTCCAG TCGTGTCCC-3'	SEQ ID NO: 235
HuVλ1A-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CAGTCTGTGCTGACTCAGCCA CC-3'	SEQ ID NO: 236
HuVλ1B-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CAGTCTGTGYTGACGCAGCCG CC-3'	SEQ ID NO: 237
HuVλ1C-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CAGTCTGTCGTGACGCAGCCG CC-3'	SEQ ID NO: 238
HuVλ2-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CARTCTGCCCTGACTCAGCCT- 3'	SEQ ID NO: 239
HuVλ3A-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG TCCTATGWGCTGACTCAGCCA CC-3'	SEQ ID NO: 240
HuVλ3B-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG TCTTCTGAGCTGACTCAGGAC CC-3'	SEQ ID NO: 241
HuVλ4-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CACGTTATACTGACTCAACCG CC-3'	SEQ ID NO: 242
HuVλ5-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CAGGCTGTGCTGACTCAGCCG TC-3'	SEQ ID NO: 243
HuVλ6-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG AATTTTATGCTGACTCAGCCC CA-3'	SEQ ID NO: 244
HuVλ7/8-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CAGRCTGTGGTGACYCAGGAG CC-3'	SEQ ID NO: 245

ES 2 426 725 T3

HuV $\lambda$ 9-Sall	5'-TGAGCACACAGGTCGACG CWGCCTGTGCTGACTCAGCCM CC-3'	SEQ ID NO: 246
HuJ $\lambda$ -NotI	5'-GAGTCATTCTCGACTTGC GGCCGCACCTAGGACGGTGAC CTTGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 247
HuV $\lambda$ 2/3-NotI	5'-GAGTCATTCTCGACTTGC GGCCGCACCTAGGACGGTCAG CTTGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 248
HuJ $\lambda$ 4/5-NotI	5'-GAGTCATTCTCGACTTGC GGCCGCACYTAAAACGGTGAG CTGGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 249

Tabla 5: Distribución de los diferentes productos de cadena ligera a lo largo de las 10 fracciones.

Productos de cadena ligera	Número de alelos	Número de fracciones	alelos/fracción
Vk1B/Jk1-5	19	1 y 2	9.5
Vk2/Jk1-5	9	3	9
Vk3B/Jk1-5	7	4	7
Vk4B/Jk1-5	1	5	5
Vk5/Jk1-5	1		
Vk6/Jk1-5	3		
Vλ1A/J11-3	5	6	5
Vλ1B/J11-3		7	5
Vλ1C/J11-3			
Vλ2/J11-3	5	8	9
Vλ3A/J11-3	9	9	5
Vλ3B/J11-3	3		
Vλ4/J11-3	1		
Vλ5/J11-3	1	10	6
Vλ6/J11-3	3		
Vλ7/8/J11-3	3		
Vλ9/J11-3	3		

Tabla 6: Cebadores de región variable de cadena pesada de IgG humana (sentido).

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos del cebador	SEQ ID NO
HuVH1B/7A	5'-CAGRTGCAGCTGGTG CARTCTGG-3'	SEQ ID NO: 250
HuVH1C	5'-SAGGTCCAGCTGGTR CAGTCTGG-3'	SEQ ID NO: 251
HuVH2B	5'-SAGGTGCAGCTGGTG GAGTCTGG-3'	SEQ ID NO: 252
HuVH3B	5'-SAGGTGCAGCTGGTG GAGTCTGG-3'	SEQ ID NO: 253
HuVH3C	5'-GAGGTGCAGCTGGTG GAGWCYGG-3'	SEQ ID NO: 254
HuVH4B	5'-CAGGTGCAGCTACAG CAGTGGGG-3'	SEQ ID NO: 255
HuVH4C	5'-CAGSTGCAGCTGCAG GAGTCSGG-3'	SEQ ID NO: 256
HuVH5B	5'-GARGTGCAGCTGGTG CAGTCTGG-3'	SEQ ID NO: 257
HuVH6A	5'-CAGGTACAGCTGCAG CAGTCAGG-3'	SEQ ID NO: 258

5

Tabla 7: Cebadores de región variable de cadena pesada de IgG humana extendidos con sitios de restricción SfiI/NcoI (sentido) y cebadores de región J de cadena pesada de IgG humana extendidos con sitios de restricción XhoI/BstEII (antisentido).

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos del cebador	SEQ ID NO
--------------------	--------------------------------------	-----------

ES 2 426 725 T3

HuVH1B/7A-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCG GCCCAGCCGGCCATGGCC CAGRTGCAGCTGGTGCAR TCTGG-3'	SEQ ID NO: 259
HuVHIC-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCG GCCCAGCCGGCCATGGCC SAGGTCCAGCTGGTRCAG TCTGG-3'	SEQ ID NO: 260
HuVH2B-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCG GCCCAGCCGGCCATGGCC CAGRTCACCTTGAAGGAG TCTGG-3'	SEQ ID NO: 261
HuVH3B-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCGGCC CAGCCGGCCATGGCCSAGGTG CAGCTGGTGGAGTCTGG-3'	SEQ ID NO: 262
HuVH3C-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCG GCCCAGCCGGCCATGGCC GAGGTGCAGCTGGTGGAG WCYGG-3'	SEQ ID NO: 263
HuVH4B-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCG GCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTGCAGCTACAGCAG TGGGG-3'	SEQ ID NO: 264
HuVH4C-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCGGCC CAGCCGGCCATGGCCCAGSTG CAGCTGCAGGAGTCSGG-3'	SEQ ID NO: 265
HuVH5B-Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCG GCCCAGCCGGCCATGGCC GARGTGCAGCTGGTGCAG TCTGG-3'	SEQ ID NO: 266
HuVH6A.Sfil	5'-GTCCTCGCAACTGCG GCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTACAGCTGCAGCAG TCAGG-3'	SEQ ID NO: 267
HuJH1/2-XhoI	5'-GAGTCATTCTCGACTCGA GACGGTGACCAGGGTGCC-3'	SEQ ID NO: 268
HuJH3-XhoI	5'-GAGTCATTCTCGACT CGAGACGGTGACCATTGT CCC-3'	SEQ ID NO: 269
HuJH4/5-XhoI	5'-GAGTCATTCTCGACT CGAGACGGTGACCAGGGT TCC-3'	SEQ ID NO: 270
HuJH6-XhoI	5'-GAGTCATTCTCGACTCGA GACGGTGACCGTGGTCCC-3'	SEQ ID NO: 271

Tabla 8: Unión de anticuerpos de fagos monocatenarios (scFv) a proteína G de virus de la rabia (cepa ERA) y a FBS según se mide mediante ELISA.

Nombre de anticuerpo de fagos	Proteína G de virus de la rabia (DO a 492 nm)	FBS (DO a 492 nm)
SC04-001	0,828	0,053
SC04-004	0,550	0,054
SC04-008	0,582	0,058

ES 2 426 725 T3

SC04-010	0,915	0,043
SC04-018	0,247	0,052
SC04-021	0,278	0,052
SC04-026	0,212	0,054
SC04-031	0,721	0,065
SC04-038	0,653	0,061
SC04-040	0,740	0,053
SC04-060	0,923	0,056
SC04-073	0,657	0,054
SC04-097	0,835	0,056
SC04-098	0,798	0,060
SC04-103	0,606	0,059
SC04-104	0,566	0,063
SC04-108	0,363	0,052
SC04-120	0,571	0,052
SC04-125	0,735	0,049
SC04-126	0,232	0,051
SC04-140	0,865	0,057
SC04-144	0,775	0,054
SC04-146	0,484	0,057
SC04-164	0,547	0,057
Control (SO57)	0,650	0,055
Control (02-007)	0,063	0,052

Tabla 9: Datos de los Fv monocatenarios que pueden unirse a proteína G de virus de la rabia.

Nombre de scFv (bib.)	SEQ ID NO de secuencia de nucl.	SEQ ID NO de secuencia de aminoácidos	HCDR3 (SEQ ID NO:)	Locus de V <sub>H</sub>	Locus de V <sub>L</sub>
sc04-001 (JK1994)	157	158	GLYGELFDY (SEQ ID NO: 1)	3-20 (DP32)	V13 (31 -V2-13)
sc04-004 (WT2000)	159	160	DYLYPTTDFDY (SEQ ID NO: 2)	3-23 (DP47)	Vkl (012/02- DPK9)
sc04-008 (RAB-03- G01)	161	162	MGFTGTDFDY (SEQ ID NO: 3)	2-70 (DP28)	V13 (3h -V2-14)
sc04-010 (RAB-03- G01)	163	164	DGLDLTGTIQPFY (SEQ ID NO:4)	3-30 (DP49)	Vkl (L11 - DPK3)
sc04-018 (RAB-03- G01)	165	166	VSVTTGAFNI (SEQ ID NO: 5)	4-04 (DP70)	V11 (1c -V1-16)
sc04-021 (RAB-03- G01)	167	168	GSLVGDADFID (SEQ ID NO: 6)	3-30 (DP49)	Vkl (L8)
sc04-026 (RAB-03- G01)	169	170	TSNWNYLDRFDP (SEQ ID NO: 7)	5-51 (DP73)	VkII (A 19/03 -DPK15)
sc04-031 (RAB-03- G01)	171	172	GSLVGDADFID (SEQ ID NO: 8)	3-30 (DP49)	Vkl (L5 - DPK5)
sc04-038 (RAB-03- G01)	173	174	GSLVGDADFID (SEQ ID NO: 9)	3-30 (DP49)	Vkl (L5 - DPK5)
sc04-040 (RAB-03- G01)	175	176	GSKVGDADFID (SEQ ID NO: 10)	3-30 (DP49)	V13 (3h -V2-14)
sc04-060 (RAB-04- G01)	177	178	EKEKYSDRSYGYSY YYYMDV (SEQ ID NO:11)	4-59 (DP71)	Vkl (O12/02 - DPK9)
sc04-073 (RAB-04- G01)	179	180	DGLDLTGTIQPFY (SEQ ID NO:12)	3-30 (DP49)	Vkl (L12)
sc04-097 (RAB-04- G01)	181	182	TASNLGRGGMDV (SEQ ID NO: 13)	3-23 (DP47)	Vkl (L8)
sc04-098 (RAB-04- G01)	183	184	VAVAGTHFDY (SEQ ID NO: 14)	3-30 (DP49)	Vkl (A30)
sc04-103 (RAB-04- G01)	185	186	VAVAGESFDS (SEQ ID NO: 15)	3-30 (DP49)	Vkl (L5 - DPK5)
sc04-104 (RAB-04- G01)	187	188	IVVV TALDAFDI (SEQ ID NO: 16)	3-30 (DP49)	Vkl (L12)
sc04-108 (RAB-04- G01)	189	190	FMIVADDAFDI	3-30 (DP49)	Vkl (L1)

ES 2 426 725 T3

04- G01)			(SEQ ID NO: 17)		
sc04-120 (RAB-04- G01)	191	192	GGKTGEFDY (SEQ ID NO: 18)	3-30 (DP49)	Vkl (L8)
sc04-125 (RAB-04- G01)	193	194	IATAGTGFDY (SEQ ID NO: 19)	3-30 (DP49)	Vkl (L8)
sc04-126 (RAB-04- G01)	195	196	MGFTGTYTDY (SEQ ID NO: 20)	2-70 (DP28)	V13 (3h -V2-14)
sc04-140 (RAB-04- G01)	197	198	VTNPGDAFDI (SEQ ID NO: 21)	3-30 (DP49)	Vkl (L4/18a)
sc04-144 (RAB-04- G01)	199	200	GGKTGEFDY (SEQ ID NO: 22)	3-30 (DP49)	Vkl (L8)
sc04-146 (RAB-04- G01)	201	202	GGKTGEFDY (SEQ ID NO: 23)	3-30 (DP49)	VkIII (L2 - DPK21)
sc04-164 (RAB-04- G01)	203	204	GSLVGDFAFDI (SEQ ID NO: 24)	3-30 (DP49)	Vkl (L19 - DPK6)
SO57	205	206	ENLDNSGTYYYFS GWFDP (SEQ ID NO:25)	1-69 (DP10)	V12 (2e -VI-3)
SOJB	312	313	RQHISFPWFDS (SEQ ID NO: 276)	2-05	V13 (3h -V2-14)

Tabla 10: Datos de ensayo para determinar la actividad neutralizante contra el virus de la rabia de scFv.

Nombre de scFv	Dilución de criterio de valoración del 50%	Norma de la OMS de dilución de criterio de valoración del 50% (2 UI/ml)	Potencia (UI/ml)
SC04-001	270	405	1,3
SC04-004	3645	405	18
SC04-008	>10935	405	>54
SC04-010	810	405	4
SC04-018	15	405	0,1
SC04-021	270	405	1,3
SC04-026	45	270	0,3
SC04-031	90	270	0,7
SC04-038	270	270	2
SC04-040	45	270	0,3
SC04-060	30	270	0,2
SC04-073	405	270	3
SC04-097	30	270	0,2
SC04-098	1215	270	9
SC04-103	45	270	0,3
SC04-104	135	270	1
SC04-108	135	270	1
SC04-120	810	270	6
SC04-125	405	270	3
SC04-126	10	270	0,1
SC04-140	135	270	1
SC04-144	810	270	6
SC04-146	405	270	3
SC04-164	45	270	0,3

5 Tabla 11A: Datos de ensayo para medir la actividad neutralizante de scFv para virus de escape E57 E57A2, E57A3 y E57B1.

Nombre de scFv	E57A2			E57A3			E57B1		
	1*	2*	3*	1*	2*	3*	1*	2*	3*
SC04-001	10	90	0,2	10	90	0,2	30	45	1,3
SC04-004	810	90	18,0	1215	90	27,0	810	45	36,0
SC04-008	10	90	0,2	15	90	0,3	270	45	12,0
SC04-010	270	90	6,0	270	90	6,0	270	45	12,0
SC04-018	5	90	0,1	15	90	0,3	15	45	0,7
SC04-021	10	90	0,2	30	90	0,7	10	90	0,2
SC04-026	<5	90	0,0	<5	45	0,0	<5	90	0,0
SC04-031	10	90	0,2	30	90	0,7	10	90	0,2

ES 2 426 725 T3

SC04-038	90	90	2,0	90	90	2,0	45	90	1,0
SC04-040	15	90	0,3	5	90	0,1	5	90	0,1
SC04-060	5	90	0,1	5	90	0,1	<5	90	0,0
SC04-073	135	90	3,0	90	30	6,0	30	30	2,0
SC04-097	<5	90	0,0	<5	90	0,0	<5	90	0,0
SC04-098	810	90	18,0	270	30	18,0	270	30	18,0
SC04-103	<5	90	0,0	10	90	0,2	5	90	0,1
SC04-104	90	90	2,0	30	30	2,0	30	30	2,0
SC04-108	15	90	0,3	<5	90	0,0	<5	90	0,0
SC04-120	45	90	1,0	30	30	2,0	10	30	0,7
SC04-125	135	90	3,0	135	30	9,0	90	30	6,0
SC04-126	<5	90	0,0	<5	45	0,0	<5	90	0,0
SC04-140	30	45	1,3	90	30	6,0	45	90	1,0
SC04-144	270	45	12,0	270	30	18,0	135	90	3,0
SC04-146	90	45	4,0	90	30	6,0	90	90	2,0
SC04-164	15	45	0,7	30	30	2,0	15	90	0,3

1\* es la dilución de criterio de valoración del 50%

2\* es la norma de la OMS de dilución de criterio de valoración del 50% (2 UI/ml)

3\* es la potencia (UI/ml)

5 Tabla 11 B: Data de ensayo para medir la actividad neutralizante de scFv para virus de escape E57 E57B2, E57B3 y E57C3.

Nombre de scFv	E57B2			E57B3			E57C3		
	1*	2*	3*	1*	2*	3*	1*	2*	3*
SC04-001	30	45	1,3	90	270	0,7	5	90	0,1
SC04-004	5	45	0,2	2430	270	18,0	270	90	6,0
SC04-008	5	45	0,2	45	270	0,3	10	90	0,2
SC04-010	45	45	2,0	405	270	3,0	270	90	6,0
SC04-018	15	45	0,7	15	270	0,1	30	90	0,7
SC04-021	10	90	0,2	30	270	0,2	10	90	0,2
SC04-026	<5	45	0,0	<5	45	0,0	<5	30	0,0
SC04-031	10	90	0,2	30	270	0,2	30	90	0,7
SC04-038	30	90	0,7	90	270	0,7	90	90	2,0
SC04-040	5	90	0,1	15	135	0,2	10	90	0,2
SC04-060	<5	90	0,0	10	135	0,1	5	90	0,1
SC04-073	30	90	0,7	90	270	0,7	90	90	2,0
SC04-097	<5	90	0,0	<5	135	0,0	<5	90	0,0
SC04-098	90	90	2,0	810	270	6,0	270	90	6,0
SC04-103	<5	90	0,0	10	135	0,1	10	90	0,2
SC04-104	45	90	1,0	45	270	0,3	90	90	2,0
SC04-108	10	90	0,2	<5	135	0,0	15	90	0,3
SC04-120	15	90	0,3	45	270	0,3	30	90	0,7
SC04-125	90	90	2,0	270	270	2,0	270	90	6,0
SC04-126	<5	45	0,0	<5	45	0,0	<5	30	0,0
SC04-140	30	90	0,7	90	90	2,0	270	90	6,0
SC04-144	90	90	2,0	270	90	6,0	405	90	9,0
SC04-146	30	90	0,7	90	90	2,0	90	90	2,0
SC04-164	15	90	0,3	15	90	0,3	30	90	0,7

1\* es la dilución de criterio de valoración del 50%

2\* es la norma de la OMS de dilución de criterio de valoración del 50% (2 UI/ml)

3\* es la potencia (UI/ml)

10

Tabla 12: Oligonucleótidos usados para la amplificación mediante PCR de genes de V<sub>H</sub>.

Nombre y secuencia de nucleótidos	Gen de V <sub>H</sub>	SEQ ID NO:
5H-B:	SC04-001	280

acctgtctgaatttccatggccgaggtgcagctggtggagtctg		
5H-C: acctgtctgaatttccatggccgaggtgcagctggtggagtctg	SC04-021 SC04-031 SC04-125 SC04-164	281
5H-C-largo: acctgtctgaatttccatggccgaggtgcagctggtggagtctggg	SC04-010 SC04-038 SC04-040 SC04-073 SC04-098 SC04-103 SC04-104 SC04-108 SC04-120 SC04-140 SC04-144 SC04-146	282
5H-F: acctgtctgaatttccatggccgaggtgcagctgcaggagtccggccc	SC04-018 SC04-060	283
5H-H: acctgtctgaatttccatggccgaggtgcagctggtgcagctctg	SC04-026	284
5H-I: acctgtctgaatttccatggccgaggtgcagctgctggagtctg	SC04-004 SC04-097	285
5H-M: acctgtctgaatttccatggccgaggtgacctgaaggagtctg	SC04-008 SC04-126	286
sy3H-A: gccctggtgctagcgtggagacggtcaccagggcgccctggcccc	SC04-001 SC04-004 SC04-008 SC04-010 SC04-026 SC04-040 SC04-073 SC04-098 SC04-120 SC04-125 SC04-126 SC04-144 SC04-146	287
sy3H-C: gccctggtgctagcgtggagacggtcacgggtgcccctggcccc	SC04-097	288
sy3H-C-largo: gccctggtgctagcgtggagacggtcacgggtgcccctggccccag acgtc	SC04-060	289
sy3H-D: gccctggtgctagcgtggagacggtcaccatgggtgcccctggcccc	SC04-018 SC04-021 SC04-031 SC04-038 SC04-104 SC04-108 SC04-140 SC04-164	290
sy3H-E: gccctggtgctagcgtggagacggtcaccagggcgccccggcccc	SC04-103	291

Tabla 13: Oligonucleótidos usados para la amplificación mediante PCR de genes de V<sub>L</sub>.

Nombre y secuencia de nucleótidos	Gen de V <sub>L</sub>	SEQ ID NO:
3L-B: tttcttagcggccgactcacctaggacggtcagcttggtc	SC04-001	292

ES 2 426 725 T3

5K-B: acctgtctcgagttttccatggctgacatccagatgaccagtc	SC04-031 SC04-060 SC04-073 SC04-098 SC04-103 SC04-104 SC04-108 SC04-164	293
5K-C: acctgtctcgagttttccatggctgacatccagatgaccagtcctccatcct ccc	SC04-004	294
5K-G: acctgtctcgagttttccatggctgacatcgatgaccagtcctcc	SC04-026	295
5K-K: acctgtctcgagttttccatggctgacatccagatgaccagtcctcc	SC04-010	296
5K-M: acctgtctcgagttttccatggctgacatccagctgaccagtc	SC04-021 SC04-097 SC04-120 SC04-125 SC04-144	297
5K-N: acctgtctcgagttttccatggctgacatccagatgactcagtc	SC04-038	298
5K-O: acctgtctcgagttttccatggctgacatccagctgaccagtc	SC04-140	299
5K-Q: acctgtctcgagttttccatggctgagatcgatgactcagtc	SC04-146	300
5L-E: acctgtctcgagttttccatggcttctcactgctgactcagccg	SC04-008	301
5L-F: acctgtctcgagttttccatggctcagtcctgctgactcagcc	SC04-018	302
5L-G: acctgtctcgagttttccatggcttctcactgctgactcagcc	SC04-040	303
	SC04-126	
sy3K-F: gctgggggcgggccacggctccgctgatctccacctgggtccc	SC04-004 SC04-010 SC04-021 SC04-031 SC04-098 SC04-104 SC04-125 SC04-140 SC04-144 SC04-164	304
sy3K-I: gctgggggcgggccacggctccgctgatctccagccgtgtccc	SC04-038 SC04-097 SC04-103 SC04-108 SC04-146	305
sy3K-J: gctgggggcgggccacggctccgctgatctccagctgggtccc	SC04-026 SC04-060 SC04-073	306
sy3K-K: gctgggggcgggccacggctccgctgatctccacctgggtccc	SC04-120	307
sy3L-A: ccagcacggtaagcttcagcacggctaccttgggtccagttcc	SC04-018 SC04-126	308
sy3L-C: ccagcacggtaagcttcagcacggctcagcttgggtccctccgcc	SC04-040	309
sy3L-D: ccagcacggtaagcttcaacacggctcagctgggtccc	SC04-008	310
sy5L-A: acctgtctcgagttttccatggcttctccagctgaccaggaccctgct g	SC04-001	311

ES 2 426 725 T3

Tabla 14: Unión de los anticuerpos monoclonales humanos CR57, CRJB y CR04-010 (10 µg/ml) a péptidos lineales del dominio extracelular de glicoproteína G de la cepa ERA del virus de la rabia.

Secuencia de aminoácidos de péptido lineal	CR57	CRJB	CR04-010
KFPIYTILDKLGPWS	71	97	1
FPIYTILDKLGPWSP	42	105	39
PIYTILDKLGPWSP	36	89	87
IYTILDKLGPWSPID	44	97	104
YTILDKLGPWSPIDI	48	114	91
TILDKLGPWSPIDIH	76	96	88
ILDKLGPWSPIDIHH	54	104	69
LDKLGPWSPIDIHHL	55	99	107
DKLGPWSPIDIHHL	62	103	93
KLGPWSPIDIHHLSC	72	105	45
LGPWSPIDIHHLSCP	69	112	19
GPWSPIDIHHLSCP	68	114	33
PWSPIDIHHLSCPNN	62	104	47
WSPIDIHHLSCPNNL	80	106	11
SPIDIHHLSCPNNLV	74	85	1
PIDIHHLSCPNNLVV	46	93	90
IDIHHLSCPNNLVVE	69	102	55
DIHHLSCPNNLVVED	38	96	78
IHHLSCPNNLVVEDE	37	85	113
HHLSCPNNLVVEDEG	56	76	117
HLSCPNNLVVEDEGC	65	119	111
LSCPNNLVVEDEGCT	69	117	127
SCPNNLVVEDEGCTN	83	114	91
CPNNLVVEDEGCTNL	77	97	49
PNNLVVEDEGCTNLS	78	107	97
NNLVVEDEGCTNL	72	99	97
NLVVEDEGCTNL	75	119	55
LVVEDEGCTNL	76	103	52
VVEDEGCTNL	73	107	91
VEDEGCTNL	74	103	31
EDEGCTNL	54	90	7
DEGCTNL	1	23	1
EGCTNL	51	114	129
GCTNL	55	114	118
CTNL	47	110	137
TNL	43	106	161
NLS	61	115	170
LS	71	132	169
SG	79	132	161
GF	65	111	141
FS	89	112	192
SYM	65	123	152
Y	78	114	150
M	76	141	107
EL	87	132	76
LK	78	112	118
KV	78	118	68
VG	77	93	1
GY	75	90	1
YI	47	107	107
IL	79	103	104
LA	68	130	159
AI	47	103	152
IK	68	108	138
KM	76	104	133
MN	69	99	148
NG	69	101	138
GF	71	86	129
FT	83	125	154

ES 2 426 725 T3

TCTGVVTEAENYTNF	92	112	129
CTGVVTEAENYTNFV	76	123	150
TGVVTEAENYTNFVG	85	110	154
GVVTEAENYTNFVG Y	86	111	110
VVTEAENYTNFVG YV	87	106	114
VTEAENYTNFVG YVT	79	90	73
TEAENYTNFVG YVTT	68	84	8
EAENYTNFVG YVTTT	69	117	142
AENYTNFVG YVTTTF	66	106	110
ENYTNFVG YVTTTFK	44	112	183
NYTNFVG YVTTTFKR	49	114	174
YTNFVG YVTTTFKRK	51	104	138
TNFVG YVTTTFKRKH	71	125	165
NFVG YVTTTFKRKHF	65	107	154
FVG YVTTTFKRKHFR	70	111	152
VG YVTTTFKRKHFRP	75	113	155
GYVTTTFKRKHFRPT	70	123	160
YVTTTFKRKHFRPTP	85	106	160
VTTTFKRKHFRPTPD	79	105	119
TTTFKRKHFRPTPDA	80	108	137
TTFKRKHFRPTPDAC	74	99	110
TFKRKHFRPTPDACR	96	111	108
FKRKHFRPTPDACRA	64	92	62
KRKHFRTPDACRAA	65	93	1
RKHFRTPDACRAAY	64	107	99
KHFRTPDACRAAYN	73	112	124
HFRTPDACRAAYNW	46	113	118
FRTPDACRAAYNWK	43	112	148
RTPDACRAAYNWKMA	77	101	129
PTPDACRAAYNWKMA	99	125	143
TPDACRAAYNWKMAG	92	132	160
PDACRAAYNWKMAGD	61	124	147
DACRAAYNWKMAGDP	84	113	136
ACRAAYNWKMAGDPR	82	116	138
CRAAYNWKMAGDPRY	87	118	137
RAAYNWKMAGDPRYE	90	130	120
AAYNWKMAGDPRYEE	68	106	120
AYNWKMAGDPRYEES	96	94	77
YNWKMAGDPRYEESL	83	118	116
NWKMAGDPRYEESLH	58	101	69
WKMAGDPRYEESLHN	69	101	1
KMAGDPRYEESLHNP	62	102	84
MAGDPRYEESLHNPY	64	116	112
AGDPRYEESLHNPYP	40	101	125
GDPYEESLHNPYPD	36	98	123
DPRYEESLHNPYPDY	57	110	118
PRYEESLHNPYPDYR	73	115	129
RYEESLHNPYPDYRW	69	112	125
YEESLHNPYPDYRWL	58	106	120
EESLHNPYPDYRWLR	76	123	141
ESLHNPYPDYRWLRT	92	132	125
SLHNPYPDYRWLRTV	78	111	137
LHNPYPDYRWLRTVK	79	106	142
HNPYPDYRWLRTVKT	86	108	146
NPYPDYRWLRTVKT	85	102	151
PYPDYRWLRTVKT	65	93	103
YPDYRWLRTVKT	72	97	97
PDYRWLRTVKT	76	85	27
DYRWLRTVKT	54	111	105
YRWLRTVKT	46	117	125
RWLRTVKT	40	110	120
WLRTVKT	41	104	125
LRTVKT	65	104	161

ES 2 426 725 T3

RTVKTTKESLVIISP	82	120	150
TVKTTKESLVIISPS	76	116	150
VKTTKESLVIISPSV	71	120	154
KTTKESLVIISPSVA	101	112	147
TTKESLVIISPSVAD	78	121	141
TKESLVIISPSVADL	86	112	132
KESLVIISPSVADLD	86	117	111
ESLVIISPSVADLDP	88	125	143
SLVIISPSVADLDPY	68	105	125
LVIIISPSVADLDPYD	85	107	93
VIIISPSVADLDPYDR	59	98	50
IISPSVADLDPYDRS	83	125	14
ISPSVADLDPYDRSL	50	119	91
SPSVADLDPYDRSLH	59	114	118
PSVADLDPYDRSLHS	44	114	118
SVADLDPYDRSLHSR	49	106	129
VADLDPYDRSLHSRV	71	113	141
ADLDPYDRSLHSRVF	70	121	141
DLDPYDRSLHSRVFP	111	152	127
LDPYDRSLHSRVFPS	99	142	106
DPYDRSLHSRVFPSG	90	120	134
PYDRSLHSRVFPSGK	86	120	130
YDRSLHSRVFPSGKC	364	818	127
DRSLHSRVFPSGKCS	98	142	141
RSLHSRVFPSGKCSG	87	141	156
SLHSRVFPSGKCSGV	69	111	141
LHSRVFPSGKCSGVA	78	114	129
HSRVFPSGKCSGVAV	97	118	111
SRVFPSGKCSGVAVS	100	125	24
RVFPSGKCSGVAVSS	69	110	106
VFPSGKCSGVAVSST	74	114	142
FPSGKCSGVAVSSTY	64	134	146
PSGKCSGVAVSSTYC	56	112	132
SGKCSGVAVSSTYCS	64	121	120
GKCSGVAVSSTYCST	92	143	145
KCSGVAVSSTYCSTN	88	130	130
CSGVAVSSTYCSTNH	110	165	143
SGVAVSSTYCSTNHD	79	110	115
GVAVSSTYCSTNHDT	79	114	108
VAVSSTYCSTNHDTI	85	114	118
AVSSTYCSTNHDTI	71	105	102
VSSTYCSTNHDTIWI	78	107	121
SSTYCSTNHDTIWIWM	76	107	121
STYCSTNHDTIWIWMP	86	99	119
TYCSTNHDTIWIWMP	96	107	74
YCSTNHDTIWIWMPEN	47	92	29
CSTNHDTIWIWMPENP	52	106	86
STNHDTIWIWMPENPR	60	112	107
TNHDTIWIWMPENPRL	69	129	119
NHDTIWIWMPENPRLG	71	119	130
HDYTIWIWMPENPRLGM	82	125	123
DYTIWIWMPENPRLGMS	93	127	123
YTIWIWMPENPRLGMSC	97	132	143
TIWIWMPENPRLGMSCD	69	106	134
IWIWIWMPENPRLGMSCDI	98	110	101
WMPENPRLGMSCDIF	88	113	120
MPENPRLGMSCDIFT	105	121	143
PENPRLGMSCDIFTN	83	111	104
ENPRLGMSCDIFTNS	71	118	111
NPRLGMSCDIFTNSR	90	113	138
PRLGMSCDIFTNSRG	72	112	105
RLGMSCDIFTNSRGK	88	106	113
LGMSCDIFTNSRGKR	76	110	114

ES 2 426 725 T3

GMSCDIFTNSRGKRA	54	120	101
MSCDIFTNSRGKRAS	46	110	106
SCDIFTNSRGKRASK	44	111	98
CDIFTNSRGKRASKG	42	104	117
DIFTNSRGKRASKGS	70	107	111
IFTNSRGKRASKGSE	77	125	87
FTNSRGKRASKGSET	83	111	119
TNSRGKRASKGSETC	68	108	110
NSRGKRASKGSETCG	92	100	119
SRGKRASKGSETCGF	64	93	90
RGKRASKGSETCGFV	75	104	115
GKRASKGSETCGFVD	92	124	118
KRASKGSETCGFVDE	92	106	129
RASKGSETCGFVDER	86	110	134
ASKGSETCGFVDERG	97	108	103
SKGSETCGFVDERGL	92	102	76
KGSETCGFVDERGLY	90	97	44
GSETCGFVDERGLYK	57	115	92
SETCGFVDERGLYKS	33	116	86
ETCGFVDERGLYKSL	64	120	138
TCGFVDERGLYKSLK	47	120	125
CGFVDERGLYKSLKG	72	115	120
GFVDERGLYKSLKGA	84	120	129
FVDERGLYKSLKGAC	86	121	124
VDERGLYKSLKGACK	50	108	110
DERGLYKSLKGACKL	90	119	54
ERGLYKSLKGACKLK	90	118	106
RGLYKSLKGACKLKL	90	121	121
GLYKSLKGACKLKLK	94	129	92
LYKSLKGACKLKLKCG	93	136	141
YKSLKGACKLKLKCGV	80	112	110
KSLKGACKLKLKCGVL	129	113	110
SLKGACKLKLKCGVLG	200	111	124
LKGACKLKLKCGVLGL	340	90	23
KGACKLKLKCGVLGLR	181	111	100
GACKLKLKCGVLGLRL	123	134	129
ACKLKLKCGVLGLRLM	148	117	142
CKLKLKCGVLGLRLMD	410	111	147
KLKLCGVLGLRLMDG	273	120	114
LKLCGVLGLRLMDGT	918	145	148
KLCGVLGLRLMDGTW	3152	132	86
LCGVLGLRLMDGTWV	83	138	129
CGVLGLRLMDGTWVA	99	117	104
GVLGLRLMDGTWVAM	89	148	117
VLGLRLMDGTWVAMQ	90	141	127
LGLRLMDGTWVAMQT	102	115	97
GLRLMDGTWVAMQTS	104	138	120
LRLMDGTWVAMQTSN	103	114	118
RLMDGTWVAMQTSNE	100	113	130
LMDGTWVAMQTSNET	96	106	106
MDGTWVAMQTSNETK	97	97	110
DGTWVAMQTSNETKW	69	114	92
GTWVAMQTSNETKWC	58	113	82
TWVAMQTSNETKWCP	78	118	107
WVAMQTSNETKWCPP	50	114	116
VAMQTSNETKWCPPD	86	104	151
AMQTSNETKWCPPDQ	104	114	128
MQTSNETKWCPPDQL	104	132	125
QTSNETKWCPPDQLV	92	120	155
TSNETKWCPPDQLVN	97	111	90
SNETKWCPPDQLVNL	99	129	110
NETKWCPPDQLVNLH	90	128	107
ETKWCPPDQLVNLHD	105	120	118

ES 2 426 725 T3

TKWCPPDQLVNLHDF	85	125	125
KWCPPDQLVNLHDFR	89	113	121
WCPPDQLVNLHDFRS	101	119	99
CPPDQLVNLHDFRSD	93	137	127
PPDQLVNLHDFRSDE	107	120	56
PDQLVNLHDFRSDEI	35	106	63
DQLVNLHDFRSDEIE	54	117	97
QLVNLHDFRSDEIEH	60	113	106
LVNLHDFRSDEIEHL	47	104	100
VNLHDFRSDEIEHLV	83	129	98
NLHDFRSDEIEHLVV	83	113	110
LHDFRSDEIEHLVVE	93	115	121
HDFRSDEIEHLVVEE	69	107	150
DFRSDEIEHLVVEEL	99	103	110
FRSDEIEHLVVEELV	86	114	116
RSDEIEHLVVEELVR	100	138	104
SDEIEHLVVEELVRK	101	117	118
DEIEHLVVEELVRKR	94	123	143
EIEHLVVEELVRKRE	82	113	121
IEHLVVEELVRKREE	90	129	118
EHLVVEELVRKREEC	82	114	106
HLVVEELVRKREECL	82	123	46
LVVEELVRKREECLD	64	100	79
VVEELVRKREECLDA	62	108	97
VEELVRKREECLDAL	58	111	101
EELVRKREECLDALE	69	112	123
ELVRKREECLDALES	82	113	117
LVRKREECLDALESIM	86	130	124
VRKREECLDALESIM	58	181	151
RKREECLDALESIMT	73	110	137
KREECLDALESIMTT	102	113	97
REECLDALESIMTTK	94	110	106
EECLDALESIMTTKS	82	120	133
ECLDALESIMTTKSV	91	112	125
CLDALESIMTTKSVS	101	146	155
LDALESIMTTKSVSF	97	116	152
DALESIMTTKSVSFR	104	120	188
ALESIMTTKSVSFRR	97	132	137
LESIMTTKSVSFRRS	48	114	130
ESIMTTKSVSFRRLS	62	111	114
SIMTTKSVSFRRLSH	54	130	97
IMTTKSVSFRRLSHL	43	101	111
MTTKSVSFRRLSHLR	59	116	125
TTKSVSFRRLSHLRK	66	118	111
TKSVSFRRLSHLRKL	83	125	123
KSVSFRRLSHLRKL	108	124	129
SVSFRRLSHLRKLVP	64	123	117
VSFRRLSHLRKLVP	90	111	105
SFRRLSHLRKLVP	92	110	96
FRRLSHLRKLVP	90	108	111
RRLSHLRKLVP	92	143	118
RLSHLRKLVP	93	123	148
LSHLRKLVP	96	139	150
SHLRKLVP	113	132	132
HLRKLVP	99	111	102
LRKLVP	83	118	82
RKLVP	47	115	86
KLVP	47	114	123
LVP	54	112	139
VP	58	114	138
PG	78	113	157
G	78	123	320
FG	90	151	356

ES 2 426 725 T3

GKAYTIFNKTLMEAD	76	127	418
KAYT1FNKTLMEADA	101	123	554
AYTIFNKTLMEADAH	86	121	197
YTIFNKTLMEADAHY	104	147	161
TIFNKTLMEADAHYK	107	123	1405
IFNKTLMEADAHYKS	100	118	1828
FNKTLMEADAHYKSV	111	141	2736
NKTLMEADAHYKSVR	104	116	141
KTLMEADAHYKSVRTW	91	98	123
TLMEADAHYKSVRTWN	100	114	90
LMEADAHYKSVRTWNE	73	107	97
MEADAHYKSVRTWNEI	62	129	83
EADAHYKSVRTWNEIL	58	97	106
ADAHYKSVRTWNEILP	56	100	100
DAHYSVRTWNEILPS	59	121	112
AHYKSVRTWNEILPSK	112	160	125
HYKSVRTWNEILPSKG	80	130	123
YKSVRTWNEILPSKGC	66	137	116
KSVRTWNEILPSKGC	115	125	114
SVRTWNEILPSKGC	106	138	118
VRTWNEILPSKGC	90	124	133
RTWNEILPSKGC	120	127	120
TWNEILPSKGC	97	146	127
WNEILPSKGC	102	136	117
NEILPSKGC	104	130	163
EILPSKGC	104	112	128
ILPSKGC	79	113	107
LPSKGC	77	119	100
PSKGC	69	138	91
SKGC	72	121	103
KGCLRVGGRCHPHVN	68	130	115
GCLRVGGRCHPHVNG	85	125	123
CLRVGGRCHPHVNGV	102	132	134
LRVGGRCHPHVNGVF	104	143	133
RVGGRCHPHVNGVFF	86	143	99
VGGRCHPHVNGVFFN	120	136	120
GGRCHPHVNGVFFNG	86	119	119
GRCHPHVNGVFFNGI	117	113	117
RCHPHVNGVFFNGII	98	141	143
CHPHVNGVFFNGIIL	97	150	151
HPHVNGVFFNGIILG	104	138	164
PHVNGVFFNGIILGP	93	173	146
HVNGVFFNGIILGPD	97	123	114
VNGVFFNGIILGPDG	68	116	85
NGVFFNGIILGPDGN	66	117	97
GFFNGIILGPDGNV	58	116	100
VFFNGIILGPDGNVL	55	132	108
FFNGIILGPDGNVLI	92	143	105
FNGIILGPDGNVLIP	61	139	130
NGIILGPDGNVLIP	102	146	141
GIIILGPDGNVLIP	107	132	123
IILGPDGNVLIP	85	118	93
ILGPDGNVLIP	125	134	119
LGPDGNVLIP	100	134	150
GPDGNVLIP	86	154	157
PDGNVLIP	87	129	139
DGNVLIP	123	134	169
GNVLIP	96	120	168
NVLIP	72	120	150
VLIP	92	104	142
LIP	89	111	85
IP	89	128	129
PEM	62	133	93

ES 2 426 725 T3

EMQSSLLQQHMELLE	58	129	142
MQSSLLQQHMELLES	65	113	117
QSSLLQQHMELLESS	82	114	132
SSLLQQHMELLESSV	90	128	132
SLLQQHMELLESSVI	124	163	133
LLQQHMELLESSVIP	78	111	121
LQQHMELLESSVIPL	106	134	128
QQHMELLESSVIPLV	103	134	133
QHMELLESSVIPLVH	98	146	139
HMELLESSVIPLVHP	110	129	134
MELLESSVIPLVHPL	90	125	152
ELLESSVIPLVHPLA	90	133	155
LLESSVIPLVHPLAD	72	117	118
LESSVIPLVHPLADP	90	128	128
ESSVIPLVHPLADPS	104	138	143
SSVIPLVHPLADPST	73	104	93
SVIPLVHPLADPSTV	72	137	107
VIPLVHPLADPSTVVF	69	141	123
IPLVHPLADPSTVFK	96	156	188
PLVHPLADPSTVFKD	93	112	138
LVHPLADPSTVFKDGD	164	174	188
VHPLADPSTVFKDGD	98	138	125
HPLADPSTVFKDGDDE	74	141	117
PLADPSTVFKDGDDEA	99	125	90
LADPSTVFKDGDDEAE	68	116	113
ADPSTVFKDGDDEAED	147	152	110
DPSTVFKDGDDEAEDF	98	147	137
PSTVFKDGDDEAEDFV	104	143	141
STVFKDGDDEAEDFVE	104	120	125
TVFKDGDDEAEDFVEV	107	124	96
VFKDGDDEAEDFVEVH	100	106	93
FKDGDDEAEDFVEVHL	65	76	119
KDGDDEAEDFVEVHLP	72	93	76
DGDDEAEDFVEVHLPD	85	123	91
GDEAEDFVEVHLPDV	46	124	113
DEAEDFVEVHLPDVH	68	136	123
EAEDFVEVHLPDVHN	76	117	114
AEDFVEVHLPDVHNQ	123	138	123
EDFVEVHLPDVHNQV	90	141	123
DFVEVHLPDVHNQVVS	96	141	118
FVEVHLPDVHNQVSG	92	143	102
VEVHLPDVHNQVSGV	106	141	123
EVHLPDVHNQVSGVD	91	150	139
VHLPDVHNQVSGVDL	110	114	137
HLPDVHNQVSGVDLGL	104	150	129
LPDVHNQVSGVDLGLL	104	154	154
PDVHNQVSGVDLGLP	106	129	115
DVHNQVSGVDLGLPN	117	133	113
VHNQVSGVDLGLPNW	100	119	38
HNQVSGVDLGLPNWG	76	106	38
NQVSGVDLGLPNWGK	78	138	98
Promedio	91,9	119,5	130,9
D.E.	157,9	37,6	169,8

Tabla 15: Potencias neutralizantes de IgG anti-proteína G de virus de la rabia.

Nombre de IgG	UI/mg
CR04-001	89
CR04-004	5
CR04-008	1176
CR04-010	3000
CR04-018	1604

CR04-021	1500
CR04-026	<2
CR04-031	272
CR04-038	2330
CR04-040	3041
CR04-060	89
CR04-073	6116
CR04-097	<1
CR04-098	7317
CR04-103	3303
CR04-104	4871
CR04-108	4871
CR04-120	4938
CR04-125	4718
CR04-126	2655
CR04-140	478
CR04-144	6250
CR04-146	ND
CR04-164	4724
CR57	3800
CRJB	605

ND = no determinado

Tabla 16: Potencias neutralizantes de IgG anti-proteína G de virus de la rabia frente a virus de escape E57.

Nombre de IgG	E57A2 (UI/mg)	E57A3 (UI/mg)	E57B1 (UI/mg)	E57B2 (UI/mg)	E57B3 (UI/mg)	E57C3 (UI/mg)
CR04-008	0*	0	0	0	0	0
CR04-010	8127	1355	5418	1355	2709	4064
CR04-018	1604	0	1604	0	59	535
CR04-021	450	2	150	8	50	50
CR04-038	9437	1573	9437	1049	6291	1573
CR04-040	8209	2736	24628	1368	5473	912
CR04-073	8256	1835	11008	1835	3669	1835
CR04-098	9878	3293	9878	3293	3293	3293
CR04-103	8917	2972	17835	2972	5945	2972
CR04-104	3288	2192	6576	2192	4384	1096
CR04-108	3288	731	4384	731	2192	731
CR04-120	1111	14	741	82	247	41
CR04-125	708	39	236	79	157	79
CR04-126	88	0	18	0	18	0
CR04-144	5625	2813	11250	2813	5625	1875
CR04-164	4252	472	4252	472	945	709

\* 0 indica ausencia de criterio de valoración del 50% a una dilución de 1:100 del anticuerpo

5

Tabla 17. Potencia neutralizante de CR-57 frente a virus de escape E98.

	E98-2 (UI/mg)	E98-4 (UI/mg)	E98-5 (UI/mg)	E98-6 (UI/mg)	E98-7 (UI/mg)
CR-57	2813	8438	4219	2813	8438
CR04-098	0*	0	0	0	0

\* Cero indica ausencia de criterio de valoración del 50% a una dilución de 1:1000 del anticuerpo.

10

Tabla 18: Aparición de residuos de aminoácido en la región de unión mínima de CR57 dentro de virus de la rabia de genotipo 1.

Tipo natural	K	L	C	G	V	L
	K (99,6%)*	L (100%)	C (100%)	G (98,7%)	V (99,6%)	L (70,7%)
	R (0,4%)			E (0,9%)	I (0,4%)	P (26,7%)
				R (0,4%)		S (2,6%)

\* Se muestra el porcentaje de aparición de cada aminoácido se muestra dentro de 229 aislados de virus de la rabia.

#### BIBLIOGRAFÍA

- 5 Ameyama S, Toriumi H, Takahashi T, Shimura Y, Nakahara T, Honda Y, Mifune K, Uchiyama T and Kawai A (2003), Monoclonal antibody #3-9-16 recognizes one of the two isoforms of rabies virus matrix protein that exposes its Nterminus on the virion surface. *Microbiol. Immunol.* 47:639-651.
- Badrane H and Tordo N (2001), Host switching in *Lyssavirus* history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *J. Virol.* 75:8096-8104.
- 10 Benmansour A, Leblois H, Coulon P, Tuffereau C, Gaudin Y, Flamand A, and Lafay F (1991), Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* 65:4198-4203.
- Boel E, Verlaan S, Poppelier MJ, Westerdal NA, Van Strijp JA and Logtenberg T (2000), Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments. *J. Immunol. Methods* 239:153-166.
- 15 Bunschoten H, Gore M, Claassen IJ, Uytdehaag FG, Dietzschold B, Wunner WH, and Osterhaus AD (1989), Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 70 (Pt 2):291-8.
- Burton DR and Barbas CF (1994), Human antibodies from combinatorial libraries. *Adv. Immunol.* 57:191-280.
- 20 Champion JM, Kean RB, Rupprecht CE, Notkins AL, Koprowski H, Dietzschold B, and Hooper DC (2000), The development of monoclonal human rabies virus-neutralizing antibodies as a substitute for pooled human immune globulin in the prophylactic treatment of rabies virus exposure. *J. Immunol. Methods* 235:81-90.
- Chou TC and Talalay P (1984), Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22:27-55.
- Coulon P, Ternaux JP, Flamand A, and Tuffereau C (1998), An avirulent mutant of rabies virus is unable to infect motoneurons in vivo and in vitro. *J. Virol.* 72:273-278.
- 25 De Kruif J, Terstappen L, Boel E and Logtenberg T (1995a), Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3938.
- De Kruif J, Boel E and Logtenberg T (1995b), Selection and application of human single-chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions. *J. Mol. Biol.* 248:97-105.
- 30 Dietzschold B, Wunner WH, Wiktor TJ, Lopes AD, Lafon M, Smith CL, and Koprowski H (1983), Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:70-74. Dietzschold B, Gore M, Casali P, Ueki Y, Rupprecht CE, Notkins AL, and Koprowski H (1990), Biological characterization of human monoclonal antibodies to rabies virus. *J. Virol.* 64:3087-3090.
- 35 Hanlon CA, DeMattos CA, DeMattos CC, Niezgodka M, Hooper DC, Koprowski H, Notkins A, and Rupprecht CE (2001), Experimental utility of rabies virus neutralizing human monoclonal antibodies in post-exposure prophylaxis. *Vaccine* 19:3834-3842.
- Huls G, Heijnen IJ, Cuomo E, van der Linden J, Boel E, van de Winkel J and Logtenberg T (1999), Antitumor immune effector mechanisms recruited by phage display-derived fully human IgG1 and IgA1 monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 59:5778-5784.
- 40 Jones D, Kroos N, Anema R, van Montfort B, Vooy's A, van der Kraats S, van der Helm E, Smits S, Schouten J, Brouwer K, Lagerwerf F, van Berkel P, Opstelten DJ, Logtenberg T and Bout A (2003), High-level expression of recombinant IgG in the human cell line PER.C6. *Biotechnol. Prog.* 19:163-168.
- Lafon M, Wiktor TJ, and Macfarlan RI (1983), Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 64 (Pt 4):843-851.
- 45 Luo TR, Minamoto N, Ito H, Goto H, Hiraga S, Ito N, Sugiyama M, and Kinjo T (1997), A virus-neutralizing epitope on the glycoprotein of rabies virus that contains Trp251 is a linear epitope. *Virus Res.* 51:35-41.
- Madhusudana SN, Shamsundar R and Seetharaman S (2004), In vitro inactivation of the rabies virus by ascorbic acid. *Int. J. Infect. Dis.* 8:21-25.
- Ni Y, Tominaga Y, Honda Y, Morimoto K, Sakamoto S, and Kawai A (1995), Mapping and characterization of a sequential epitope on the rabies virus glycoprotein which is recognized by a neutralizing monoclonal antibody,

RG719. *Microbiol. Immunol.* 39:693-702.

Prehaud C, Coulon P, LaFay F, Thiers C, and Flamand A (1988), Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *J. Virol.* 62:1-7.

5 Schumacher CL, Dietzschold B, Ertl HC, Niu HS, Rupprecht CE, and Koprowski H (1989), Use of mouse anti-rabies monoclonal antibodies in postexposure treatment of rabies. *J. Clin. Invest.* 84:971-975.

Seif I, Coulon P, Rollin E, and Flamand A (1985) Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J. Virol.* 53:926-934.

Slootstra JW, Puijk WC, Ligtoet GJ, Langeveld JP, Meloen RH 1996. Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries. *Mol. Divers.* 1:87-96.

10 Tordo N (1996), Characteristics and molecular biology of rabies virus. In Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory Techniques in rabies*, 4th edition Geneva, Switzerland: World Health Organization.

White LA and Chappell WA (1982), Inactivation of rabies virus in reagents used for the fluorescent rabies antibody test. *J. Clin. Microbiol.* 16:253-256.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para identificar una molécula de unión que potencialmente tiene actividad neutralizante contra el virus de la rabia o una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de unión que potencialmente tiene actividad neutralizante contra el virus de la rabia, en donde el método comprende las etapas de:
  - a) poner en contacto una colección de moléculas de unión en la superficie de paquetes genéticos replicables con un virus de la rabia en condiciones que conducen a la unión, en donde la colección de moléculas de unión se prepara a partir de ARN aislado de células obtenidas de un sujeto humano que ha sido vacunado contra la rabia o que ha sido expuesto al virus de la rabia.
  - b) separar y recuperar moléculas de unión que se unen al virus de la rabia de moléculas de unión que no se unen,
  - c) aislar al menos una molécula de unión recuperada,
  - d) verificar si las moléculas de unión aisladas tienen actividad neutralizante contra el virus de la rabia,que comprende además la etapa de separar y recuperar moléculas de unión codificadas por un gen de la línea germinal pesada variable 3-30.
2. Método según la reivindicación 1, en donde el virus de la rabia es inactivado.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde la colección de moléculas de unión en la superficie de paquetes genéticos replicables es una librería de Fv de cadena única.
4. Método según la reivindicación 1, 2 o 3, en donde el sujeto es un individuo humano que ha sido vacunado contra la rabia.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado por que el paquete genético replicable se selecciona del grupo que consiste en una partícula de fago, una bacteria, una levadura, un hongo, una espora de un microorganismo y un ribosoma.

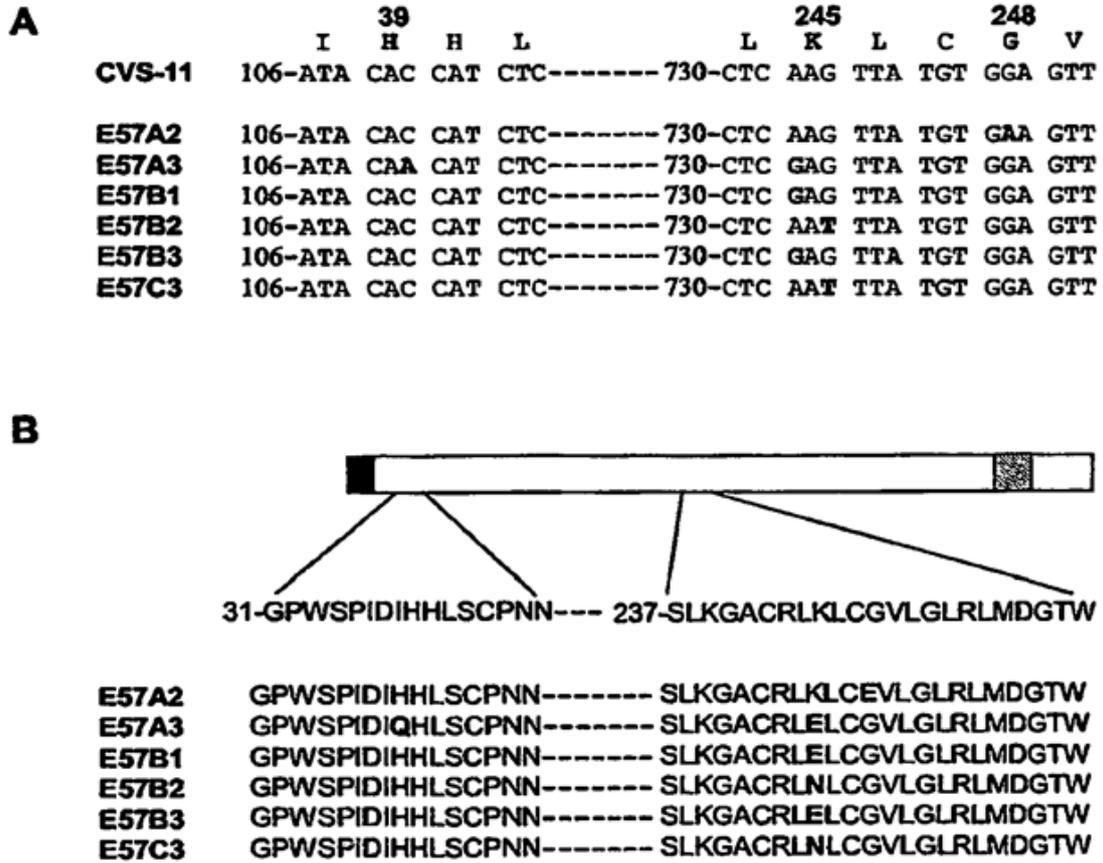


Figura 1

**A**

				<b>201</b>															
		P	E	N	P	R					C	<b>248</b>	V	<b>250</b>					
<b>CVS-11</b>	595-CCC	GAG	AAT	CCG	AGA						724-TGT	GGA	GTT	CTT	GGA				
<b>EJB2B</b>	595-CCC	GAG	GAT	CCG	AGA						724-TGT	GAA	GTT	CCT	GGA				
<b>EJB2C</b>	595-CCC	GAG	GAT	CCG	AGA						724-TGT	GAA	GTT	CCT	GGA				
<b>EJB2D</b>	595-CCC	GAG	GAT	CCG	AGA						724-TGT	GGA	GTT	CCT	GGA				
<b>EJB2E</b>	595-CCC	GAG	GAT	CCG	AGA						724-TGT	GGA	GTT	CCT	GGA				
<b>EJB2F</b>	595-CCC	GAG	GAT	CCG	AGA						724-TGT	GAA	GTT	CCT	GGA				
<b>EJB3F</b>	595-CCC	GAG	GAT	CCG	AGA						724-TGT	GGA	GTT	CCT	GGA				

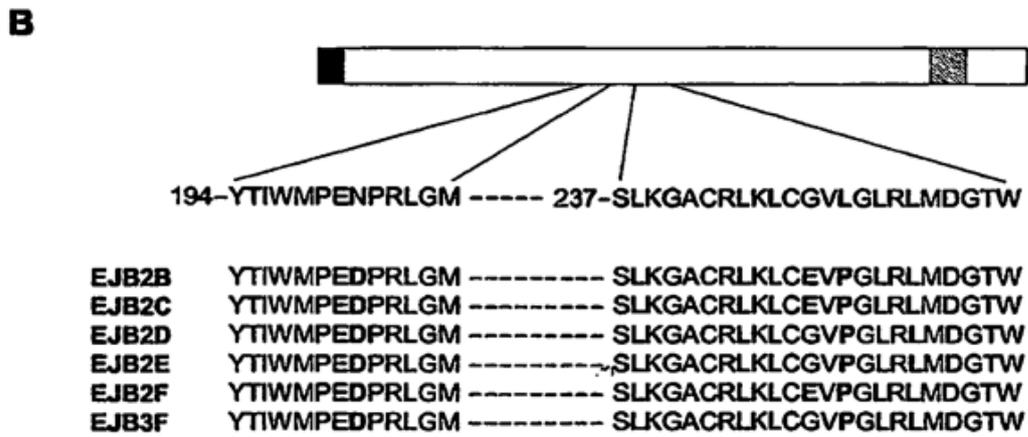


FIGURA 2

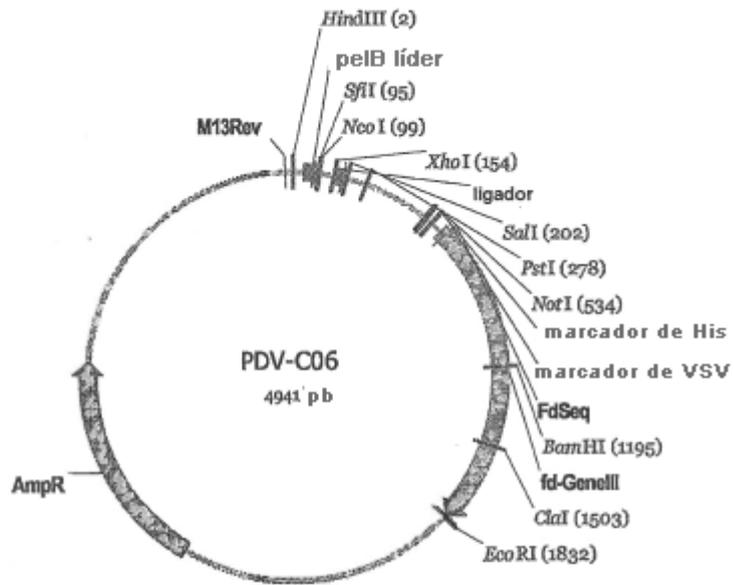


FIGURA 3

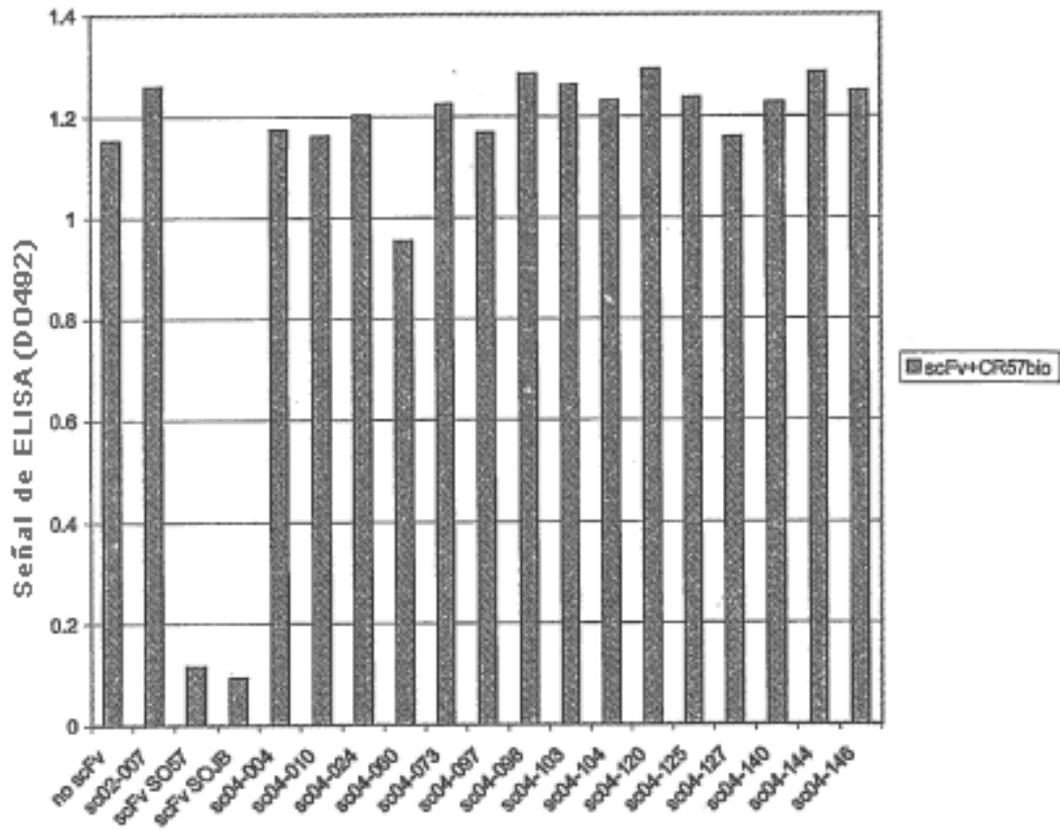


FIGURA 4

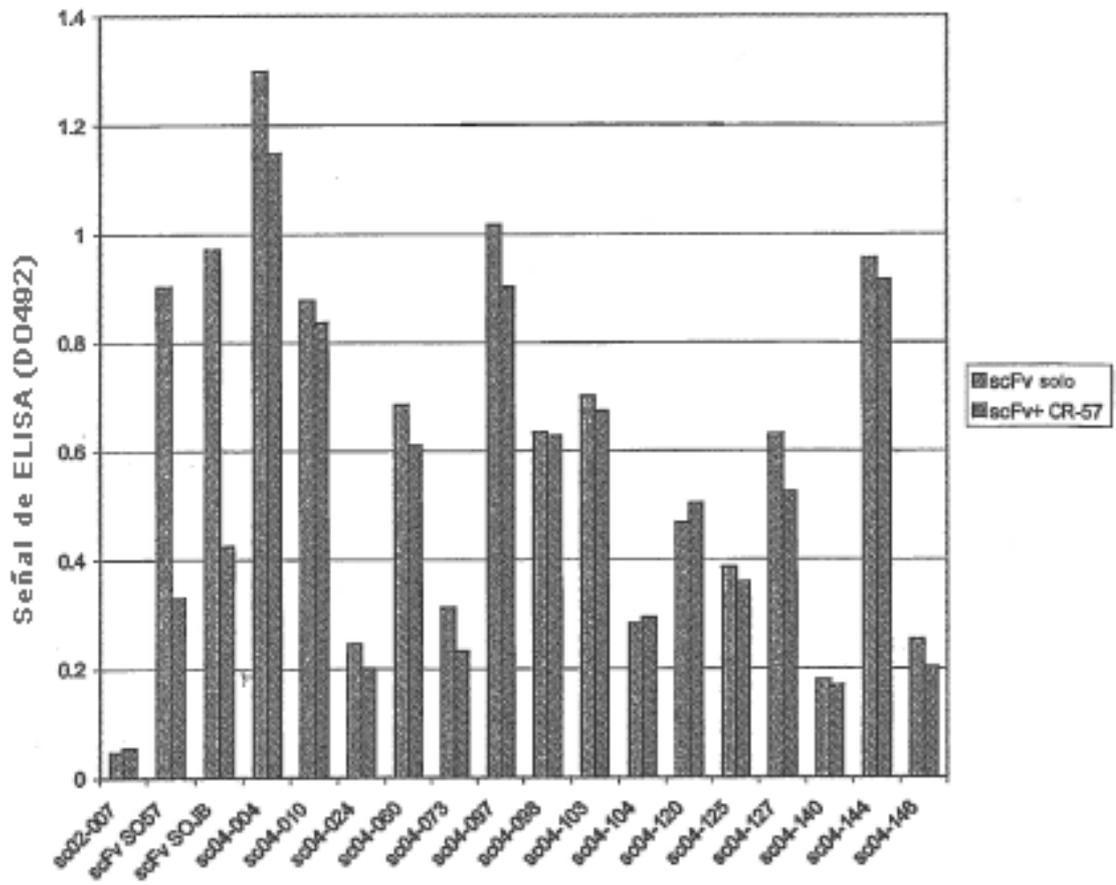


FIGURA 5

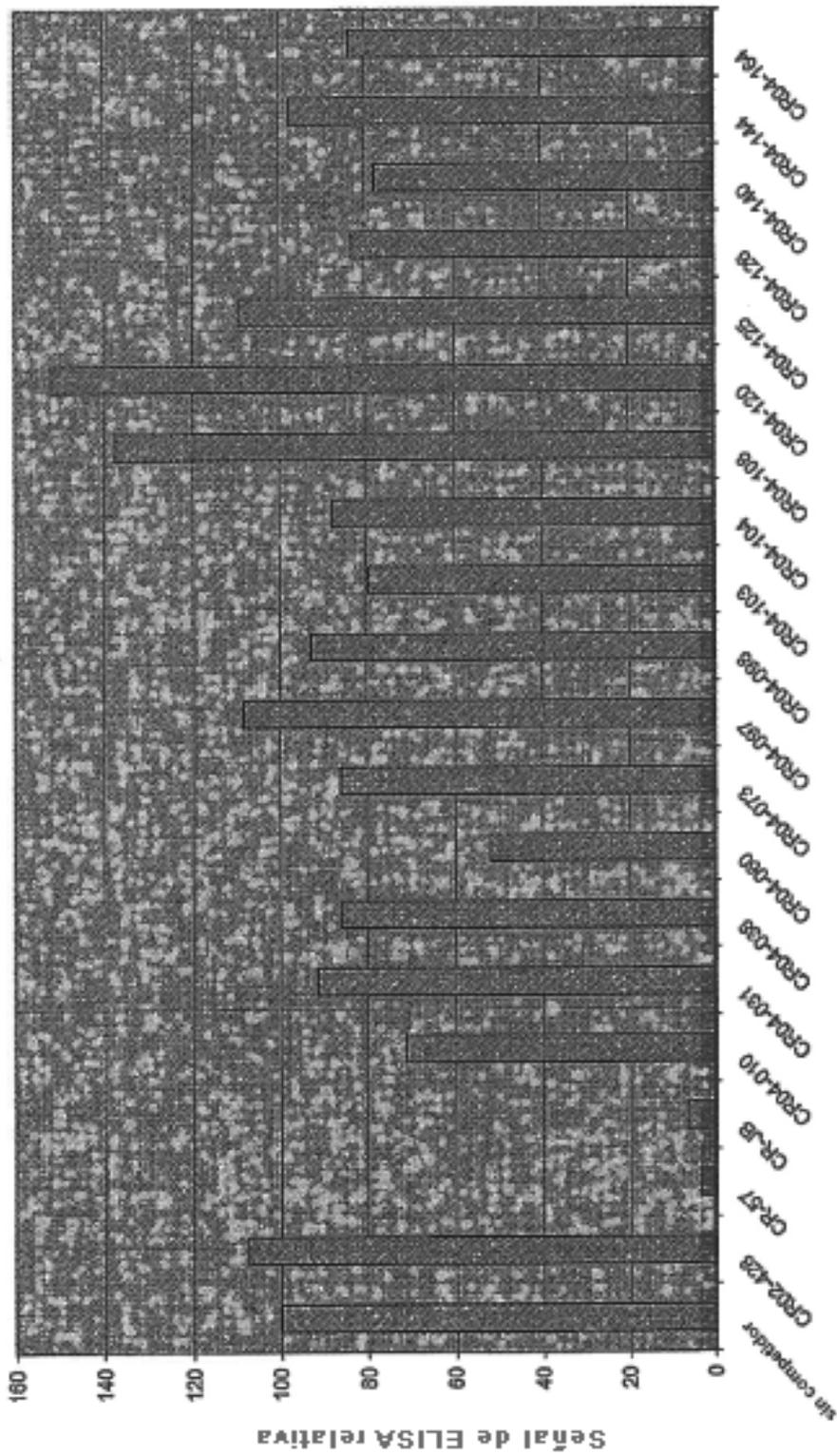


FIGURA 6

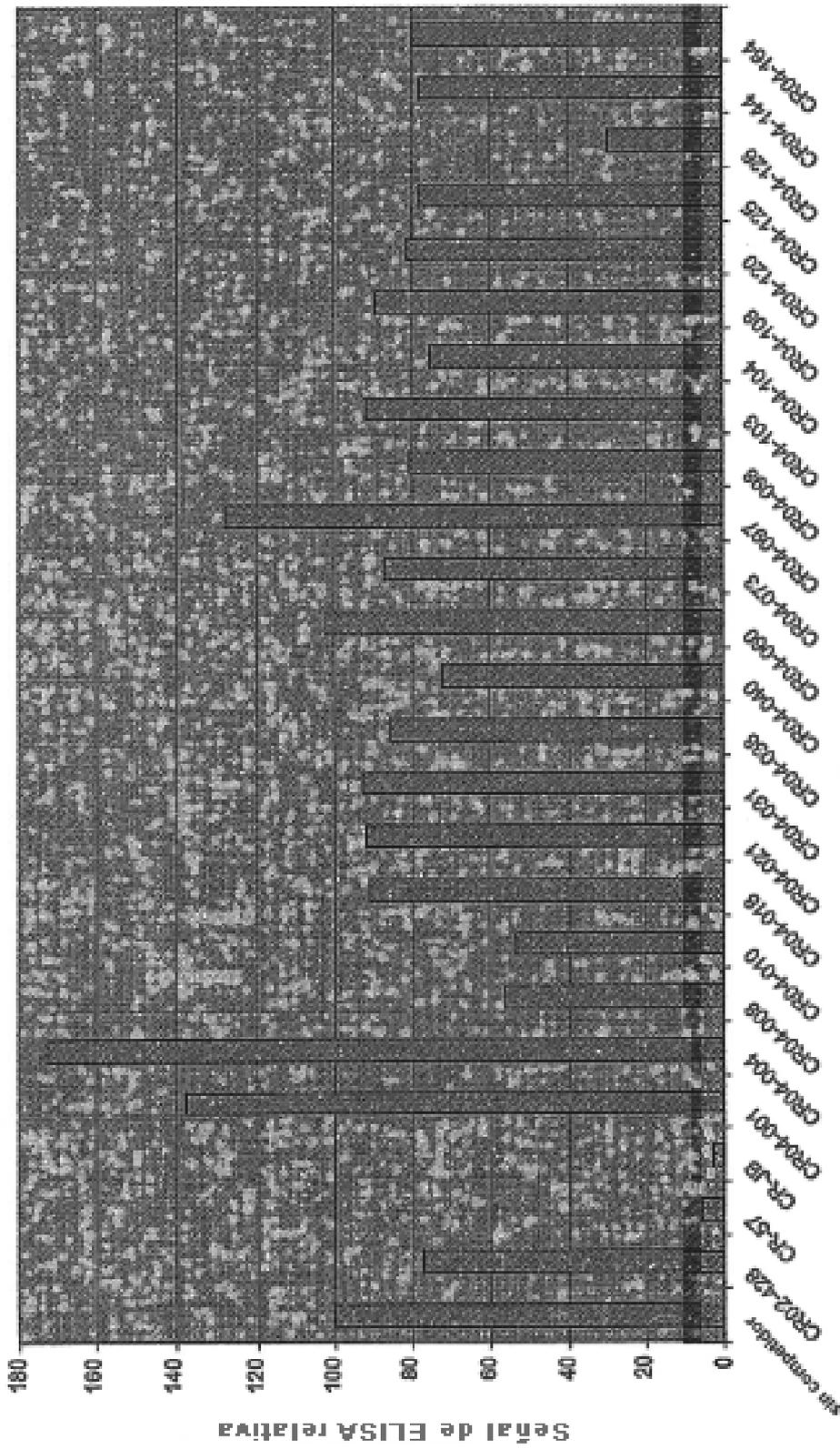


FIGURA 7

**A**

<b>CVS-11</b>	CGG ACC TGG <sup>1033</sup> AAT GAG ATC ATC
<b>E98-2, 4, 5, 6, 7</b>	CGG ACC TGG <b>GAT</b> GAG ATC ATC

**B**

<b>CVS-11</b>	HYKSVRTWNEIIPSKGCL <sup>336</sup>
<b>E98-2, 4, 5, 6, 7</b>	HYKSVRTWDEIIPSKGCL

FIGURA 8



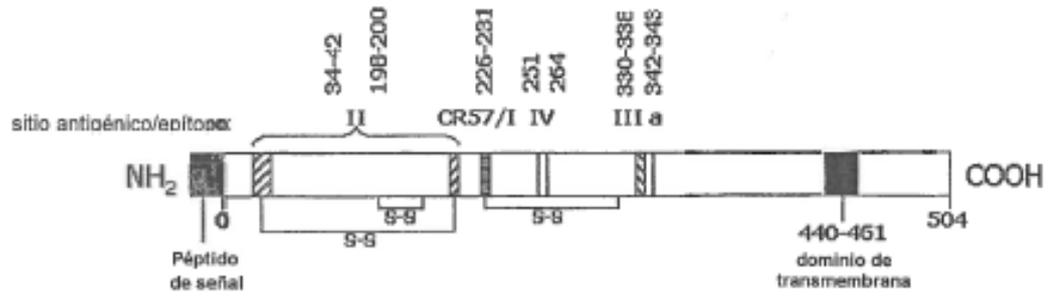


FIGURA 10