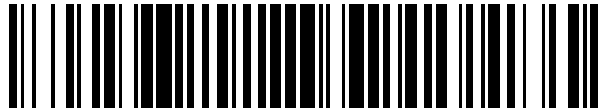


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 973**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/13** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C07K 16/10** (2006.01)  
**C07K 14/145** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 39/205** (2006.01)  
**A61P 31/14** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2006 E 06720126 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 1851315**

54 Título: **Anticuerpos humanos contra la rabia y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**02.02.2005 US 649512 P**

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

**09.04.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS (50.0%)  
225 Franklin Street, 12th Floor  
Boston, MA 02110, US y  
CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND  
PREVENTION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**THOMAS, WILLIAM D., JR.;  
AMBROSINO, DONNA;  
MANDELL, ROBERT;  
SCHONHOFF, SUSAN;  
BABCOCK, GREGORY J. y  
RUPPRECHT, CHARLES**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 453 973 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanos contra la rabia y usos de los mismos

5 **Antecedentes de la invención**

La rabia es una encefalitis progresiva aguda causada por infección con un virus de ARN de la familia *Rhabdoviridae* (género *Lisavirus*). Aunque los fallecimientos humanos por rabia son raros en las naciones desarrolladas (hay habitualmente menos de 5 muertes en los Estados Unidos cada año), se reseñan números significativos de muertes, por ejemplo en India, donde 50.000 personas mueren por la enfermedad y más de 500.000 son tratadas. Incluso en los Estados Unidos, de 15.000 a 40.000 personas reciben tratamiento antirrábico cada año. Típicamente, los perros son el reservorio principal de la enfermedad, pero otros mamíferos tales como mapaches, mofetas, murciélagos y zorros son reservorios frecuentes. La transmisión del virus desde un reservorio animal a seres humanos ocurre habitualmente mediante un mordisco o arañazo que atraviesa la piel. Puesto que la rabia en seres humanos es casi siempre letal, incluso las infecciones dudosas deben tratarse con un régimen de tratamiento agresivo postexposición.

El tratamiento postexposición de la rabia en seres humanos consiste en una higiene apropiada de la herida, la administración local de inmunoglobulina sérica antirrábica infiltrada en y alrededor de la herida y la administración de múltiples dosis de vacuna de la rabia, habitualmente durante varios días y semanas (para una revisión de la profilaxis contra la rabia véase, por ejemplo, Rupprecht y Gibbons *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 351: 25 (2004)). La higiene apropiada de la herida puede reducir la cantidad de virus que sobreviven para entrar en el paciente. La infiltración de la zona con inmunoglobulina sérica antirrábica puede unirse al virus de la rabia y ayudar a eliminarlo, reduciendo así la carga vírica (por inmunización pasiva). La administración de múltiples dosis de vacuna de la rabia (inmunización activa), habitualmente en forma de una primera dosis seguida de dosis de recuerdo posteriores, permite al paciente producir una fuerte inmunidad activa, incluyendo respuestas humoral y celular. Las fuentes actuales de inmunoglobulina sérica antirrábica se obtienen de la sangre de donantes humanos vacunados. Otras fuente de inmunoglobulina sérica antirrábica, por ejemplo, de equinos o murinos, se consideran inaceptables. Las fuentes actuales de vacunas de la rabia se producen en líneas celulares, se inactivan químicamente y se liofilizan. Aunque estos agentes, cuando se administran a tiempo, son altamente eficaces, permanecen ciertas trabas.

Por ejemplo, hay pocos fabricantes de estos agentes antirrábicos y siguen siendo relativamente caros, especialmente en los países en desarrollo donde son más necesarios. Además, la inmunoglobulina sérica antirrábica humana, debido a que se recoge del suero de donantes humanos, debe purificarse en gran medida para evitar la transmisión de cualquier agente accidental. Además, la vacuna antirrábica requiere un cultivo celular de trabajo intensivo y extensas etapas de inactivación y purificación. En consecuencia, son necesarias inmunoterapias mejoradas para tratar y prevenir la infección por rabia.

El documento WO 2005/002511 describe el tratamiento y la prevención de la rabia con una mezcla de anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia, a saber, los anticuerpos humanos SOJA, SOJB y SO57, a cada uno de los cuales se hace referencia también como MAb JA, MAb JB.1 y MAb 57, respectivamente. Kankanamge *et al.* (*Microbiology and immunology*, 2003, vol. 47, nº 7, páginas 507-519) describe la cartografía del epítipo conformacional sensible a pH bajo de glucoproteína del virus de la rabia reconocido por el anticuerpo monoclonal nº 30-44. Ray *et al.* (*Clinical and experimental immunology*, 2001, vol. 125, nº 1, páginas 94-101) describe la selección de fragmentos variables monocatenarios (scFv) frente al antígeno de glucoproteína del virus de la rabia de una colección de presentación en fago de scFV sintéticos humanos y su fusión con la región Fc de IgG1 humana. Enssle *et al.* (*Hybridoma*, 1991, vol. 10, nº 5, páginas 547-556) describe un anticuerpo monoclonal humano específico de rabia que protege a ratones frente a la rabia letal.

50 **Sumario de la invención**

La presente invención, como se define en las reivindicaciones, resuelve los problemas anteriores al proporcionar un anticuerpo monoclonal antirrábico totalmente humano recombinante que se une específicamente a una amplia variedad de aislamientos de virus de la rabia e inhibe la capacidad del virus de infectar células.

En una realización, esto se demuestra por la capacidad de los anticuerpos de neutralizar (concretamente, inhibir o bloquear) el virus de la rabia *in vitro* (por ejemplo, en un ensayo de RFFIT). En otra realización, esto se demuestra por la capacidad de los anticuerpos de inhibir la infectividad del virus de la rabia *in vivo* en un sujeto tal como un animal o un ser humano.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden prepararse eficazmente en cantidades prácticamente ilimitadas en forma altamente purificada. En consecuencia, los anticuerpos son adecuados para el pronóstico, diagnóstico y/o tratamiento de un individuo expuesto, o sospechoso de haberse expuesto, a la rabia. Los anticuerpos de la invención son particularmente ventajosos para la profilaxis postexposición a rabia (PPE) ya que eliminan la necesidad de una fuente donante de inmunoglobulina sérica antirrábica humana. Los anticuerpos pueden producirse usando una variedad de técnicas para preparar anticuerpos humanos conocidas en la materia. Por

ejemplo, como se ejemplifica en la presente memoria, los anticuerpos pueden generarse en animales transgénicos que expresan segmentos de genes de inmunoglobulina humana, por ejemplo, ratones transgénicos que comprenden un locus de Ig humana. Además, los anticuerpos pueden administrarse solos o en combinación, por ejemplo, con una vacuna antiviral de la rabia u otros anticuerpos, para aumentar los índices de supervivencia de sujetos (por ejemplo, animales y seres humanos) infectados con virus de la rabia.

En consecuencia, la invención proporciona:

10 - un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une a la proteína G del virus de la rabia e inhibe la capacidad del virus de infectar células, y que comprende una secuencia CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 5, una secuencia CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 8, una secuencia CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 4, una secuencia CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 7, una secuencia CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 3 y una secuencia CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 6;

- una composición que comprende el anticuerpo de la invención, o porción de antígeno del mismo, en un portador farmacéuticamente aceptable;

20 - un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo del anticuerpo de la invención, siendo dicho ácido nucleico idéntico a la SEQ ID NO:13, en combinación con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo de la invención, siendo dicho ácido nucleico idéntico a la SEQ ID NO: 14;

25 - un vector de expresión que comprende (i) un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo del anticuerpo de la invención, siendo dicho ácido nucleico idéntico a la SEQ ID NO:13 y (ii) un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo de la invención, siendo dicho ácido nucleico idéntico a la SEQ ID NO:14;

30 - una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la invención; y

- un anticuerpo de la invención, o porción de unión a antígeno del mismo, o una composición de la invención para uso en un procedimiento de tratamiento de infección por rabia en un cuerpo humano o animal, en la que el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se administra solo o en combinación con otro agente terapéutico.

Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, se unen específicamente a glucoproteína G del virus de la rabia. Los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, se unen específicamente a un epítipo en la mitad N-terminal de la glucoproteína G del virus de la rabia, concretamente, entre los residuos aminoacídicos 19-422. En otra realización, el epítipo de glucoproteína G de la rabia comprende los residuos aminoacídicos 336-442. En una realización, la glucoproteína G de la rabia comprende el residuo aminoacídico 336 así como alteraciones del mismo, tales como sustituciones o deleciones.

El epítipo de glucoproteína G de la rabia puede comprender un epítipo discontinuo lineal formado entre el sitio antigénico III y el sitio secundario A.

Los anticuerpos monoclonales humanos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden caracterizarse por unirse específicamente a virus de la rabia con una  $K_D$  de menos de aproximadamente  $10 \times 10^{-6}$  M. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, puede unirse específicamente a virus de la rabia (por ejemplo, una glucoproteína G de virus de la rabia) con una  $K_D$  de al menos aproximadamente  $10 \times 10^{-7}$  M, al menos aproximadamente  $10 \times 10^{-8}$  M, al menos aproximadamente  $10 \times 10^{-9}$  M, al menos aproximadamente  $10 \times 10^{-10}$  M, al menos aproximadamente  $10 \times 10^{-11}$  M o al menos aproximadamente  $10 \times 10^{-12}$  M o una  $K_D$  aún más favorable.

Los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden incluir una región de cadena pesada variable que comprende una secuencia aminoacídica al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia aminoacídica de la región de cadena pesada variable del anticuerpo producida por el clon 17C7 (residuos 20 a 144 de la SEQ ID NO: 1).

Los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden incluir una región de cadena ligera variable que comprende una secuencia aminoacídica al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia aminoacídica de la región de cadena ligera variable del anticuerpo producida por el clon 17C7 (residuos 21 a 127 de la SEQ ID NO: 2).

Los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden incluir una región de cadena pesada variable que comprende una secuencia aminoacídica al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia aminoacídica de la región de cadena pesada variable del anticuerpo producida por el clon

17C7 (residuos 20 a 144 de la SEQ ID NO: 1) y una región de cadena ligera variable que comprende una secuencia aminoacídica al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más idéntica a una secuencia aminoacídica de cadena ligera variable del clon 17C7 (residuos 21 a 127 de la SEQ ID NO: 2).

5 Los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden unirse específicamente a un epítipo que se superpone con un epítipo unido por un anticuerpo producido por el clon 17C7 y/o que compite por la unión a un virus de la rabia, o una porción del mismo, con un anticuerpo producido por el clon 17C7.

10 Los anticuerpos humanos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden (a) incluir una región variable de cadena pesada que se codifica por o deriva de (concretamente, es el producto de) un gen VH 3-30-3 o VH 3-33 humano y/o (b) incluir una región variable de cadena ligera que se codifica por o deriva de un gen  $V_{\kappa}$  humano seleccionado del grupo consistente en  $V_{\kappa}L6$ ,  $V_{\kappa}L11$ ,  $V_{\kappa}L13$ ,  $V_{\kappa}L15$  o  $V_{\kappa}L19$ .

15 Los anticuerpos monoclonales humanos de la presente invención incluyen anticuerpos completos, por ejemplo que incluyen un dominio efector (por ejemplo, un dominio Fc), así como porciones o fragmentos de anticuerpo tales como anticuerpos monocatenarios y fragmentos Fab. Los anticuerpos pueden ligarse también a una variedad de agentes terapéuticos, por ejemplo, agentes antivíricos o toxinas y/o un marcaje.

20 En otro aspecto, la invención se distingue por polipéptidos aislados que incluyen una porción de unión a antígeno de un anticuerpo producido por el clon de hibridoma 17C7 (al que también se hace referencia en la presente memoria como "17C7").

25 Los anticuerpos pueden codificarse por ácidos nucleicos aislados que incluyen una secuencia que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo que es al menos un 95 %, 99 % o más idéntica a la SEQ ID NO: 13 y ácidos nucleicos aislados que incluyen una secuencia que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que es al menos un 95 %, 99 % o más idéntica a la SEQ ID NO: 14.

30 Las células hospedadoras adecuadas para expresar los anticuerpos de la invención incluyen una variedad de células eucarióticas, por ejemplo, células de levadura, células de mamífero, por ejemplo células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0, células de mieloma o células de planta.

35 Las composiciones que incluyen anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a virus de la rabia e inhiben la capacidad del virus de infectar células de mamífero pueden incluir adicionalmente uno o más anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales o policlonales humanos), o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a virus de la rabia. El anticuerpo policlonal, o porción de unión a antígeno del mismo, puede unirse específicamente a glucoproteína G del virus de la rabia. La composición puede incluir (a) un anticuerpo monoclonal humano aislado que se une específicamente a un primer aislamiento de virus de la rabia y (b) un anticuerpo monoclonal humano aislado que se une específicamente a un segundo aislamiento de virus de la rabia.

40 Los anticuerpos monoclonales humanos o porciones de los mismos (y composiciones que comprenden los anticuerpos o porciones de los mismos) para uso según la invención pueden administrarse al sujeto en una variedad de formas adecuadas, por ejemplo, por vía intravenosa (IV), subcutánea (SC) y preferiblemente intramuscular (IM). El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, para uso según la invención puede administrarse solo o en combinación con otro agente terapéutico, por ejemplo, un segundo anticuerpo monoclonal humano o porción de unión a antígeno del mismo. En un ejemplo, el segundo anticuerpo monoclonal humano, o porción de unión a antígeno del mismo, se une específicamente a un segundo aislamiento de virus de la rabia que difiere del aislamiento unido al primer anticuerpo. En otro ejemplo, el anticuerpo se administra junto con otro agente, por ejemplo un agente antivírico. En otro ejemplo, el anticuerpo se administra junto con una gammaglobulina policlonal (por ejemplo, gammaglobulina humana). En otro ejemplo, el anticuerpo se administra antes, después o al mismo tiempo que una vacuna del virus de la rabia.

55 Los procedimientos para crear un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que se una específicamente a un virus de la rabia incluyen un procedimiento que implica inmunizar un animal no humano transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana con una composición que incluye un virus de la rabia, por ejemplo, virus vivo o inactivado, y aislar un anticuerpo, célula productora de anticuerpo o ácido nucleico que codifica anticuerpo del animal. El virus de la rabia puede estar inactivado, por ejemplo, mediante tratamiento químico y/o liofilización. El procedimiento puede incluir adicionalmente evaluar la unión del anticuerpo al virus de la rabia o glucoproteína G del virus de la rabia.

60 Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden crearse también expresando ácidos nucleicos que codifican anticuerpos humanos en una célula hospedadora (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican la porción de la región de unión a antígeno de un anticuerpo). Un hibridoma o transfectoma puede incluir los ácidos nucleicos anteriormente mencionados.

65 Puede crearse un hibridoma que expresa un anticuerpo que se une específicamente a un virus de la rabia

5 inmunizando un animal no humano transgénico que tiene un genoma que incluye un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana con una composición que incluye el virus de la rabia o glucoproteína G del virus de la rabia, aislando esplenocitos del animal, generando hibridomas a partir de los esplenocitos y seleccionando un hibridoma que produce un anticuerpo que se une específicamente a virus de la rabia o proteína de virus de la rabia del mismo.

10 El tratamiento de seres humanos con anticuerpos monoclonales humanos ofrece varias ventajas. Por ejemplo, es probable que los anticuerpos sean menos inmunogénicos en seres humanos que los anticuerpos no humanos. La terapia es también rápida, porque la inactivación del virus de la rabia puede ocurrir tan pronto como el anticuerpo alcanza los sitios de infección y neutraliza directamente el virus de la rabia causante de la enfermedad. Los anticuerpos humanos localizan también los sitios apropiados en seres humanos más eficazmente que los anticuerpos no humanos. Además, el tratamiento es específico de virus de la rabia, y es recombinante y altamente purificado y, al contrario que las terapias tradicionales, evita la potencial contaminación por agentes accidentales.

15 Resultarán evidentes otros rasgos y ventajas de la invención a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

### Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 muestra la secuencia aminoacídica de la región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano antirrábico recombinante (concretamente, el clon 17C7). Estas secuencias corresponden a las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) para cada cadena, correspondientes a las SEQ ID NO: 3, 4 y 5 (de la cadena pesada) y 6, 7 y 8 (de la cadena ligera).

25 La figura 2 muestra la secuencia aminoacídica de la región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano antirrábico recombinante (concretamente, el clon 6G11). Estas secuencias corresponden a las SEQ ID NO: 15 y 16, respectivamente. Se indican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) para cada cadena, correspondientes a las SEQ ID NO: 17, 18 y 19 (de la cadena pesada) y 20, 21 y 22 (de la cadena ligera).

30 La figura 3 es una representación esquemática de la glucoproteína G recombinante del virus de la rabia que indica los fragmentos que se analizaron para estudios de cartografía epitópica. Se determinó que el anticuerpo humano 17C7 se unía a un epitopo o epitopos en los residuos aminoacídicos 19-422, como se determina por inmunoprecipitación e inmunotransferencia.

35 La figura 4 muestra que el HuMab 17C7 neutraliza el virus de la rabia como se determina por RFFIT con dilución en serie de 1:5 a 1:390625, en comparación con suero humano (hRIG).

40 La figura 5 muestra que las glucoproteínas ERA-N y ERA-CO se expresaban en células 293T y se expresaban fácilmente con optimización de codón (A) y eran capaces de unirse a 17C7 (B-D) cuando se expresaban en la superficie de células.

La figura 6 muestra que el HuMab 17C7 reconoce el ectodominio G de la rabia (A) y en condiciones no reductoras (B), así como la proteína G de la cepa ERA (C).

45 La figura 7 muestra que el HuMab 17C7 reconoce las glucoproteínas de ERA mutantes N336K y N336D por ELISA (A) y por inmunotransferencia (B).

50 La figura 8 muestra que el HuMab 17C7 neutraliza la infección por pseudovirus de ERA de células (A-B) y las consecuencias de diversas mutaciones en la proteína G de ERA (C-D) respecto a la unión a 17C7 de la misma.

La figura 9 muestra las consecuencias de diversas mutaciones de la proteína G de ERA (A-B) respecto a la unión a 17C7 de la misma.

### Descripción detallada de la invención

55 Para proporcionar una clara comprensión de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se proporcionan convenientemente a continuación las siguientes definiciones.

#### Definiciones

60 Como se usa en la presente memoria, el término "virus de la rabia" hace referencia al virión o porción del mismo, por ejemplo porción proteica, tal como la glucoproteína G del virus de la rabia que está codificada por el ARN del virus de la rabia.

65 El término "anticuerpo antiviral de la rabia" es un anticuerpo que interacciona (por ejemplo se une) con un virus de la rabia o una proteína, carbohidrato, lípido u otro componente producido por o asociado al virus de la rabia. Un

“anticuerpo de glucoproteína G del virus de la rabia” es un anticuerpo que se une a una glucoproteína G del virus de la rabia o a un fragmento de la misma. Un anticuerpo antiviral de la rabia o antiglucoproteína G puede unirse a un epítipo, por ejemplo un epítipo conformacional o lineal, o a una porción o fragmento del virus o componente del mismo.

5 El término “anticuerpo humano” es un anticuerpo que tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos descritos en la presente memoria pueden incluir residuos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

15 Un anticuerpo antiviral de la rabia, o porción de unión a antígeno del mismo, puede administrarse solo o en combinación con un segundo agente. El sujeto puede ser un paciente infectado o sospechoso de estar infectado con virus de la rabia o que tiene un síntoma de enfermedad mediada por virus de la rabia (por ejemplo, una neuropatología, encefalomiелitis o título sérico de inmunoglobulina antirrábica). El tratamiento puede usarse para curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, recuperar de, paliar, mejorar o afectar a la infección y la enfermedad asociada a la infección, los síntomas de la enfermedad o una predisposición hacia la enfermedad. Para la gestión clínica de la infección por virus de la rabia, “tratamiento” se entiende frecuentemente que significa la profilaxis o prevención de una infección productiva antes del inicio de la dolencia.

20 La cantidad de anticuerpo antiviral de la rabia eficaz para tratar una infección por virus de la rabia, o “cantidad terapéuticamente eficaz”, es una cantidad del anticuerpo que es eficaz, tras una administración de dosis única o múltiple a un sujeto, para inhibir la infección por virus de la rabia, enfermedad o secuela de la misma, en un sujeto. La cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede variar según factores tales como el estado patológico, el sitio de la herida, la cepa o aislamiento del virus de la rabia, el vector animal del virus de la rabia, la edad, sexo y peso del individuo y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo de desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción de anticuerpo está superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Puede evaluarse la capacidad de un anticuerpo de inhibir un parámetro medible en un sistema modelo animal predictivo de la eficacia en seres humanos. Por ejemplo, la capacidad de un anticuerpo antiviral de la rabia de proteger a hámsteres de la provocación letal con virus de la rabia puede predecir la eficacia en seres humanos, como se describe en los ejemplos. Como alternativa, esta propiedad de un anticuerpo o composición de anticuerpo puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto de modular el virus de la rabia/interacciones celulares, por ejemplo, unión, infección, virulencia y similares, mediante ensayos *in vitro* conocidos por el médico experto. Los ensayos *in vitro* incluyen ensayos de unión, tales como ELISA, y ensayos de neutralización.

35 La cantidad de anticuerpo antiviral de la rabia eficaz para prevenir un trastorno, o la “cantidad profilácticamente eficaz” del anticuerpo es una cantidad que es eficaz, tras administración al sujeto en dosis única o múltiples, para prevenir o retardar la aparición del inicio o recurrencia del virus de la rabia, o para inhibir un síntoma de la misma. Sin embargo, si se desean intervalos de tiempo de protección más largos, pueden administrarse dosis aumentadas o más frecuentes.

45 Los términos “antagonizar”, “inducir”, “inhibir”, “potenciar”, “elevar”, “aumentar”, “reducir” o similares, por ejemplo, que designan diferencias cuantitativas entre dos estados, hacen referencia a una diferencia, por ejemplo, una diferencia estadística o clínicamente significativa, entre los dos estados.

50 El término “unión específica” o “se une específicamente a” hace referencia a la capacidad de un anticuerpo de unirse a un virus de la rabia, o porción del mismo, con una afinidad de al menos  $1 \times 10^{-6}$  M, y/o de unirse a un virus de la rabia, o porción del mismo, con una afinidad que es al menos dos veces mayor que la afinidad por un antígeno no específico.

55 Un “anticuerpo” es una proteína que incluye al menos una o dos regiones variables de cadena pesada (H) (abreviadas en la presente memoria como VH) y al menos una o dos regiones variables de cadena ligera (L) (abreviadas en la presente memoria como VL). Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas “regiones estructurales” (FR). La extensión de la región estructural y las CDR se ha definido precisamente (véase Kabat, E.A., *et al.* “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación NIH nº 91-3242, 1991 y Chothia, C. *et al.*, J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987, que se incorporan a la presente memoria como referencia). Preferiblemente, cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas de extremo amino a extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

65 Las regiones VH o VL del anticuerpo pueden incluir adicionalmente toda o parte de una región constante de cadena pesada o ligera. En una realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas de inmunoglobulina pesadas y dos cadenas de inmunoglobulina ligeras, en el que las cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras están

interconectadas, por ejemplo, por enlaces disulfuro. La región constante de cadena pesada incluye tres dominios, CH1, CH2 y CH3. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. La región variable de las cadenas pesadas y ligeras contiene un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos median típicamente la unión del anticuerpo a tejidos o factores del hospedador, incluyendo

- 5 diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico. El término "anticuerpo" incluye inmunoglobulinas intactas de tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como los subtipos de las mismas), en las que las cadenas ligeras de inmunoglobulina pueden ser de los tipos kappa o lambda.
- 10 El término "inmunoglobulina" hace referencia a una proteína consistente en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina humana reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 y IgG2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta (IgD),
- 15 épsilon (IgE) y mu (IgM), así como la multitud de genes de región variable de inmunoglobulina. Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina completas (de aproximadamente 25 K<sub>D</sub> y 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de región variable en el extremo NH<sub>2</sub> (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de región constante kappa o lambda en el extremo COOH. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina completas (de aproximadamente 50 K<sub>D</sub> y 446 aminoácidos) están codificadas de forma similar por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de región constante anteriormente mencionados, por ejemplo gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos). El término "inmunoglobulina" incluye una inmunoglobulina que tiene
- 20 CDR de una fuente humana o no humana. La estructura de la inmunoglobulina puede ser humana, humanizada o no humana, por ejemplo una estructura de murino modificada para reducir la antigenicidad en seres humanos, o una estructura sintética, por ejemplo una secuencia de consenso. Una región variable de inmunoglobulina/anticuerpo maduro está típicamente desprovista de secuencia líder. Las inmunoglobulinas/anticuerpos pueden distinguirse adicionalmente por sus regiones constantes en clases (por ejemplo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) y subclases o isotipos (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4).

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo" o "porción"), como se usa en la presente memoria, hace referencia a una porción de un anticuerpo que se une específicamente a un virus de la rabia o componente del mismo (por ejemplo, glucoproteína G), por ejemplo una molécula en que una o

30 más cadenas de inmunoglobulina no están completas, pero que se une específicamente a un virus de la rabia o componente del mismo. Los ejemplos de porciones de unión abarcadas dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente consistente en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento divalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd consistente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv consistente en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature 341: 544-546, 1989), que consiste en un dominio VH y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada que tiene suficiente estructura para unirse específicamente, por ejemplo una porción de unión a antígeno de una región variable. Pueden asociarse una porción de unión a antígeno de una región variable de cadena ligera y una porción de unión a antígeno de una región variable de cadena pesada, por

40 ejemplo los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, usando procedimientos recombinantes, mediante un ligador sintético que les permita crearse como una sola cadena proteica en que las regiones VL y VH se aparean formando moléculas monovalentes (conocido como Fc monocatenario (scFv), véanse por ejemplo Bird *et al.* (1988) Science 242: 423-426 y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos monocatenarios están también abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estas porciones de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los especialistas en la materia, y se criba la utilidad de las porciones de la misma manera que en anticuerpos intactos.

El término "anticuerpo monoespecífico" hace referencia a un anticuerpo que presenta una sola especificidad de unión y afinidad por una diana particular, por ejemplo un epítipo. Este término incluye un "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" que, como se usa en la presente memoria, hace referencia a una preparación de anticuerpos o porciones de los mismos con una sola composición molecular.

El término anticuerpo "recombinante", como se usa en la presente memoria, hace referencia a anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora, anticuerpos aislados de una colección combinatoria de anticuerpos, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico de genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de gen de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos recombinantes incluyen anticuerpos humanizados, injertados con CDR, quiméricos, generados *in vitro* (por ejemplo, por presentación en fago), y pueden incluir opcionalmente regiones constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana.

El término "sustancialmente idéntico" (o "sustancialmente homólogo") hace referencia a una primera secuencia aminoacídica o nucleotídica que contiene un número suficiente de residuos aminoacídicos o nucleótidos idénticos o equivalentes (por ejemplo, con una cadena lateral similar, por ejemplo, sustituciones aminoacídicas conservadas) a una segunda secuencia aminoacídica o nucleotídica, de tal modo que la primera y segunda secuencias

aminoacídicas o nucleotídicas tengan actividades similares. En el caso de anticuerpos, el segundo anticuerpo tiene la misma especificidad y tiene al menos un 50 % de la afinidad del primer anticuerpo.

5 Los cálculos de "homología" entre dos secuencias se efectúan como sigue. Las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y segunda secuencia aminoacídica o de ácido nucleico para alineamiento óptimo, y las secuencias no homólogas pueden desestimarse con fines de comparación). La longitud de una secuencia de referencia alineada con fines de comparación es de al menos un 50 % de la longitud de la secuencia de referencia. Se comparan entonces los residuos aminoacídicos o nucleótidos en las correspondientes posiciones aminoacídicas o nucleotídicas. Cuando una posición en la primera  
10 secuencia está ocupada por el mismo residuo aminoacídico o nucleotídico que la correspondiente posición en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en la presente memoria, la "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a la "homología" de aminoácido o ácido nucleico). La identidad porcentual entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco que tienen que introducirse  
15 para un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La comparación de las secuencias y la determinación de la homología porcentual entre dos secuencias pueden lograrse usando un algoritmo matemático. La homología porcentual entre dos secuencias aminoacídicas se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 444-453, 1970, que se ha incorporado al  
20 programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización de hueco de 12, penalización de hueco extendido de 4 y penalización de hueco con desplazamiento de marco de 5.

Como se usa en la presente memoria, el término "hibrida en condiciones de bajo rigor, rigor medio, alto rigor o muy alto rigor" describe condiciones para hibridación y lavado. Pueden encontrarse directrices para efectuar reacciones de hibridación en "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, N.Y. 6.3.1-6.3.6, 1989, que se  
25 incorpora a la presente memoria como referencia. Se describen procedimientos acuosos y no acuosos en esa referencia y puede usarse cualquiera. Las condiciones de hibridación específicas a que se hace referencia en la presente memoria son las siguientes: 1) condiciones de hibridación de bajo rigor: 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de dos lavados con 0,2X SSC, 0,1 % de SDS al menos a 50 °C (la temperatura de los lavados puede aumentarse a 55 °C para condiciones de bajo rigor); 2) condiciones de hibridación de rigor medio: 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados con 0,2X SSC, 0,1 % de SDS a 60 °C; 3) condiciones de hibridación de alto rigor: 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados con 0,2X SSC, 0,1 % de SDS a 65 °C y 4) condiciones de hibridación de muy alto rigor: fosfato de sodio 0,5 M, 7 % de SDS a 65 °C, seguido de uno o más lavados con 0,2X SSC, 1 % de SDS a 65 °C.  
30  
35

Se entiende que los anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos descritos en la presente memoria pueden tener sustituciones aminoacídicas adicionales conservativas o no esenciales, que no tienen un efecto sustancial sobre las funciones del polipéptido. Puede determinarse si una sustitución particular se tolerará o no, concretamente no afectará adversamente a propiedades biológicas deseadas tales como actividad de unión, como se describe en Bowie *et al.*, Science, 247: 1306-1310, 1990. Una "sustitución aminoacídica conservativa" es aquella en que un residuo aminoacídico se reemplaza por un residuo aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la materia familias de residuos aminoacídicos 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), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).  
40  
45

50 Un residuo aminoacídico "no esencial" es un residuo que puede alterarse en la secuencia de tipo silvestre de un polipéptido tal como un agente de unión, por ejemplo un anticuerpo, sin alterar sustancialmente la actividad biológica, mientras que un residuo aminoacídico "esencial" da como resultado dicho cambio.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un especialista en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, los procedimientos y materiales adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.  
55  
60

#### Visión general

65 El virus de la rabia es un virus de ARN que causa encefalitis mortal en seres humanos. Se proporcionan en la presente memoria composiciones para el tratamiento y la prevención de animales infectados por el virus de la rabia, en particular sujetos humanos, más particularmente seres humanos necesitados de tratamiento postexposición a



rabia o profilaxis postexposición (PPE). Las composiciones incluyen anticuerpos que reconocen proteínas u otros componentes moleculares (por ejemplo, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos) del virus de la rabia, incluyendo anticuerpos que reconocen la glucoproteína G del virus de la rabia, o porciones de la misma. En particular, se proporcionan anticuerpos monoclonales totalmente humanos recombinantes. En ciertas realizaciones, estos anticuerpos monoclonales humanos se producen en ratones que expresan segmentos de gen de inmunoglobulina humana (descrito a continuación). Se proporcionan también combinaciones de anticuerpos antiviral de la rabia.

Los anticuerpos (y porciones de unión a antígeno de los mismos) pueden unirse al virus de la rabia de un sujeto para inhibir la enfermedad mediada por el virus de la rabia en el sujeto. Por ejemplo, los anticuerpos antiviral de la rabia monoclonales humanos descritos en la presente memoria pueden neutralizar el virus de la rabia e inhibir la infección por rabia en estados finales y encefalitis. En otros ejemplos, pueden administrarse combinaciones de anticuerpos antiviral de la rabia (por ejemplo, anticuerpos monoclonales antiglucoproteína G del virus de la rabia) para inhibir la enfermedad mediada por el virus de la rabia. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden administrarse por vía local (infiltrarse) en el sitio de la herida de la infección por rabia y, opcionalmente, seguido de la administración de una vacuna antirrábica.

## 1. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS

### Inmunógenos

En general, los animales se inmunizan con virus y/o antígenos expresados por el virus de la rabia, produciendo anticuerpos. Para producir anticuerpos antiviral de la rabia, se inmunizan típicamente los animales con virus de la rabia inactivado. El virus de la rabia puede inactivarse, por ejemplo, por tratamiento químico y/o liofilización y están disponibles comercialmente varias vacunas del virus de la rabia.

Los anticuerpos antiviral de la rabia que se unen a y neutralizan el virus de la rabia pueden interactuar con epítopos específicos del virus de la rabia, por ejemplo, glucoproteína G del virus de la rabia. Por ejemplo, un anticuerpo antiglucoproteína G del virus de la rabia puede unirse a un epítipo en una región N-terminal de la glucoproteína G del virus de la rabia, o una región C-terminal o una región interna de la proteína o fragmento de la misma (véanse el ejemplo 4 y la figura 5) o una combinación de las mismas. En un ejemplo, un anticuerpo que se une a y neutraliza el virus de la rabia se une a un epítipo, por ejemplo un epítipo lineal en los aminoácidos 19-422 de la glucoproteína G del virus de la rabia. En otro ejemplo, se identifica un anticuerpo que se une a un epítipo lineal y/o epítipo conformacional en los aminoácidos 19-422 de glucoproteína G del virus de la rabia. Como se discute en la presente memoria, dichos epítopos pueden usarse también para identificar otros anticuerpos que se unen a la rabia.

### Generación de anticuerpos monoclonales humanos en ratones HuMAb

Pueden producirse anticuerpos monoclonales de manera imposible con anticuerpos policlonales. Los antiseros policlonales varían de animal a animal, mientras que las preparaciones monoclonales exhiben una especificidad antigénica uniforme. Los sistemas animales de murino son útiles para generar anticuerpos monoclonales, y son bien conocidas las técnicas para aislar y fusionar esplenocitos, y los procedimientos y reactivos para producir hibridomas. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse por una variedad de técnicas, incluyendo metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495, 1975. Véase, en general, Harlow, E. y Lane, D. "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.

Aunque estas técnicas estándar son conocidas, es deseable usar anticuerpos humanizados o humanos en lugar de anticuerpos de murino para tratar sujetos humanos, porque los seres humanos generan una respuesta inmunitaria ante anticuerpos de ratones y otras especies. La respuesta inmunitaria ante anticuerpos de murino se llama respuesta humana contra anticuerpos de ratón o HAMA (Schroff, R. *et al.*, *Cancer Res.*, 45, 879-885, 1985) y es una afección que causa enfermedad del suero en seres humanos y da como resultado un rápido aclaramiento de los anticuerpos de murino de la circulación de un individuo. Se ha mostrado que la respuesta inmunitaria en seres humanos es contra ambas regiones variables y constantes de inmunoglobulinas de murino. Los anticuerpos monoclonales humanos son más seguros para administración a seres humanos que los anticuerpos derivados de otros animales y los anticuerpos policlonales humanos.

Un tipo útil de animal en que generar anticuerpos monoclonales humanos es un ratón transgénico que expresa genes de inmunoglobulina humana en lugar de sus propios genes de inmunoglobulina de ratón. Dichos ratones transgénicos, por ejemplo, ratones "HuMAb™", contienen miniloci de gen de inmunoglobulina humana que codifican secuencias no reordenadas de inmunoglobulina de cadena pesada ( $\mu$  y  $\gamma$ ) y ligera  $\kappa$  humana, junto con mutaciones orientadas que inactivan los loci de cadena  $\mu$  y  $\kappa$  endógenos (véanse, por ejemplo Lonberg, N. *et al.*, *Nature* 368(6474): 856-859, 1994 y la patente de EE.UU. 5.770.429). En consecuencia, los ratones exhiben una expresión reducida de IgM o  $\kappa$  de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos experimentan conmutación de clase y mutación somática, generando anticuerpos monoclonales de IgG $\kappa$  humanos de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.*, *supra*; revisado en Lonberg, N. "Handbook of Experimental

Pharmacology" 113: 49-101, 1994; Lonberg, N. y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93, 1995 y Harding, F. y Lonberg, N., Ann. N. Y. Acad. Sci., 764: 536-546, 1995).

5 La preparación de dichos ratones transgénicos se describe con más detalle en Taylor, L. *et al.*, Nucleic Acids Research, 20: 6287-6295, 1992; Chen, J. *et al.*, Intentional Immunology 5: 647-656, 1993; Tuailon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90: 3720-3724, 1993; Choi *et al.*, Nature Genetics, 4: 117-123, 1993; Chen, J. *et al.*, EMBO J., 12: 821-830, 1993; Tuailon *et al.*, J. Immunol., 152: 2912-2920, 1994; Taylor, L. *et al.*, International Immunology, 6: 579-591, 1994 y Fishwild, D. *et al.*, Nature Biotechnology, 14: 845-851, 1996. Véanse adicionalmente la patente de EE.UU. 5.545.806, la patente de EE.UU. 5.569.825, la patente de EE.UU. 5.625.126, la patente de EE.UU. 5.633.425, la patente de EE.UU. 5.661.016, la patente de EE.UU. 5.770.429, la patente de EE.UU. 5.789.650, la patente de EE.UU. 5.814.318, la patente de EE.UU. 5.874.299 y la patente de EE.UU. 5.877.397, todas de Lonberg y Kay, y las publicaciones PCT nº WO 01/14424, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227 y WO 92/03918.

15 Para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra un antígeno, los ratones HuMAb pueden inmunizarse con un inmunógeno como se describe por Lonberg, N. *et al.* Nature, 368(6474): 856-859, 1994; Fishwild, D. *et al.*, Nature Biotechnology, 14: 845-851, 1996 y el documento WO 98/24884. Preferiblemente, los ratones son de 6-16 semanas de edad tras la primera inmunización. Por ejemplo, puede usarse una preparación purificada de virus de la rabia inactivado para inmunizar por vía intraperitoneal los ratones HuMAb. Para generar anticuerpos contra moléculas de proteínas, lípidos y/o carbohidratos del virus de la rabia, los ratones pueden  
20 inmunizarse con virus de la rabia vivo, muerto o no viable inactivado y/o liofilizado. En otra realización, puede usarse como inmunógeno una glucoproteína G del virus de la rabia o uno o más fragmentos de la misma.

Los ratones transgénicos HuMAb responden mejor cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (IP) con antígeno en coadyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP cada dos semanas (hasta un total de  
25 6) con antígeno en coadyuvante incompleto de Freund. La respuesta inmunitaria puede controlarse en el transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen por sangrados retroorbitales. Puede cribarse el plasma, por ejemplo por ELISA o citometría de flujo, y los ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina humana antiviral de la rabia pueden usarse para fusiones. Pueden aplicarse dosis de recuerdo por vía intravenosa con antígeno a los ratones 3 días antes del sacrificio y extracción del bazo. Se espera que puedan tener que  
30 efectuarse múltiples fusiones para cada antígeno. Se inmunizan típicamente varios ratones para cada antígeno.

Los esplenocitos de ratón pueden aislarse y fusionarse con PEG en una línea celular de mieloma de ratón basándose en protocolos estándares. Se criba entonces en los hibridomas resultantes la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, se fusionan suspensiones unicelulares de linfocitos esplénicos de ratones  
35 inmunizados con 1/6 del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con 50 % de PEG. Se siembran las células a aproximadamente  $2 \times 10^5$  en una placa de microvaloración de fondo plano, seguido de incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene suero clonal fetal al 20 %, medio acondicionado "653" al 18 %, Origen (IGEN) al 5 %, L-glutamina 4 mM, L-glutamina 11 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 50 mg/ml de gentamicina y 1x HAT (Sigma; se añade HAT 24 horas después de la fusión). Después de 2 semanas, se cultivan las células en medio en que se ha reemplazado HAT por HT. Se criban entonces en los sobrenadantes de pocillos individuales por ELISA los anticuerpos monoclonales de IgM e IgG antiviral de la rabia. Se vuelven a sembrar los  
40 hibridomas secretores de anticuerpo, se criban de nuevo y, si siguen siendo positivos de anticuerpos monoclonales antiviral de la rabia de IgG humana, pueden subclonarse al menos dos veces por dilución limitante. Se cultivan entonces los subclones estables *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejido para caracterización.

En una realización, el animal transgénico usado para generar anticuerpos humanos contra el virus de la rabia contiene al menos 1, típicamente 2-10 y a veces 25-50 o más copias del transgén descrito en el ejemplo 12 del  
50 documento WO 98/24884 (por ejemplo, pH1 o pH2) cruzado con un animal que contiene una sola copia del transgén de cadena ligera descrito en los ejemplos 5, 6, 8 o 14 del documento WO 98/24884, y la progenie cruzada con el animal con delección de  $J_H$  descrito en el ejemplo 10 del documento WO 98/24884. Los animales se cruzan hasta homocigosidad para cada uno de estos tres rasgos. Dichos animales tienen el siguiente genotipo: una sola copia (por conjunto haploide de cromosomas) de un minilocus no reordenado de cadena pesada humana (descrito en el ejemplo 12 del documento WO 98/24884), una sola copia (por conjunto haploide de cromosomas) de un constructo de cadena ligera  $\kappa$  humana reordenada (descrito en el ejemplo 14 del documento WO 98/24884) y una delección en cada locus de cadena pesada de ratón endógeno que elimina todos los segmentos de  $J_H$  funcionales (descrito en el ejemplo 10 del documento WO 98/24884). Dichos animales se cruzan con ratones que son homocigóticos de delección de segmentos de  $J_H$  (ejemplo 10 del documento WO 98/24884) para producir una  
60 progenie que es homocigótica de la delección de  $J_H$  y hemocigótica de los constructos de cadena pesada y ligera humana. Se inyectan antígenos a los animales resultantes y se usan para la producción de anticuerpos monoclonales humanos contra estos antígenos.

Los linfocitos B aislados de dicho animal son monoespecíficos con respecto a las cadenas pesada y ligera humanas debido a que contienen solo una copia de cada gen. Además, serán monoespecíficos con respecto a las cadenas pesadas humana o de ratón debido a que ambas copias del gen de cadena pesada de ratón endógeno no son

funcionales a causa de la delección que cubre la región J<sub>H</sub> introducida como se describe en los ejemplos 9 y 12 del documento WO 98/24884. Además, una fracción sustancial de los linfocitos B será mono-específica con respecto a las cadenas ligeras humana o de ratón, porque la expresión de la única copia del gen de cadena ligera kappa humano reordenado excluirá alélicamente e isotópicamente la reordenación de los genes de cadena kappa y lambda endógenos de ratón en una fracción significativa de los linfocitos B.

En una realización, el ratón transgénico exhibirá producción de inmunoglobulina con un repertorio significativo, idealmente sustancialmente similar al de un ratón nativo. Por tanto, por ejemplo en realizaciones en que los genes de Ig endógena se hayan inactivado, los niveles de inmunoglobulina totales estarán en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 10 mg/ml de suero, por ejemplo de 0,5 a 5 mg/ml, o al menos de aproximadamente 1,0 mg/ml. Cuando se ha introducido un transgén capaz de efectuar una conmutación de IgG a IgM en el ratón transgénico, la relación en ratón adulto de IgG a IgM sérica es preferiblemente de aproximadamente 10:1. La relación de IgG a IgM será mucho menor en el ratón inmaduro. En general, mayor de aproximadamente 10 %, por ejemplo de aproximadamente 40 a 80 % de las células de bazo y linfocitos de nódulo linfático expresarán exclusivamente proteína IgG humana.

El repertorio en el ratón transgénico se aproximará idealmente al mostrado en un ratón no transgénico, habitualmente al menos tan alto como aproximadamente 10 %, preferiblemente tan alto como 25 a 50 % o más. Generalmente, se producirán al menos aproximadamente mil inmunoglobulinas diferentes (idealmente IgG), preferiblemente de 10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> o más, dependiendo principalmente del número de diferentes regiones V, J y D introducidas en el genoma de ratón. Típicamente, las inmunoglobulinas exhibirán una afinidad por los antígenos preseleccionados de al menos aproximadamente 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-10</sup> M, 10<sup>-11</sup> M, 10<sup>-12</sup> M, 10<sup>-13</sup> M, 10<sup>-14</sup> M o más, por ejemplo hasta 10<sup>-15</sup> M o más.

Los ratones HuMAb pueden producir linfocitos B que experimentan conmutación de clase mediante recombinación de conmutación intratransgénica (conmutación en cis) y expresan inmunoglobulinas reactivas con el virus de la rabia. Las inmunoglobulinas pueden ser anticuerpos de secuencia humana, en los que los polipéptidos de cadena pesada y ligera están codificados por secuencias transgénicas humanas, lo que puede incluir secuencias derivadas por mutación somática y asociaciones recombinantes de la región V, así como secuencias codificadas por la línea germinal. Puede hacerse referencia a estas inmunoglobulinas de secuencia humana como sustancialmente idénticas a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento del gen VL o VH humano y un segmento JL o JH humano, aunque pueden estar presentes otras secuencias de línea no germinal como resultado de mutación somática y asociaciones de recombinación V-J y V-D-J diferenciales. Con respecto a dichos anticuerpos de secuencia humana, las regiones variables de cada cadena están típicamente codificadas al menos un 80 % por segmentos del gen V, J y, en el caso de cadenas pesadas, D, de línea germinal humana. Frecuentemente, al menos un 85 % de las regiones variables están codificadas por secuencias de línea germinal humana presentes en el transgén. A menudo, están codificadas de 90 o 95 % o más de las secuencias de la región variable por secuencias de línea germinal humana presentes en el transgén. Sin embargo, puesto que se introducen secuencias de línea no germinal por mutación somática y asociación de VJ y VDJ, los anticuerpos de secuencia humana tendrán frecuentemente algunas secuencias de región variable (y menos frecuentemente secuencias de región constante) que no están codificadas por segmentos de los genes V, D o J humanos como se encuentran en el transgén o transgenes humanos en la línea germinal de ratones. Típicamente, dichas secuencias de línea no germinal (o posiciones nucleotídicas individuales) se agruparán en o cerca de las CDR, o en regiones donde es conocido que se agrupan las mutaciones somáticas.

Los anticuerpos de secuencia humana que se unen al virus de la rabia pueden ser el resultado de conmutación isotípica, de tal modo que se producen anticuerpos que comprenden una cadena gamma de secuencia humana (tal como gamma 1, gamma 2 o gamma 3) y una cadena ligera de secuencia humana (tal como K). Dichos anticuerpos de secuencia humana de isotipo conmutado contienen a menudo una o más mutaciones somáticas, típicamente en la región variable y a menudo a o aproximadamente a 10 residuos de una CDR, como resultado de una maduración de afinidad y selección de linfocitos B por el antígeno, particularmente después de provocación con antígeno secundaria (o posterior). Estos anticuerpos de secuencia humana de alta afinidad tienen afinidades de unión de al menos aproximadamente 1x10<sup>-9</sup> M, típicamente de al menos 5x10<sup>-9</sup> M, frecuentemente de más de 1x10<sup>-10</sup> M y a veces de 5x10<sup>-10</sup> M a 1x10<sup>-11</sup> M o más.

Los anticuerpos antiviral de la rabia pueden crearse también en otros mamíferos, incluyendo ratones no transgénicos, seres humanos, conejos y cabras.

#### Anticuerpos antiviral de la rabia

Los anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente al virus de la rabia incluyen anticuerpos producidos por los clones 17C7, 6G11, 5G5, 2B10 y 1E5 descritos en la presente memoria (a los que se hace referencia, respectivamente, como clones de anticuerpo 17C7, 6G11, 5G5, 2B10 y 1E5). Los anticuerpos con regiones de cadena pesada variable y cadena ligera variable que son al menos un 80 % idénticos a las regiones de cadena pesada y ligera variables de 17C7, 6G11, 5G5, 2B10 o 1E5 pueden unirse también al virus de la rabia. Los anticuerpos antiviral de la rabia incluyen, por ejemplo, regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que

son al menos un 80 % idénticas a las CDR de las cadenas pesadas variables y/o cadenas ligeras variables de 17C7, 6G11, 5G5, 2B10 o 1E5. Las CDR de las regiones de cadena pesada variable de estos clones de anticuerpo se muestran en la tabla 1 siguiente.

5 Tabla 1. Secuencias aminoacídicas de CDR de cadena pesada variable

| Clon de Ab | Cadena | CDR  | Secuencia aminoacídica | SEQ ID NO: |
|------------|--------|------|------------------------|------------|
| 17C7       | H      | CDR1 | TYAMH                  | 3          |
| 17C7       | H      | CDR2 | VVSYDGR TKDYADSVKG     | 4          |
| 17C7       | H      | CDR3 | ERFSGAYFDY             | 5          |
| 6G11       | H      | CDR1 | GFTFSSYG               | 17         |
| 6G11       | H      | CDR2 | VAVIL                  | 18         |
| 6G11       | H      | CDR3 | ARIAPAGSAFDY           | 19         |

Las CDR de las regiones de cadena ligera variable de estos clones se muestran en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2. Secuencias aminoacídicas de CDR de cadena ligera variable

| Clon | Cadena | CDR  | Secuencia aminoacídica | SEQ ID NO: |
|------|--------|------|------------------------|------------|
| 17C7 | L      | CDR1 | RASQSVSSYLA            | 6          |
| 17C7 | L      | CDR2 | DASNRAT                | 7          |
| 17C7 | L      | CDR3 | QQRNNWP                | 8          |
| 6G11 | L      | CDR1 | QGISSV                 | 20         |
| 6G11 | L      | CDR2 | DAS                    | 21         |
| 6G11 | L      | CDR3 | QQFNSYPPT              | 22         |

10 Las CDR son las porciones de las inmunoglobulinas que determinan la especificidad por un antígeno particular. En ciertas realizaciones, las CDR correspondientes a las CDR de las tablas 1 y 2 que tienen variaciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones conservativas) pueden unirse al virus de la rabia. Por ejemplo, pueden estar presentes en un anticuerpo (o porción de unión a antígeno del mismo) que se une a virus de la rabia CDR en que 1, 2, 3, 4 o 5  
15 residuos, o menos de un 20 % de los residuos totales en la CDR, están sustituidos o eliminados.

De forma similar, los anticuerpos antiviral de la rabia pueden tener CDR que contienen una secuencia de consenso, ya que los motivos de secuencia conservada entre múltiples anticuerpos pueden ser importantes para la actividad de unión.

20 Las CDR derivadas derivan de una CDR dada a conocer o porción de la misma y opcionalmente alterada en una o más posiciones aminoacídicas. Las alteraciones incluyen una o más adiciones, deleciones o sustituciones aminoacídicas como se describe en la presente memoria. Las posiciones de residuo ejemplares para alteración incluyen aquellas posiciones aminoacídicas identificadas como sujetas a más variación que otras posiciones  
25 aminoacídicas, por ejemplo, posiciones sujetas a mutaciones somáticas como es conocido en la materia. Como alternativa, dichas posiciones pueden identificarse comparando dos o más secuencias conocidas por tener una actividad de unión deseada e identificando los residuos de CDR que varían y los residuos de CDR que son constantes. Por ejemplo, se presenta a continuación una comparación de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de 17C7 y 6G11 (Tablas 3-4) y se muestran el derivado de CDR o secuencias de consenso que  
30 pueden determinarse a partir de las mismas (Tablas 5-6).

Tabla 3. Comparación de regiones variables de cadena pesada

Comparación de:

35 17c7H - 126 aa

6G11H - 125 aa

40 usando el fichero de matriz: BLOSUM50, penalizaciones de hueco: -14/-4

87,2 % de identidad en una superposición de 125 aa; puntuación 731

```

-           10           20           30           40           50           60
  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYAMHWVRQAPGKGLEWVAVVSYDGRTKDY
  :::::::::::::::::::::
-           10           20           30           40           50           60
  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYH
  :::::::::::::::::::::
-           70           80           90           100          110          120
  ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRTEDTAVYFCARERFSGAYFDYWGQGLTIVTSSA
  :::::::::::::::::::::
-           70           80           90           100          110          120
  ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARIAPAGSAFDYWGQGLTIVTSSA
  :::::::::::::::::::::
-   STKGP SEQ ID NO: ____
  :::::
-   STKGP SEQ ID NO: ____
  
```

Tabla 4. Comparación de regiones variables de cadena ligera

5 Comparación de:

17C7L - 107 aa

6G11L - 106 aa

10

usando el fichero de matriz: BLOSUM50, penalizaciones de hueco: -14/-4

71,7 % de identidad en una superposición de 106 aa; puntuación: 527

```

-           10           20           30           40           50           60
  IVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTATGIPAR
  : ::::::::::: : ::::::::::: : ::::::::::: : ::::::::::: : :::::::::::
-           10           20           30           40           50           60
  IQLTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSVLAWYQQKSGKAPKFLIYDASSLESGVPSR
  ::::::::::: : ::::::::::: : ::::::::::: : ::::::::::: : :::::::::::
-           70           80           90           100
  FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYSCQQRNWPPTFGGGTKVEIK SEQ ID NO: ____
  ::::::::::: : ::::::::::: : ::::::::::: : :::::::::::
-           70           80           90           100
  FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQFNYPPTFGQGTKLEIK SEQ ID NO: ____
  ::::::::::: : ::::::::::: : ::::::::::: : :::::::::::
  
```

15

Se presentan a continuación derivados de CDR o secuencias de consenso ejemplares.

Tabla 5. Derivados de CDR de cadena pesada

| CDR  | Fórmula                                 | Modificaciones   |
|------|---|--|
| CDR1 | GFTFSX1YX2MH SEQ ID NO: 29              | X puede ser cualquier aminoácido o<br>X1=T/S; X2=A/G                                 |
| CDR2 | VAVX1X2YDGX3X4KX5X6ADSVKG SEQ ID NO: 30 | X puede ser cualquier aminoácido o<br>X1=V/I; X2=S/L; X3=R/S; X4=I/N; X5=D/Y; X6=Y/H |
| CDR3 | ARX1X2X3GX4X5FDY SEQ ID NO: 31          | X puede ser cualquier aminoácido o<br>X1=E/I; X2=R/A; X3=F/P; X4=A/S; X5=Y/S         |

20

Tabla 6. Derivados de CDR de cadena ligera

| CDR  | Fórmula                     | Modificaciones  |
|------|-----------------------------|---|
| CDR1 | RASQX1X2SSX3L SEQ ID NO: 32 | X puede ser cualquier aminoácido o<br>X1=S/G; X2=V/I; X3=Y/V          |
| CDR2 | DASX1X2X3X4 SEQ ID NO: 33   | X puede ser cualquier aminoácido o<br>X1=N/S1; X2=R/L; X3=A/E; X4=T/S |

|      |                           |  |
|------|---------------------------|--|
| CDR3 | CQQX1NX2X3P SEQ ID NO: 34 | X puede ser cualquier aminoácido o<br>X1=R/F; X2=N/S; X3=W/Y |
|------|---------------------------|--|

Se entiende también que una o más de las CDR dadas a conocer en la presente memoria (incluyendo derivados de CDR o secuencias de consenso) pueden usarse para identificar CDR de origen natural que sean adecuadas para unión a un epítipo de virus de la rabia. Las CDR pueden combinarse o clonarse cruzadamente también entre regiones variables, por ejemplo, pueden introducirse CDR de cadena ligera en regiones variables de cadena pesada y pueden introducirse CDR de cadena pesada en regiones variables de cadena ligera y cribarse para asegurar que se retiene la unión específica.

Los anticuerpos antiviral de la rabia pueden incluir regiones variables que son el producto, o derivan, de genes de inmunoglobulina humana específicos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden incluir una región de cadena pesada variable que es el producto, o deriva, de un gen VH 3-30-3 o VH 3-33 humano (véanse, por ejemplo, los n° acc.: AJ555951, n° GI.: 29836865; n° acc.: AJ556080, n° GI.: 29837087; n° acc.: AJ556038, n° GI.: 29837012, y otros segmentos del gen VH3-33 humano reordenados proporcionados en GenBank®). Los anticuerpos pueden incluir también, o como alternativa, una región variable de cadena ligera que es el producto, o deriva, de un gen VκL6, VκL11, VκL13, VκL15 o VκL19 humano (véanse, por ejemplo, el n° de acc. GenBank®: AJ556049, n° GI.: 29837033 para una secuencia parcial de un segmento del gen VκL19 humano reordenado). Como es conocido en la materia, y se describe en esta sección anteriormente, las regiones de inmunoglobulina variables de anticuerpos recombinados se derivan mediante un proceso de recombinación *in vivo* en que se introduce variabilidad en segmentos genómicos que codifican las regiones. En consecuencia, las regiones variables derivadas de un gen VH o VL pueden incluir nucleótidos que son diferentes de los del gen encontrado en tejidos no linfoides. Estas diferencias de nucleótidos se concentran típicamente en las CDR.

Además, los anticuerpos anteriores exhiben actividad de unión a un virus de la rabia y, en particular, a uno o más epítipos de glucoproteína G de la rabia. Dichos anticuerpos exhiben adicionalmente actividad de neutralización del virus de la rabia y eficacia protectora *in vivo* ante las secuelas de la rabia como se describe a continuación y en los ejemplos.

## 2. PRODUCCIÓN Y MODIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

Muchas formas diferentes de anticuerpos antiviral de la rabia pueden ser útiles en la inhibición de enfermedad mediada por virus de la rabia. Los anticuerpos pueden ser de diversos isotipos, incluyendo: IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgD o IgE. Preferiblemente, el anticuerpo es un isotipo de IgG, por ejemplo IgG1. Las moléculas de anticuerpo pueden ser completas (por ejemplo, un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) o pueden incluir solo un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv o Fv monocatenario). Estos incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos), anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, así como porciones de unión a antígeno de los anteriores.

Los anticuerpos antiviral de la rabia o porciones de los mismos útiles en la presente invención pueden ser también anticuerpos recombinantes producidos por células hospedadoras transformadas con ADN que codifica las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo deseado. Los anticuerpos recombinantes pueden producirse mediante técnicas de ingeniería genética conocidas. Por ejemplo, los anticuerpos recombinantes pueden producirse mediante clonación de una secuencia nucleotídica, por ejemplo un ADNc o ADN genómico, que codifica las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina del anticuerpo deseado. La secuencia nucleotídica que codifica esos polipéptidos se inserta entonces en un vector de expresión de modo que ambos genes estén ligados operativamente a sus propias secuencias de control de la expresión transcripcional y traduccional. El vector de expresión y secuencias de control de la expresión se eligen para ser compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. Típicamente, se insertan ambos genes en el mismo vector de expresión. Pueden usarse células hospedadoras procarióticas o eucarióticas.

Se prefiere la expresión en células hospedadoras eucarióticas porque dichas células es más probable que se ensamblen y secreten un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo que las células procarióticas. Sin embargo, cualquier anticuerpo producido que sea inactivo debido a un plegamiento inapropiado puede renaturalizarse según procedimientos bien conocidos (Kim y Baldwin, Ann. Rev. Biochem., 51: 459-89, 1982). Es posible que las células hospedadoras produzcan porciones de anticuerpos intactos, tales como dímeros de cadena ligera o dímeros de cadena pesada.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden producirse también en un transfectoma de célula hospedadora usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y procedimientos de transfección génica como son bien conocidos en la materia (Morrison, S., Science, 229: 1202, 1985). Por ejemplo, en una realización, el gen o genes de interés, por ejemplo genes de anticuerpo humano, pueden ligarse en un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariótico tal como el usado en un sistema de expresión del gen GS dado a conocer en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841, o en otros sistemas de

expresión bien conocidos en la materia. El plásmido purificado con los genes de anticuerpo clonados puede introducirse en células hospedadoras eucarióticas tales como células CHO o células NS0 o, como alternativa, otras células eucarióticas como células derivadas de planta, células de hongos o levadura. El procedimiento usado para introducir estos genes puede ser cualquier procedimiento descrito en la materia, tal como electroporación, lipofectina, Lipofectamine, transfección (por ejemplo, mediada por cloruro de calcio) o transfección balística, en que se bombardean células con micropartículas portadoras del ADN de interés. (Rodin, et al. Immunol. Lett., 74(3): 197-200, 2000). Después de introducir estos genes de anticuerpo en las células hospedadoras, pueden identificarse y seleccionarse las células que expresan el anticuerpo. Estas células representan los transfectomas, en los que puede amplificarse entonces su nivel de expresión y aumentarse de escala para producir anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes pueden aislarse y purificarse a partir de estos sobrenadantes de cultivo y/o células usando técnicas estándares.

Se entenderá que son útiles en la presente invención variaciones de los procedimientos anteriores. Por ejemplo, puede desearse transformar una célula hospedadora con ADN que codifica la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo. La tecnología de ADN recombinante puede usarse también para retirar parte o todo el ADN que codifica una o ambas de las cadenas ligera y pesada que no es necesario para la unión, por ejemplo, la región constante puede modificarse, por ejemplo, eliminando aminoácidos específicos. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncadas son útiles en los procedimientos descritos en la presente memoria. Además, pueden producirse anticuerpos bifuncionales en que una cadena pesada y una ligera se unen a un virus de la rabia, y la otra cadena pesada y ligera son específicas de un antígeno distinto del virus de la rabia, u otro epítipo del virus de la rabia.

Están también dentro del alcance de la invención los anticuerpos en que se han sustituido, eliminado o añadido aminoácidos específicos. En particular, los anticuerpos preferidos tienen sustituciones aminoacídicas en la región estructural, tal como para mejorar la unión al antígeno. Por ejemplo, pueden reemplazarse un pequeño número seleccionado de residuos estructurales aceptores de la cadena de inmunoglobulina por los correspondientes aminoácidos donantes. Las localizaciones preferidas de las sustituciones incluyen residuos aminoacídicos adyacentes a la CDR, o que pueden interactuar con una CDR (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.585.089). Los criterios para seleccionar aminoácidos del donante se describen en la patente de EE.UU. 5.585.089 (por ejemplo, columnas 12-16). La estructura aceptora puede ser una secuencia estructural de anticuerpo humano maduro o una secuencia de consenso. Como se desee, la región Fc de los anticuerpos de la invención puede alterarse para modular una función o funciones efectoras tales como, por ejemplo, unión a complemento y/o unión a receptor de Fc. Los criterios y subconjuntos de alteraciones estructurales y/o regiones constantes adecuadas para alteración (por ejemplo, por sustitución, delección o inserción) se describen en las patentes de EE.UU. nº 6548.640, 5.859.205, 6.632.927, 6.407.213, 6.054.297, 6.639.055, 6.737056 y 6.673.580.

Una "secuencia de consenso" es una secuencia formada por los aminoácidos de aparición más frecuente (o nucleótidos) en una familia de secuencias relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, "From Genes to Clones" (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1987). En una familia de proteínas, cada posición en la secuencia de consenso está ocupada por el aminoácido de aparición más frecuente en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos aparecen con igual frecuencia, puede incluirse cualquiera en la secuencia de consenso. Una "estructura de consenso" de una inmunoglobulina hace referencia a una región estructural en la secuencia de inmunoglobulina de consenso.

Un anticuerpo antiviral de la rabia, o porción de unión a antígeno del mismo, puede derivatizarse o ligarse con otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, un anticuerpo puede ligarse funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) con una o más entidades moleculares distintas, tales como otro anticuerpo, un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que pueda mediar la asociación con otra molécula (tal como una región nuclear de estreptavidina o un marcaje de polihistidina).

Se produce un tipo de anticuerpo derivatizado (o fragmento del mismo) mediante reticulación de dos o más de dichas proteínas (del mismo tipo o de tipos diferentes). Los reticuladores adecuados incluyen aquellos son heterobifuncionales que tienen dos grupos reactivos distintos separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Dichos ligadores están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Los agentes detectables útiles con los que dicho anticuerpo (o fragmento del mismo) puede derivatizarse (o marcarse) incluyen compuestos fluorescentes, diversas enzimas, grupos protésicos, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los agentes detectables fluorescentes ejemplares incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina y ficoeritrina. Una proteína o anticuerpo puede derivatizarse también con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante,  $\beta$ -galactosidasa, acetilcolinesterasa, glucosa oxidasa y similares. Cuando una proteína se derivatiza con una enzima detectable, se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente detectable peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Una proteína puede

derivatizarse también con un grupo protésico (por ejemplo, estreptavidina/biotina y avidina/biotina). Por ejemplo, un anticuerpo puede derivatizarse con biotina, y detectarse mediante la medida indirecta de la unión de avidina o estreptavidina.

- 5 Las proteínas y anticuerpos marcados pueden usarse, por ejemplo, en diagnóstico y/o experimentación en una serie de contextos, incluyendo (i) para aislar un antígeno predeterminado por técnicas estándares tales como cromatografía por afinidad o inmunoprecipitación y (ii) para detectar un antígeno predeterminado (por ejemplo, virus de la rabia o proteína, carbohidrato o lípido del virus de la rabia, o combinaciones de los mismos, por ejemplo, en un lisado celular o una muestra de paciente) para controlar los niveles de virus y/o proteína en tejido como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado.

Cualquiera de las técnicas de derivatización/marcaje de proteína anteriores puede emplearse también en una diana vírica, por ejemplo, una proteína de la rabia, tal como una glucoproteína G o fragmento o fragmentos de la misma.

### 15 3. PROCEDIMIENTOS DE CRIBADO

Los anticuerpos antiviral de la rabia pueden caracterizarse por la unión al virus de la rabia mediante una variedad de técnicas conocidas. Los anticuerpos se caracterizan típicamente por ELISA primero. Brevemente, pueden recubrirse placas de microvaloración con el antígeno diana en PBS, por ejemplo, el virus de la rabia o glucoproteína G o porción de la misma, y bloquearse entonces con proteínas irrelevantes tales como seroalbúmina bovina (BSA) diluida en PBS. Se añaden diluciones de plasma de ratones inmunizados con el antígeno diana, por ejemplo una vacuna de la rabia, a cada pocillo y se incuban durante 1-2 horas a 37 °C. Se lavan las placas con PBS/Tween 20 y se incuban entonces con un reactivo policlonal específico de Fc de IgG de cabra antihumano conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37 °C. Después de lavar, se revelan las placas con sustrato ABTS y se analiza la DO a 405. Preferiblemente, los ratones que desarrollan los títulos más altos se usarán para fusiones.

Puede usarse un ensayo ELISA como se describe anteriormente para cribar anticuerpos, y por tanto hibridomas que producen anticuerpos, que muestran reactividad positiva con el virus de la rabia. Los hibridomas que producen anticuerpos que se unen, preferiblemente con alta afinidad, al virus de la rabia pueden subclonarse entonces y caracterizarse adicionalmente. Puede elegirse entonces un clon de cada hibridoma que retiene la reactividad de las células progenitoras (por ELISA) para crear un banco de células y para purificación de anticuerpo.

Para purificar los anticuerpos antiviral de la rabia, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en botellas rotatorias, matraces de agitación de 2 l u otros sistemas de cultivo. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.) para purificar la proteína. Después de intercambio de tampón con PBS, puede determinarse la concentración por procedimientos espectrofotométricos.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales seleccionados se unen a epítomos únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse usando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, Ill.). La unión a MAb biotinilado puede detectarse con una sonda marcada con estreptavidina. En los anticuerpos antiviral de la rabia puede ensayarse adicionalmente la reactividad con el virus de la rabia o proteína del virus de la rabia mediante inmunoprecipitación o inmunotransferencia.

45 Los anticuerpos particulares se caracterizan por unirse a uno o más epítomos de una glucoproteína G de la rabia. Por ejemplo, el epítomo de glucoproteína G de la rabia puede ser un epítomo lineal, epítomo conformacional, epítomo discontinuo o combinaciones de dichos epítomos.

50 El epítomo de glucoproteína G de la rabia puede consistir en el sitio antigénico I, el sitio antigénico II, el sitio antigénico III, el sitio antigénico secundario A o combinaciones de dichos sitios antigénicos, por ejemplo, sitio antigénico III y sitio secundario A.

55 El epítomo de la glucoproteína G de la rabia puede comprender los residuos aminoácidos 336-442. La glucoproteína G de la rabia comprende el residuo aminoácido 336 y, opcionalmente, alteraciones del mismo tales como sustituciones o deleciones (por ejemplo, véase la Tabla 9).

60 Otros ensayos para medir la actividad de anticuerpos antiviral de la rabia incluyen ensayos de neutralización. Los ensayos de neutralización *in vitro* pueden medir la capacidad de un anticuerpo de inhibir un efecto citopático, la infectividad o la presencia de un virus sobre o en células en cultivo (véase el Ejemplo 3 a continuación). Los ensayos de neutralización *in vivo* o supervivencia pueden usarse para medir la neutralización del virus de la rabia en función de la morbilidad y/o mortalidad reducida en un modelo animal apropiado (véanse los ejemplos 5 a continuación).

### 4. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y KITS

65 En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones, por ejemplo composiciones farmacéuticamente aceptables, que incluyen una molécula de anticuerpo descrita en la presente memoria o porción de unión a antígeno



del mismo, formulada junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

“Portadores farmacéuticamente aceptables” incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. Los portadores pueden ser adecuados para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, rectal, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión).

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica pretendidos. Las composiciones útiles están en forma de soluciones inyectables o infundibles. Es un modo útil de administración el parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). Por ejemplo, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo puede administrarse por infusión o inyección intravenosa. En otra realización, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

La composición de la invención puede coadministrarse con a) uno o más de otros anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos antirrábicos, b) proteína de la rabia, por ejemplo una vacuna de la rabia, c) toxina o toxinas, d) otro agente o agentes terapéuticos (por ejemplo, antivirico o antiviricos) y/o e) marcaje o marcajes.

Las frases “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral” como se usan en la presente memoria significan modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, habitualmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intracraneal, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Las composiciones terapéuticas deberían ser típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de anticuerpo. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo (concretamente, anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida a un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos útiles de preparación son secado a vacío y liofilización, que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución esterilizada por filtración anteriormente del mismo. Puede mantenerse la fluidez apropiada de la solución, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede causarse la absorción prolongada de composiciones inyectables por la inclusión en la composición de un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpos descritos en la presente memoria pueden administrarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la materia, y para muchas aplicaciones terapéuticas. Como se apreciará por el especialista en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.

Un anticuerpo, o porción de anticuerpo del mismo, puede administrarse, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) puede incluirse también en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en comprimidos o incorporarse directamente a la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, los compuestos pueden incorporarse a excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención mediante una administración distinta de la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto, o coadministrar el compuesto, con un material para evitar su inactivación. Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la materia.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse una sola embolada, pueden administrarse varias dosis divididas con el tiempo, o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria por la facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria como se usa en la presente memoria hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos para tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Las especificaciones de las formas de dosificación unitaria de la invención están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto inactivo y el efecto terapéutico particular para conseguir

y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de combinación de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

5 Es un intervalo ejemplar no limitante para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo de la invención, o porción de unión a antígeno del mismo, 0,1-60 mg/kg, por ejemplo 0,5-25 mg/kg, 1-2 mg/kg o 0,75-10 mg/kg. En una realización, la cantidad de anticuerpo antiviral de la rabia (o porción de unión a antígeno de mismo) administrada es de, o aproximadamente de, 0,125 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg o está en un espacio o intervalo de las mismas. Ha de entenderse adicionalmente que, para cualquier sujeto particular, deberían ajustarse los regímenes de dosificación específicos con el tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en la presente memoria son solo ejemplares y no se pretende que limiten el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

15 Se describen también en la presente memoria kits que incluyen un anticuerpo antiviral de la rabia o porción de unión a antígeno del mismo. Los kits pueden incluir uno o más de otros elementos incluyendo: instrucciones para uso, otros reactivos, por ejemplo un marcaje, un agente terapéutico o un agente útil para quelar o acoplar de otro modo un anticuerpo con un marcaje o agente terapéutico, u otros materiales para preparar el anticuerpo para administración, portadores farmacéuticamente aceptables y dispositivos u otros materiales para administración a un sujeto.

20 Pueden envasarse conjuntamente diversas combinaciones de anticuerpos. Por ejemplo, un kit puede incluir anticuerpos que se unen a virus de la rabia (por ejemplo, anticuerpos que incluyen las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de 17C7, 6G11, 5G5, 2B10, E5 o una combinación de las mismas. Los anticuerpos pueden mezclarse conjuntamente, o envasarse separadamente, en el kit.

25 Las instrucciones para uso pueden incluir instrucciones para aplicación terapéutica, incluyendo las dosificaciones y/o modos de administración sugeridos, por ejemplo, en un paciente con un síntoma o indicación de exposición a virus de la rabia o sospechoso de exposición a virus de la rabia. Otras instrucciones pueden incluir instrucciones sobre el acoplamiento del anticuerpo con un quelante, un marcaje o un agente terapéutico, o para la purificación de un anticuerpo conjugado, por ejemplo a partir de componentes de conjugación no reaccionados.

30 El kit puede incluir un marcaje detectable, un agente terapéutico y/o un reactivo útil para quelar o acoplar de otro modo un marcaje o agente terapéutico con el anticuerpo. Los agentes de acoplamiento incluyen agentes tales como *N*-hidroxisuccinimida (NHS). En dichos casos, el kit puede incluir uno o más recipientes de reacción para llevar a cabo la reacción o un dispositivo de separación, por ejemplo una columna cromatográfica, para uso en la separación del producto acabado de los materiales de partida o intermedios de reacción.

35 El kit puede contener adicionalmente al menos un reactivo adicional tal como un agente de diagnóstico o terapéutico, por ejemplo, un agente de diagnóstico o terapéutico como se describe en la presente memoria, y/o uno o más anticuerpos antiviral de la rabia (o porciones de los mismos), formulados como sea apropiado, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

40 Otros kits pueden incluir ácidos nucleicos optimizados que codifican anticuerpos antiviral de la rabia, para uso como inmunoterapia pasiva, y/o proteína o proteínas del virus de la rabia, o fragmentos de las mismas, para uso, por ejemplo, como vacunas (inmunoterapia activa) e instrucciones para la expresión de los ácidos nucleicos.

## 5. PROCEDIMIENTOS TERAPÉUTICOS Y COMPOSICIONES

50 Los anticuerpos y fragmentos de unión a anticuerpo de la presente invención tienen utilidades terapéuticas, profilácticas y de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estos anticuerpos pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo* o *in vivo*, a un animal, preferiblemente un sujeto humano, para tratar, inhibir, evitar la recaída y/o diagnosticar virus de la rabia y enfermedad asociada a la rabia.

55 Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" se pretende que incluya animales humanos y no humanos. El término "animales no humanos" incluye todos los vertebrados, por ejemplo mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ratones, perros, gatos, cerdos, vacas y caballos.

60 Las proteínas y anticuerpos pueden usarse en células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, las células pueden cultivarse *in vitro* en medio de cultivo y la etapa de puesta en contacto puede efectuarse añadiendo el anticuerpo antiviral de la rabia o fragmento del mismo al medio de cultivo. Los anticuerpos pueden usarse en procedimientos efectuados en viriones o células presentes en un sujeto, como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico o profiláctico). En dichos procedimientos *in vivo*, se efectúa la etapa de puesta en contacto en un sujeto e incluye la administración de un anticuerpo antiviral de la rabia o porción del mismo al sujeto en condiciones eficaces para permitir la unión del anticuerpo, o porción, a un virus de la rabia o cualquier porción del mismo presente en el sujeto, por ejemplo, en o cerca de una herida o en o cerca de células de origen neuronal.

65

Se describen en la presente memoria procedimientos de administración de moléculas de anticuerpo. Las dosificaciones adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y del fármaco particular usado. Las moléculas de anticuerpo pueden usarse como agentes competitivos para unión a ligando para inhibir o reducir una interacción indeseable, por ejemplo, para inhibir la unión y/o infección de virus de la rabia en células, por ejemplo células neuronales.

Los anticuerpos antiviral de la rabia (o porciones de unión a antígeno de los mismos) pueden administrarse en combinación con otros anticuerpos antiviral de la rabia (por ejemplo, otros anticuerpos monoclonales, gammaglobulina policlonal, por ejemplo suero humano que comprende inmunoglobulinas antirrábicas). Las combinaciones de anticuerpos que pueden usarse incluyen un anticuerpo antiviral de la rabia de la invención, o porción de unión a antígeno del mismo, y/o un anticuerpo antiproteína G del virus de la rabia, o porción de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo antiviral de la rabia o antiproteína G puede ser el clon de anticuerpo 17C7, que incluye las regiones variables de dicho anticuerpo o anticuerpos, o un anticuerpo con regiones variables al menos un 90 % idénticas a las regiones variables de dicho anticuerpo o anticuerpos. En una realización, el anticuerpo antiviral de la rabia puede ser 17C7. Las combinaciones de anticuerpos antiviral de la rabia (por ejemplo, 17C7, 6G11, 5G5, 2B10 y/o E5) pueden proporcionar una potente inhibición de la rabia, especialmente, por ejemplo, de aislamientos de rabia particulares (véanse las Tablas 11-13). Los aislamientos de virus de la rabia característicos para los que son adecuados los anticuerpos de la invención para tratar, detectar, diagnosticar y similares incluyen, por ejemplo, aislamiento de CVS-11, aislamiento de ERA, aislamiento de virus de Pasteur, aislamiento de zorro gris (Texas), aislamiento de zorro gris (Arizona), aislamiento de zorro ártico (Arkansas), aislamiento de mofeta (centro norte), aislamiento de mofeta (centro sur), aislamiento de mapache, aislamiento de coyote (Texas), aislamiento de perro (Texas), aislamiento de murciélago (*Lasiurus borealis*; Tennessee), aislamiento de murciélago (*Eptesicus fuscus*-*Myotis* spp.; Colorado), aislamiento de murciélago (*Myotis* spp.; Washington), aislamiento de murciélago (*Lasiurus cinereus*; Arizona), aislamiento de murciélago (*Pipistrellus subflavus*; Alabama), aislamiento de murciélago (*Tadarida brasiliensis*; Alabama), aislamiento de murciélago (*Lasionycteris noctivagans*; Washington), aislamiento de murciélago (*Eptesicus fuscus*; Pennsylvania), aislamiento de mangosta (Nueva York/Puerto Rico), aislamiento de perro (Argentina), aislamiento de perro (Sonora), aislamiento de perro (Gabón), aislamiento de perro (Tailandia) y combinaciones de los mismos.

Se entiende que cualquiera de los agentes de la invención, a saber, anticuerpos antiviral de la rabia o fragmentos de los mismos, puede combinarse, por ejemplo en relaciones o cantidades diferentes, para un efecto terapéutico mejorado. Es más, los agentes de la invención pueden formularse como una mezcla o ligarse química o genéticamente usando técnicas reconocidas en la materia, dando así como resultado anticuerpos ligados covalentemente (o fragmentos de anticuerpo ligados covalentemente) que tienen propiedades de unión antirrábica, por ejemplo, propiedades de unión multiepitópica, por ejemplo, a glucoproteína G del virus de la rabia. La formulación combinada puede estar guiada por la determinación de uno o más parámetros tales como afinidad, avidez o eficacia biológica del agente solo o en combinación con otro agente. Los agentes de la invención pueden administrarse también en combinación con otros agentes que potencien el acceso, semivida o estabilidad del agente terapéutico en la orientación a, aclaramiento y/o captación de virus de la rabia o un antígeno del mismo.

Dichas terapias de combinación son preferiblemente aditivas e incluso sinérgicas en su actividad terapéutica, por ejemplo, en la inhibición, prevención, infección y/o tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con el virus de la rabia. Administrar dichas terapias de combinación puede reducir la dosificación del agente terapéutico (por ejemplo, anticuerpo o mezcla de fragmentos de anticuerpo o anticuerpo o fragmento de anticuerpo biespecífico reticulado fusionado genéticamente) necesario para conseguir el efecto deseado.

Se describen también composiciones inmunogénicas que contienen una cantidad inmunogénicamente eficaz de un componente del virus de la rabia, por ejemplo, glucoproteína G de virus de la rabia, o fragmentos del mismo, y pueden usarse en la generación de anticuerpos antiviral de la rabia. Los epítopos inmunogénicos en una secuencia de proteína de virus de la rabia pueden identificarse como se describe en la presente memoria (véase, por ejemplo, el ejemplo 4) o según procedimientos conocidos en la materia; y pueden suministrarse proteínas, o fragmentos que contienen esos epítopos, de diversos modos en una composición de vacuna. Las composiciones adecuadas pueden incluir, por ejemplo, lipopéptidos (por ejemplo, Vitiello *et al.*, J. Clin. Invest. 95: 341 (1995)), composiciones peptídicas encapsuladas en microesferas de poli(DL-lactida-co-glicolida) ("PLG") (véanse, por ejemplo, Eldridge *et al.*, Molec. Immunol. 28: 287-94 (1991); Alonso *et al.*, Vaccine 12: 299-306 (1994); Jones *et al.*, Vaccine 13: 675-81 (1995)), composiciones peptídicas contenidas en complejos inmunoestimulantes (ISCOMS) (véanse, por ejemplo, Takahashi *et al.*, Nature 344: 873-75 (1990); Hu *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 113: 235-43 (1998)) y sistemas peptídicos multiantigénicos (MAP) (véanse, por ejemplo, Tam, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5409-13 (1988); Tam, J. Immunol. Methods 196: 17-32 (1996)).

Los portadores útiles que pueden usarse con composiciones inmunogénicas son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, tiroglobulina, albúminas tales como seroalbúmina humana, toxoide del tétanos, poliaminoácidos tales como poli-L-lisina, poli-L-ácido glutámico, gripe, proteína nuclear del virus de hepatitis B y similares. Las composiciones pueden contener un diluyente fisiológicamente tolerable (concretamente aceptable) tal como agua o solución salina, típicamente solución salina tamponada con fosfato. Las composiciones y vacunas incluyen típicamente también un coadyuvante. Los coadyuvantes tales como coadyuvante incompleto de Freund, fosfato de aluminio, hidróxido de

aluminio o alúmina son ejemplos de materiales bien conocidos en la materia. Adicionalmente, las respuestas de CTL pueden cebarse conjugando antígenos diana, por ejemplo una proteína o proteínas del virus de la rabia (o fragmento, derivados inactivos o análogos de los mismos) con lípidos tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinilserilserina (P3CSS).

5 Los anticuerpos antirrábicos pueden administrarse en combinación con otros agentes tales como composiciones para tratar enfermedades mediadas por el virus de la rabia. Por ejemplo, los productos terapéuticos que pueden administrarse en combinación con anticuerpos antirrábicos incluyen agentes antivíricos, inmunoglobulina sérica y/o vacunas para tratar, prevenir o inhibir la rabia (por ejemplo, vacunas tales como RabAvert™ (Chiron), vacuna de la rabia adsorbida (Bioport) e Imovax™ Rabies (Aventis) y/o inmunoglobulinas tales como BayRab™ (Bayer) e Imogam™ Rabies-HT (Aventis). El anticuerpo puede administrarse antes, después o al mismo tiempo que la vacuna del virus de la rabia.

## 6. OTROS PROCEDIMIENTOS

15 Puede usarse un anticuerpo antirrábico (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) para aislar el virus de la rabia mediante técnicas estándares tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Además, puede usarse un anticuerpo antirrábico para detectar el virus (por ejemplo, en una muestra de suero), por ejemplo para cribar en muestras la presencia de exposición a virus de la rabia. Los anticuerpos antirrábicos pueden usarse en diagnóstico para controlar los niveles de virus en el tejido como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. Además, pueden usarse epítomos de virus de la rabia, por ejemplo epítomos de glucoproteína G (lineales, conformacionales o combinaciones de los mismos) como inmunógenos o como dianas para identificar moléculas de unión antirrábicas neutralizantes incluyendo, por ejemplo, suero humano, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos.

### Ejemplificación

A lo largo de los ejemplos, se usaron los siguientes materiales y procedimientos a menos que se afirme otra cosa.

#### Materiales y procedimientos

30 En general, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, por ejemplo, tecnología de anticuerpos) y técnicas estándares en preparación de polipéptidos. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, "Molecular Cloning": Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); "Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)", 510, Paul, S., Humana Pr (1996); "Antibody Engineering: A Practical Approach" (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); "Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999) y "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992). Véase también, por ejemplo, Smith *et al.*, "A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody", páginas 181-189 y capítulo 15 en "Laboratory Techniques in Rabies", 4ª ed., editado por Meslin *et al.*, Ginebra: Organización Mundial de la Salud (1996).

#### Inmunización y aislamiento de hibridomas en ratón

45 Los ratones HuMab (Medarex) son ratones transgénicos que contienen genes de inmunoglobulina humana y genes de cadena pesada y genes de cadena ligera kappa de ratón inactivados. Se inyectaron típicamente a los ratones HuMab una dosis ~1/10 de una dosis humana de una vacuna de la rabia comercialmente disponible usando coadyuvante completo de Freund en la primera semana, y coadyuvante RIBI en las semanas posteriores durante un total de 6-8 semanas. Se usó ELISA de glucoproteína de cubierta de rabia para medir las respuestas séricas y se sacrificaron los animales cuando las respuestas séricas se consideraron máximas. Se generaron hibridomas mediante la fusión de esplenocitos y células asociadas (células de mieloma de ratón P3X63Ag8.653) y se cribó en los sobrenadantes resultantes la reactividad en un ELISA de glucoproteína de rabia. Se purificaron los anticuerpos positivos de los cultivos de hibridoma por cromatografía en proteína A Sepharose (Amersham).

#### RFFIT

55 Se efectuó el ensayo de RFFIT como se describe en la materia. Las cepas de virus de la rabia, aislamientos de virus de la calle y células de neuroblastoma de ratón (MNA) usadas eran todas del "Center for Disease Control and Prevention", Atlanta, EE.UU.

#### Células y cultivos

60 Se cultivaron células HEK-293T/17, obtenidas del ATCC, en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10 % y 100 UI de penicilina-estreptomina (medio completo) a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Se recogieron las células en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía EDTA 5 mM.

Clonación de glucoproteínas de la rabia

Se usó la secuencia aminoacídica de la proteína G de la rabia (cepa ERA, Genbank: AF406693) para diseñar una versión con optimización de codón del gen de glucoproteína de la rabia que cubre toda la glucoproteína de los aminoácidos 1-524. Se clonó el gen sintético en pcDNA3.1Myc/His (Invitrogen) en fase con los marcajes de c-Myc y 6-histidina (His). Estos inmunomarcajes posibilitaron una fácil purificación y detección. Se construyeron versiones truncadas de los genes que codifican la glucoproteína marcada que contenían el ectodominio entero (aa 20-439). Se realizaron los truncamientos por amplificación por PCR de los fragmentos deseados a partir de clones de glucoproteína completa, seguido de digestión de restricción y ligamiento con pcDNA3.1Myc/His (Invitrogen), y se verificaron por análisis de la secuencia de ADN.

Para el aislamiento de genes nativos que codifican diversas cepas de glucoproteína G del virus de la rabia, se infectaron células MNA con virus de la rabia de CVS-11, de mofeta-CA, de *Lasirus bonealis*, de *Lasirus cinereus* y de ERA (Center for Disease Control and Prevention, EE.UU.). Se extrajo el ARN de las células infectadas o de viriones usando el reactivo Trizol. Se efectuó una PCR-TI en 2 etapas. En primer lugar, se sintetizó ADNc usando el kit Ambion Retroscript y se amplificaron entonces los genes que codifican la glucoproteína de la rabia usando Turbo Pfu (Stratagene) y cebadores específicos de virus de la rabia. Se clonaron los genes que codifican glucoproteína de la rabia en el vector de expresión de mamífero pcDNA3.1MycHis (Invitrogen) en los sitios HindIII/Xba I en fase con los marcajes epitópicos c-Myc e His. Se sintetizaron genes recombinantes que codifican glucoproteína de la rabia mutados en residuos clasificados como sitio antigénico I, II, III y secundario usando mutagénesis dirigida a sitio. Se usaron cebadores superpuestos que contienen las mutaciones puntuales deseadas para amplificar los genes de glucoproteína mutante completa y el vector pcDNA3.1Myc/His a partir de la glucoproteína de ERA con optimización de codón anteriormente clonada. Se digirió el ADN amplificado por PCR con DpnI para retirar el molde de partida no amplificado de tipo silvestre, se transformó en bacterias y se cribó la mutación pretendida por secuenciación. Se confirmó la secuencia de codificación completa de cada mutante, y se clonaron los constructos resultantes en vectores de expresión pcDNA3.1Myc/His.

Expresión de glucoproteína recombinante

Se transfectaron todos los constructos en células HEK-293T/17 usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) como se describe por el fabricante. Se cultivaron las células hasta 85 % de confluencia en discos de cultivo de tejido de 150 mm en 15 ml de DMEM-10 % de suero fetal bovino (FCS). Se añadieron a las células cantidades de 30 µg de ADN mezclado con 75 µl de Lipofectamine y se incubaron las placas durante una noche a 37 °C. Se retiraron los medios y se almacenaron a 24, 48 y 72 horas después de la transfección para las proteínas solubles secretadas o se desecharon para las proteínas unidas a membrana.

Purificación, inmunoprecipitación y transferencia Western de proteína recombinante

Se purificaron las glucoproteínas de la rabia ERA20-439 y CVS-1120-439, que contienen ambas los marcajes epitópicos Myc e His, a partir de sobrenadante de cultivo celular mediante incubación con perlas de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) (Invitrogen), seguido de filtración en columna y elución de proteína usando imidazol 250 mM. Para la inmunoprecipitación de glucoproteínas unidas a membrana completas, se separaron las células transfectadas de la placa con PBS/EDTA 5 mM y se solubilizaron con PBS, 1 % de CHAPS, 1X inhibidor de proteinasa completo. Se clarificaron los lisados celulares por centrifugación y se incubaron con HuMab 17C7 o un HuMab no de rabia de control y proteína A Sepharose. Se resolvieron las proteínas inmunoprecipitadas mediante PAGE-SDS para análisis posterior.

Para el análisis de inmunotransferencia, se hirvieron las proteínas en 2X tampón de muestra Laemmli (+/-BME) durante 5 minutos y se resolvieron usando geles Novex al 10 o 12 % (Invitrogen). Se transfirieron los geles a Immobilon P (Millipore) como se describe por el fabricante, y se efectuó el análisis de inmunotransferencia. Se detectaron las proteínas usando el anticuerpo de ratón anti-Myc 9E10 (0,2 µg/ml) (BD Pharmingen) o el HuMab 17C7 (2 µg/ml), seguido de IgG antirratón o antihumana conjugada con peroxidasa de rábano picante (1:5000 Jackson Immunoresearch). Se incubaron las membranas con un reactivo de quimioluminiscencia potenciada (Amersham) durante 1 minuto y se expusieron a película X-Omat-AR durante diversos periodos de tiempo.

Tinción de la superficie celular

Se recogieron las células transfectadas con constructos que codifican proteína G de la rabia completa 48 horas después de la transfección y se incubaron con concentraciones variables de HuMab. Se detectó la unión de HuMab por IgG antihumana marcada con ficocitrina (Jackson) y se efectuó la citometría de flujo usando FACScan con software CellQuest (Becton Dickinson).

ELISA

Se efectuó un ELISA de captura en todos los hibridomas para identificar aquellos que creaban Ig humana. Se

recubrieron las placas de ELISA con 3 µg/ml de anticuerpos de cabra anticadena ligera kappa humana (Southern Biotech). Se lavaron las placas con tampón de lavado (PBS, 0,05 % de Tween), se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS, 1 % de BSA, 0,05 % de Tween), se lavaron y se añadieron entonces muestras a la placa (diluidas 1:2 -1:400 en tampón de bloqueo). Se detectó la unión con anticuerpo secundario IgG-AP de cabra antihumano (Jackson ImmunoResearch), se lavaron las placas y se revelaron con sal p-nitrofenilfosfato de sodio a 1 mg/ml en dietanolamina 1 M durante 20 minutos. Se leyeron las placas a 405 nm.

Se usó un ELISA de glucoproteína de captura para ensayar la interacción del HuMab 17C7 con CVS-1120-439 y ERA20-439 con optimización de codón. Se recubrieron las placas con 7,5 µg/ml de anticuerpo de ratón anti-c-Myc 9E10 (BD Pharmingen) o anticuerpo de pollo anti-c-Myc (Molecular Probes). Se incubaron las placas con glucoproteínas purificadas o lisados celulares solubilizados con detergente y se incubaron entonces con anticuerpos primarios (HuMab 17C7 y glucoproteína antirrábica de ratón R0012 (US Biological)) a 5 µg/ml. Se detectó la unión con anticuerpo secundario de cabra antihumano conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch), y se reveló entonces como se describe anteriormente.

#### Producción de virus resistentes al HuMab 17C7

Se sembraron células de neuroblastoma de ratón a  $1,5 \times 10^5$  células/ml de pocillo el día 1. El día 2, se incubaron de  $1 \times 10^1$  a  $10^8$  UFF/ml de virus de la rabia de CVS-11 con UI/ml del HuMab 17C7 (133 µg/ml) a 37 °C durante 1 hora. Se añadió la mezcla de virus/anticuerpo a las células y se incubaron durante 3-12 horas a 37 °C. Se retiró la mezcla de virus/anticuerpo de las células y se lavaron una vez las células con medio, seguido de la adición de medio reciente que contiene UI/ml del HuMab 17C7 durante 60 horas adicionales. El día 5, se retiró medio que contiene virus resistentes al HuMab 17C7 potenciales de los portaobjetos, se marcaron y se almacenaron a 4 °C. Se tiñeron entonces los portaobjetos por la presencia de células infectadas por rabia mediante incubación con una dilución 1:40 de IgG antirrábica Centicor FITC (Fujirebio Diagnostics) durante 30 minutos a 36 °C/0,5 % de CO<sub>2</sub>. Se lavaron entonces los portaobjetos y se examinaron con microscopio fluorescente (filtro FITC) a 200 aumentos. Se amplificó el virus tomado de pocillos que contenían 1-5 focos fluorescentes en células MNA durante 3 días en presencia del HuMab 17C7. Se ensayó en el virus amplificado la capacidad de infectar células MNA de forma equivalente en presencia y ausencia del HuMab 17C7. Se infectaron placas de 6 pocillos de células MNA con virus resistente al HuMab 17C7. Se extrajo el ARN de las células infectadas con virus, se sometió a transcripción inversa y se amplificó por PCR la secuencia que codifica la glucoproteína con cebadores específicos de la glucoproteína de CVS-11. Se analizaron las mutaciones en los genes que codifican la glucoproteína mediante secuenciación de la secuencia de codificación entera.

#### Seudovirus de la rabia

Se cotransfectó un esqueleto de VIH de replicación defectiva de Env y Vpr que contiene el gen de luciferasa de luciérnaga insertado en el gen *nef*, pNL4-3.Luc.R-E, con plásmidos que codifican glucoproteína de la rabia en células 293T. Se obtuvo el reactivo pNL4-3.Luc.R-E del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, y del NIH. Se recogieron partícula seudovíricas 48-72 horas después de la transfección, se concentraron 30 veces usando un concentrador Centricon (Millipore) y se congelaron a -80 °C. Se determinaron las cuentas por segundo de luciferasa de las preparaciones de seudovirus mediante dilución en serie del virus seguido de infección y detección (véase a continuación). Para los ensayos de neutralización, se incubaron aproximadamente 50.000 cuentas por segundo del seudovirus con y sin anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se aplicó entonces la mezcla de anticuerpo/virus a células HOS (nº ATCC CRL-1543), en presencia de polibreno 2 µg/ml, y se espinoculó durante 2 horas a 800G y 4 °C, seguido de incubación a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub>. Se ensayó entonces la actividad luciferasa 72 horas después de la infección usando el reactivo Bright-Glo (Promega), según el protocolo del fabricante.

#### **Ejemplos**

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

#### Ejemplo 1. Generación de anticuerpos monoclonales antiviral de la rabia

Se inmunizaron ratones transgénicos que comprenden genes de inmunoglobulina humana generados como se describe anteriormente en la sección titulada "Generación de anticuerpos monoclonales humanos en ratones HuMab" y suministrados por Medarex, Milpitas, CA, con 6 dosis de una vacuna de la rabia comercial. Se administró la vacuna en combinación con coadyuvante completo de Freund y se sometió entonces a recuerdo con vacuna de la rabia adicional y coadyuvante incompleto de Freund. La vacuna de la rabia consiste en el virus de la rabia completo que se ha inactivado y liofilizado. Se aislaron linfocitos B esplénicos del animal inmunizado y se fusionaron con células de mieloma de ratón (P3X). Se generaron hibridomas clonales y se cribaron por ELISA. Se cultivaron los hibridomas resultantes y se usó un ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA) para la detección de cadenas de anticuerpo kappa/gamma humanas para detectar los anticuerpos de IgG humanos candidatos para análisis

posterior. Se determinó adicionalmente que los clones designados 54.17C7; 108.6G11; 35.5G5.1E12.149; 35.2B10.1G11.3FG y 35.1E51G1.4CB, a los que se hace referencia en la presente memoria como, respectivamente, clones 17C7, 6G11, 5G5, 2B10 y 1E5, se unen específicamente a glucoproteína G del virus de la rabia por un ensayo ELISA específico de antígeno. Además, se seleccionaron estos cinco clones de hibridoma y se determinó que neutralizan la infección por rabia de células neuronales de ratón en un ensayo de RFFIT frente a una serie de diferentes aislamientos de la rabia (véase el ejemplo 3).

En consecuencia, se amplificaron los ADNc de clones ejemplares por PCR-TI a partir de ARNm, se clonaron y se secuenciaron. Se encontró una secuencia de consenso de la región V de cadena pesada para cada clon (Tabla 7). Los cinco clones utilizaban una región de VH derivada de uno de dos genes de la región V de línea germinal, pero utilizaban diferentes secuencias de J. Se muestran en las figuras 1-2 las secuencias aminoacídicas de las regiones VH y VL de los clones ejemplares 17C7 y 6G11 (SEQ ID NO: 1, 2, 15 y 16). Las regiones determinantes de la complementariedad (concretamente, CDR1, CDR2 y CDR3) se indican para las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpo (SEQ ID NO: 3-8; 17-22). Se clonó ADN que codifica la porción de unión a antígeno de cada clon en un vector para expresar como anticuerpo humano para administración a seres humanos. Se proporcionan las secuencias de ácido nucleico y aminoacídica para las cadenas ligera y pesada de los clones de anticuerpo 17C7 y 6G11 en el listado de secuencias (respectivamente, SEQ ID NO: 9-12 y SEQ ID NO: 23-26).

Tabla 7. Clones de anticuerpo y composición génica

| HuMab    | Referencia de clon                  | Genotipo del ratón HuMAb |                                     |               |             |
|----------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|---------------|-------------|
| 54.17C7  | 17C7                                | Hco12 hembra             |                                     |               |             |
| 108.6G11 | 6G11                                | Hco7 macho               |                                     |               |             |
| 35.5G5   | 5G5                                 | Hco7 macho               |                                     |               |             |
| 35.1E5   | 1E5                                 | Hco7 macho               |                                     |               |             |
| 35.2B10  | 2B10                                | Hco7 macho               |                                     |               |             |
| HuMab    | Región variable de la cadena ligera |                          | Región variable de la cadena pesada |               |             |
| 54.17C7  | VK:IGKV3-11*01                      | JK:IGKJ4*01              | VH:IGHV3-30-3*01                    | D:IGHD3-3*01  | JH:IGHJ4*02 |
| 108.6G11 | VK:IGKV1-13*02                      | JK:IGKJ2*02              | VH:IGHV3-33*05                      | D:IGHD6-13*01 | JH:IGHJ4*02 |

(\*Nomenclatura de IMGT usada para la tabla anterior)

Ejemplo 2. Actividad de unión de anticuerpos antivirales de la rabia

Se determinó la unión de cada anticuerpo al virus de la rabia, en particular glucoproteína G del virus de la rabia, mediante ELISA usando técnicas estándares. Puede medirse también la afinidad de los anticuerpos antivirales de la rabia por la glucoproteína G del virus de la rabia con un instrumento Biacore®, que detecta las interacciones de unión biomolecular con tecnología de resonancia de plasmón de superficie. Se añade cada anticuerpo a chips sensores recubiertos con proteína A y se deja fluir glucoproteína G del virus de la rabia sobre el chip para medir la unión. Pueden determinarse constantes de unión en el intervalo de  $K_D$   $1 \times 10^{-6}$  M,  $K_D$   $1 \times 10^{-7}$  M,  $K_D$   $1 \times 10^{-8}$  M,  $K_D$   $1 \times 10^{-9}$  M,  $K_D$   $1 \times 10^{-10}$  M,  $K_D$   $1 \times 10^{-11}$  M,  $K_D$   $1 \times 10^{-12}$  M y mayores (o intermedias o intervalos de las mismas). Los anticuerpos antivirales de la rabia con constantes de unión favorables indican que los anticuerpos tienen afinidades adecuadas para uso en terapia humana.

Se determinó por análisis Biacore que el anticuerpo 17C7, cuando se ensayó en la región del ectodominio de una glucoproteína G de la rabia (con optimización de codón), tenía una afinidad de unión de al menos  $1,36 \times 10^{-8}$  M.

Ejemplo 3. Neutralización del virus de la rabia por anticuerpos antivirales de la rabia

Se ensayó la actividad de neutralización del virus de la rabia *in vitro* de anticuerpos expresados por los hibridomas 17C7, 6G11, 5G5, 2B10 y 1E5 en una serie de experimentos (véanse las Tablas 8-11 siguientes).

Específicamente, se determinó la actividad neutralizante de la rabia usando el ensayo de inhibición rápida del foco fluorescente (RFFIT), que detecta la infección por virus de la rabia de células de neuroblastoma de ratón usando anticuerpos marcados fluorescentemente. El ensayo de RFFIT es un ensayo estandarizado que se usa por expertos médicos y de salud pública para determinar la potencia de una preparación de anticuerpo dado para neutralizar el virus de la rabia (concretamente, inhibir su capacidad de infectar células). El ensayo se efectúa típicamente usando un virus fijo (CVS11), pero puede realizarse también usando aislamientos de animales infectados. El ensayo se realiza mediante la adición de una cantidad estándar de virus con y sin diluciones de anticuerpo a monocapas de células de neuroblastoma de ratón. Se incuban las monocapas y se detectan entonces los focos de células de neuroblastoma infectadas usando un anticuerpo monoclonal antinucleoproteína de la rabia marcado fluorescentemente. Los focos se visualizan y se cuentan usando microscopía fluorescente. Se reseñan los

5 resultados posteriores como concentración de anticuerpo (dilución) en que el número de campos microscópicos sin focos fluorescentes es de 50 %. Todos los ensayos incluyen una preparación de inmunoglobulina de la rabia estándar (SRIG) para comparación. Se ensayaron los anticuerpos monoclonales antirrábicos humanos 17C7, 6G11, 5G5, 2B10 y 1E5 frente a un panel de aislamiento del virus de la rabia de importancia en salud pública de diversos animales vertebrados de América del Norte.

10 La Tabla 8 muestra los resultados de los ensayos de neutralización *in vitro* de anticuerpos seleccionados, en comparación con las terapias actuales (concretamente, suero antirrábico humano, "SRIG") frente a un panel de aislamientos de virus de la rabia. Los números indican la dilución en veces en que un anticuerpo puede diluirse y seguir exhibiendo una actividad de neutralización del 50 %, concretamente, la capacidad de bloquear la infección por virus de la rabia de células de neuroblastoma de murino *in vitro*. Los resultados para 17C7 a una concentración mayor frente a aislamientos seleccionados se muestran en el panel inferior.

Tabla 8. Resultados de neutralización de cepa

| Virus de la rabia                                    | SRIG | Sobrenadante de 17C7 o 2 mg/ml* | 6G11 1 mg/ml | 5G5 2 UI/ml o 1 mg/ml* | 1E5 2 UI/ml o 1 mg/ml* | 2B10 2 UI/ml o 1 mg/ml* |
|--|------|---------------------------------|--------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| CVS-11   | 145  | 1100                            | 230          | ≥1400*                 | ≥1400*                 | ≥1400*                  |
| ERA  | 85   | >1400                           | ≥1400        | 230                    | 250                    | 230                     |
| Virus de Pasteur                                     | 17   | >1400                           | 1100         | 95                     | 145                    | 65                      |
| Mapache, SE, EE.UU.                                  | 110  | >1400                           | 1300         | ≥1400*                 | ≥1400*                 | ≥1400*                  |
| Zorro gris, TX                                       | 54   | >1400                           | 1100         | 95                     | 95                     | 110                     |
| Zorro gris, AZ                                       | 50   | >1400                           | 1300         | 480                    | 480                    | 230                     |
| Zorro ártico, AK                                     | 54   | >1400                           | 1200         | 1000*                  | 800*                   | ≥1400*                  |
| Coyote, TX   | 95   | >1400                           | 1200         | 60                     | 60                     | 60                      |
| Perro/coyote, TX                                     | 50   | >1400                           | 1100         | 60                     | 60                     | 75                      |
| Mofeta, centro norte                                 | 170  | 200                             | 210          | 230                    | 250                    | 270                     |
| Mofeta, centro sur                                   | 54   | >1400                           | ≥1400        | 1300*                  | ≥1400*                 | ≥1400*                  |
| Mofeta, CA   | 29   | >1400                           | 800          | 1300*                  | 1200*                  | ≥1400*                  |
| Murciélago, <i>Lasiurus borealis</i> , TN            | 42   | 320*                            | <5           | <5*                    | <5*                    | 7*                      |
| Murciélago, <i>Eptesicus fuscus-Myotis spp.</i> , CO | 95   | 625                             | 200          | 70                     | 95                     | 60                      |
| Murciélago, <i>Myotis spp.</i> , WA                  | 50   | >1400                           | 700          | ≥1400*                 | ≥1400*                 | ≥1400*                  |
| Murciélago, <i>Lasiurus cinereus</i> , AZ            | 25   | 270*                            | <5           | <5*                    | <5*                    | 85*                     |
| Murciélago, <i>Pipistrellus subflavus</i> , AL       | 29   | 390                             | 13           | 36                     | 45                     | 36                      |
| Murciélago, <i>Tadarida brasiliensis</i> , AL        | 50   | ≥1400                           | 125          | 180                    | 210                    | 125                     |
| Murciélago, <i>Lasionycteris noctivagans</i> , WA    | 42   | ≥1300                           | 36           | 40                     | 25                     | 60                      |
| Murciélago, <i>Eptesicus fuscus</i> , PA             | 11   | ≥1400                           | <5           | 11                     | 16                     | 29                      |
| Mangosta, NY/Puerto Rico                             | 230  | ≥1400                           | ≥1400        | 320                    | 390                    | 250                     |
| Perro, Argentina                                     | 54   | ≥1400                           | ≥1400        | 1300*                  | 1200*                  | 1300*                   |



|                                 |    |        |       |    |    |    |
|---------------------------------|----|--------|-------|----|----|----|
| Perro, Sonora                   | 56 | ≥1400  | ≥1400 | 19 | 33 | 56 |
| Perro, Gabón                    | 54 | ≥1400  | ≥1400 | 45 | 19 | 50 |
| Perro, Tailandia                | 56 | ≥1400  | ≥1400 | 17 | 14 | 40 |
| Lisavirus no rábicos            |    |        |       |    |    |    |
| Lagos                           | <5 | <5*    | nd    | nd | nd | nd |
| Mokola                          | <5 | <5*    | nd    | nd | nd | nd |
| Duvenhage                       | 13 | <5*    | nd    | nd | nd | nd |
| Virus de murciélago europeo 1   | 42 | <5*    | nd    | nd | nd | nd |
| Virus de murciélago europeo 2   | 40 | <5*    | nd    | nd | nd | nd |
| Virus de murciélago australiano | 54 | >1400* | nd    | nd | nd | nd |

Inicialmente, se cribó en cada uno de los HuMAb la capacidad de neutralizar la cepa de CVS-11 del virus de la rabia. Se ensayaron entonces más extensamente los HuMAb neutralizantes frente a un amplio panel de aislamientos de importancia en salud pública de América del Norte y del Sur, Europa, África y Asia. Notablemente, el HuMAb 17C7 neutralizaba la mayoría de aislamientos de virus de la rabia en contraposición con los HuMAb 2B10 y 5G5 (Tabla 8). Se determinó el título del criterio de valoración de 50% de neutralización para uno de los virus de la rabia de la calle, aislado de una mofeta en California, EE.UU (mofeta-CA). El título calculado para el HuMAb 17C7 (la concentración ensayada era de 0,03 mg/ml) frente a mofeta de California era de 1:12.898, lo que demuestra que el HuMAb 17C7 neutraliza potentemente este virus de la calle.

Para entender mejor cómo la potencia de un solo anticuerpo monoclonal se compara con el hRIG policlonal, se ensayaron el HuMAb 17C7 y hRIG a idénticas concentraciones de anticuerpo en un ensayo de RFFIT usando el virus de la rabia de CVS-11. El título del criterio de valoración de 50 % para hRIG era de 1:224, mientras que para el HuMAb 17C7 era de 1:7029 (figura 4). Por lo tanto, el HuMAb 17C7 inhibía la infección por CVS-11 más potentemente que hRIG a concentraciones de anticuerpo equivalentes. Estos experimentos iniciales revelaron que el HuMAb 17C7 era capaz de neutralizar muchos aislamientos de virus de la rabia, y que la extensión de la neutralización estaba en el intervalo desde la potente neutralización del aislamiento de mofeta de CA, a una dosis de anticuerpo baja (0,03 µg/ml; 1:12.898) en comparación con la neutralización menos potente de CVS-11 a la dosis de anticuerpo mayor (2 mg/ml; 1:7029).

Se realizó un ensayo repetido usando 17C7 purificado a concentraciones variables frente a aislamientos de la rabia que no mostraban inicialmente neutralización en el ensayo de RFFIT sobre sobrenadantes de hibridoma (*Lasiurus borealis*, TN y *Lasiurus cinereus*, AZ) y se demostró capaz de neutralizar ambos virus en el ensayo repetido. Estos datos implican que el HuMAb 17C7 interacciona con un epítipo neutralizante en la glucoproteína de la rabia de aislamientos de *L. borealis*-TN y *L. cinereus*-AZ (Tabla 9).

Tabla 9. Criterio de valoración de 50 % de neutralización (título recíproco) de los HuMAb 2B10, 17C7 y 5G5 en RFFIT frente a virus de la rabia aislado de murciélagos norteamericanos (*Lasiurus borealis* y *cinereus*)

| Aislamiento de la rabia                      | hRIG (2 UI/ml) | 17C7 (2 mg/ml) | 2B10 (1,5 mg/ml) | 5G5 (1 mg/ml) |
|--|----------------|----------------|------------------|---------------|
| Murciélago,<br><i>Lasiurus borealis</i> , TN | 42             | 320            | 7                | <5            |
| Murciélago,<br><i>Lasiurus cinereus</i> , AZ | 25             | 270            | 85               | <5            |

Se ensayó también la capacidad del clon HuMAb 17C7 de neutralizar lisavirus no de rabia. Los lisavirus no son un problema de salud pública mundial significativo, pero han causado enfermedades mortales en un pequeño número de casos humanos. Estos incidentes, así como la prevalencia de algunos lisavirus en reservorios de vida silvestre, han conducido a un reciente interés de si los agentes biológicos de la rabia protegen frente a lisavirus no de rabia. El HuMAb 17C7 era capaz de neutralizar potentemente el lisavirus de murciélago australiano cuando se ensayaba en un ensayo de RFFIT modificado. El título calculado para el HuMAb 17C7 (la concentración ensayada era 2 mg/ml) frente a lisavirus de murciélago australiano era mayor de 1:1400, lo que demuestra que el HuMAb 17C7 neutraliza el lisavirus de murciélago australiano (Tabla 10).

Tabla 10. Criterio de valoración de 50 % de neutralización (título recíproco) del HuMab 17C7 en RFFIT frente a lisavirus

| Lisavirus                           | hRIG (2 UI/ml) | HuMab 17C7 (2 mg/ml) |
|-------------------------------------|----------------|----------------------|
| Rabia (CVS-11)                      | 270            | <1400                |
| Lagos                               | <5             | <5                   |
| Mokola                              | <5             | <5                   |
| Duvenhage                           | 13             | <5                   |
| Lisavirus de murciélago europeo 1   | 42             | <5                   |
| Lisavirus de murciélago europeo 2   | 40             | <5                   |
| Lisavirus de murciélago australiano | 54             | >1400                |

5 Estos datos muestran que los anticuerpos monoclonales antirrábicos eran capaces de neutralizar aislamientos del virus de la rabia de una variedad de animales vertebrados de América del Norte de importancia en salud pública en el ensayo de RFFIT.

#### Ejemplo 4. Cartografía epitópica de anticuerpos antiglucoproteína G del virus de la rabia

10 Se determinó el epítipo de la glucoproteína G de virus de la rabia unido a cada anticuerpo monoclonal mediante ensayos de inmunotransferencia e inmunoprecipitación (véase la figura 3).

15 Se construyó un gen de glucoproteína G del virus de la rabia con optimización de codón humano sintético completo a partir del aislamiento de virus de la rabia de ERA usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e ingeniería genética. Se clonaron el gen y derivados de delección en pCDNA3.1A (Invitrogen) para expresión en células 293T humanas. Se llevaron a cabo los experimentos de inmunotransferencia e inmunoprecipitación usando técnicas estándares. Los resultados usando glucoproteína G del virus de la rabia expresada recombinantemente mostraron que el anticuerpo monoclonal humano 17C7 se cartografiaba en un epítipo en los aa 19-422 NH<sub>3</sub> terminales del ectodominio de la glucoproteína G de la rabia. Los clones monoclonales humanos 5G5, 2B10 y 1E5 no reaccionaban en inmunotransferencias con fragmentos de glucoproteína G soluble.

20 Para ensayar adicionalmente la interacción del HuMab 17C7 con glucoproteínas de la rabia *in vitro*, se clonaron y expresaron glucoproteínas del virus de la rabia de una variedad de cepas y aislamientos de virus de la rabia. Se clonó y expresó inicialmente la glucoproteína de CVS-11 de tipo silvestre a partir del vector de expresión de mamíferos pcDNA3.1 Myc/His (Invitrogen), pero a bajos niveles en células humanas transfectadas. Para superar este bajo nivel de expresión, se genomanipuló una versión con optimización de codón del gen que codifica la glucoproteína de la rabia de ERA (*era-co*) usando técnicas reconocidas en la materia. Se clonaron también otras proteínas G (ERA (*era-n*), un aislamiento de mofeta de California, EE.UU. (*mofeta-ca*), y los aislamientos de murciélago *I. borealis-tn* y *I. cinereus-az*). La optimización de codón del gen que codifica la glucoproteína de ERA condujo a un marcado aumento del nivel de expresión en comparación con la glucoproteína de ERA de tipo silvestre (figura 5A), y sirvió como reactivo útil para muchos experimentos posteriores.

35 Se determinó que el HuMab 17C7 inmunoprecipita las glucoproteínas de células solubilizadas transfectadas con aislamientos de *era-co* (no mostrado), *era-n*, *skunk-ca*, *I. borealis-tn* y *I. cinereus-az* (figura 5B). Usando citometría de flujo, se mostró adicionalmente que el HuMab 17C7 se une también de forma dependiente de la dosis a células que expresan las glucoproteínas ERA-CO, ERA-N, *L. borealis-TN* y *L. cinereus-AZ* sobre su superficie celular (figuras 5C y D). Estos datos muestran que el HuMab 17C7 se une específicamente a glucoproteínas del virus de la rabia de múltiples cepas y aislamientos.

40 Para caracterizar mejor el epítipo que reconoce el HuMab 17C7, se ensayó 17C7 y se determinó que reconocía una versión soluble de la glucoproteína de la rabia (aminoácidos 20-439) que no poseía los dominios citoplasmáticos ni transmembrana de la glucoproteína. Se determinó también que el HuMab 17C7 reconocía una forma secretada soluble de la glucoproteína de ERA (ERA-CO 20-439) y la glucoproteína de CVS-11 (CVS-11 20-439) que cubre los aminoácidos 20-439 en ELISA (figura 6A). Sorprendentemente, el HuMab 17C7 reconocía ERA-C.O 20-439 y ERACO desnaturalizadas en gel PAGE-SDS después de incubación en tampón de muestra que contiene agentes reductores y SDS. Sin embargo, la robustez de la señal se potenciaba en gran medida cuando las muestras se preparaban sin la adición de agentes reductores (figura 6B).

50 Este reconocimiento en PAGE-SDS no se observó para la glucoproteína CVS-11 20-439 sin agentes reductores (figura 6C). Estos datos indican que el HuMab 17C7 reconoce un epítipo discontinuo en la glucoproteína de la rabia de ERA. El HuMab 17C7 reconoce el sitio secundario a y el sitio antigénico III de la glucoproteína del virus de la rabia.

Para entender mejor cuáles regiones de la glucoproteína de la rabia se reconocen por el HuMab 17C7, se genomanipularon virus de la rabia capaces de crecer en presencia del HuMab 17C7. Para crear virus resistentes al HuMab 17C7, se adaptaron a cultivo celular una cepa CVS-11 y el aislamiento de mofeta-CA. Se aislaron virus resistentes al HuMab 17C7 a partir de soluciones madre del virus de CVS-11. El análisis de las secuencias que codifican la glucoproteína de estos virus derivados de CVS-11 reveló 3 mutaciones puntuales en los 8 virus analizados (CVS1 a 8). De forma interesante, en dos casos se identificaron cambios aminoacídicos en la asparagina 336. Un virus contenía un cambio de Asn a Lys y múltiples virus contenían un cambio de Asn a Asp. Dos de los virus contenían un cambio de Asn a Asp en 336, así como un cambio de Gln a Lys en 426. La asparagina 336 está dentro de la región identificada anteriormente como parte del sitio antigénico III (Tabla 11).

Para abordar si la asparagina 336 era un residuo crítico para la unión del HuMab 17C7, se mutó un residuo de asparagina 336 en el constructo ERA-CO a los observados en los virus resistentes derivados de CVS-11. La glucoproteína de ERA, como se describe en las figuras 5 y 6, se reconoce robustamente por el HuMab 17C7; y el virus de ERA, que es altamente similar a la secuencia de glucoproteína de mofeta-CA, se neutraliza potentemente también por el HuMab 17C7 en comparación con CVS-11. Por lo tanto, en este conjunto de experimentos, se mostró que el residuo Asp 336 era importante para la neutralización por HuMab 17C7 del virus de CVS-11 y era también importante para el mantenimiento del epítipo de HuMab 17C7 en la glucoproteína de ERA. Se expresaron la glucoproteínas mutadas ERA-CO N336K y ERA-CO N336D y se ensayó el reconocimiento por HuMab 17C7. Se reconocieron las glucoproteínas mutantes por HuMab 17C7 en un ELISA, sin embargo, la unión de HuMab 17C7 a la glucoproteína ERA-CO N336K estaba reducida en gran medida en comparación con el tipo silvestre (figura 7A). Los niveles de glucoproteína de tipo silvestre y mutante capturada en el ensayo ELISA eran similares, como se muestra por la unión comparable de un anticuerpo monoclonal antiglucoproteína de la rabia de ratón (figura 7A). Las glucoproteínas mutantes eran todas de los pesos moleculares apropiados, como se muestra por inmunoprecipitación usando el marcaje His, seguido de análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo de marcaje Myc (figura 7B). El HuMab 17C7 inmunoprecipitaba las glucoproteínas ERA-CO y ERA-CO N336D más fácilmente que la glucoproteína ERA-CO N336K (figura 7B), lo que es consistente con la unión reducida de ERA-CO N336K observada en el ELISA. En contraposición con la ERA-CO de tipo silvestre, las proteínas mutantes no se reconocían en transferencia Western en condiciones no reductoras (figura 7B). Se crearon también ERA-CO N336D Q426K y ERA Q426K, y los resultados de ELISA e inmunotransferencia fueron similares a los de ERA-CO N336D y ERA-CO Q426K, respectivamente, revelando que la mutación Q426K no afectaba a la unión del HuMab 17C7.

Para abordar si el reconocimiento por el HuMab 17C7 se correlacionaba con la actividad de neutralización, se creó un pseudovirus de VIH-1 seudotipado con glucoproteína de la rabia (10, 20) usando la glucoproteína ERA-CO. Se observó que estas partículas seudovíricas infectaban células humanas (figura 8A), y que el HuMab 17C7 inhibía potentemente la infección por pseudovirus de ERA-CO de tipo silvestre, mostrando una inhibición significativa hasta 100 pM (figura 8B). Se ensayaron HuMab no de rabia no relacionados a 1000 nM y no neutralizaban pseudovirus de la rabia. De forma interesante, el HuMab 17C7 inhibía también la infección de los pseudovirus ERA-CO N336K y ERA-CO N336D (figura 8C), consistentemente con la observación de que el HuMab 17C7 reconoce las glucoproteínas ERA-CO N336K y ERA-CO N336D.

De forma similar al HuMab 17C7, el hRIG inhibía también todos los pseudovirus de la rabia de manera dependiente de la dosis (figura 8D). Estos datos demuestran que las mutaciones que vuelven el virus de CVS-11 inmune a la neutralización por HuMab 17C7 reducen, pero no anulan, el reconocimiento por el HuMab 17C7 de la glucoproteína de ERA y la neutralización del pseudovirus de ERA.

Para ensayar si otros sitios antigénicos bien caracterizados eran reconocidos por el HuMab 17C7, se creó un panel de glucoproteínas mutantes que contenían cambios aminoacídicos reseñados anteriormente para virus resistentes a mAb alterados en residuos que afectan a los sitios antigénicos I, II, III y sitio secundario a (Tabla 11). El HuMab 17C7 inmunoprecipitaba fácilmente todas las glucoproteínas mutantes de los lisados celulares, con la excepción de la glucoproteína R333I, K342T, G343E, que estaba mutada en una porción del sitio antigénico III (aa 333) y el sitio secundario a (aa 342 y 343). Se caracterizó adicionalmente el determinante importante para la unión del HuMab 17C7 creando un mutante R333I de sitio III separado y un mutante K342T, G343E de sitio secundario a. El mutante R333I del sitio III se reconoció por el HuMab 17C7 en ELISA e inmunotransferencia, mientras que los mutantes K342T, G343E del sitio secundario a y R333I, K342T, G343E del sitio III/sitio secundario a eran peor reconocidos (figura 9A y B). Los mutantes K342T, G343E y R333I, K342T, G343E eran reconocidos por un anticuerpo monoclonal de la rabia comercial (figura 9A), y eran del peso molecular apropiado (figura 9B), indicando que las glucoproteínas se expresaban a niveles comparables. Por lo tanto, se determinó que la falta de unión del HuMab 17C7 a mutantes del sitio secundario a era debida a mutaciones en los aminoácidos 342 y 343 de la glucoproteína, demostrando que estos aminoácidos son importantes para el reconocimiento por HuMab 17C7 de la glucoproteína de la rabia (Tabla 12).

Además, se compararon las secuencias de glucoproteína de aislamientos del virus de la rabia y lisavirus no de rabia en los aminoácidos 336, 342 y 343. Los residuos importantes para el HuMab 17C7 se conservan entre cepas divergentes de virus de la rabia y lisavirus de murciélago australiano, pero no otros lisavirus (Tabla 13). Se compararon las secuencias de glucoproteína de 154 virus de la rabia de aislamientos de seres humanos, murciélagos y carnívoros de todo el mundo, incluyendo América del Norte y del Sur, China e India. La comparación

de secuencias reveló que la asparagina 336 estaba conservada un 93 %, la lisina 342 estaba conservada un 98 % y la glicina 343 estaba conservada un 99 %. Estos datos indican que los residuos importantes para el reconocimiento por HuMab 17C7 de glucoproteína del virus de la rabia están altamente conservados.

5 Tabla 11. Virus resistentes al HuMab 17C7

| Virus  | Número de aminoácidos | Cambio de aminoácido | Cambio de codón | Proximidad al sitio antigénico |
|--------|-----------------------|----------------------|-----------------|--------------------------------|
| CVS11  | 336                   | Asn a Lys            | AAT a AAG       | III                            |
| CVS2-6 | 336                   | Asn a Asp            | AAT a GAT       | III                            |
| CVS7-8 | 336                   | Asn a Asp            | AAT a GAT       | III                            |
| CVS7-8 | 426                   | Glu a Asp            | CAG a AAG       | N/A                            |

Tabla 12. El HuMab reconoce glucoproteínas mutadas en el sitio I y el sitio II

| Mutaciones en glucoproteína recombinante | Unión del HuMab 17C7 | Sitios antigénicos |
|--|----------------------|--------------------|
| R333I                                    | +                    | III                |
| K342T, G343E                             | -                    | Secundario a       |
| R333I, K342T, G343E                      | -                    | Secundario a y III |
| K226E, L231P                             | +                    | I                  |
| G34E                                     | +                    | II                 |
| G40V, S42P, M441                         | +                    | II                 |
| K198E                                    | +                    | II                 |

Tabla 13. Aminoácidos 330-345 de virus de la rabia y otros lisavirus

| Virus                 | ID de Genbank | Aminoácidos 330-345 |
|-----------------------|---------------|---------------------|
| CVS-11                | AF085333      | KSVRTWNEIIPSKGCL    |
| <i>ERA-CO</i>         | AF406693      | KSVRTWNEILPSKGCL    |
| <i>Mofeta-CA</i>      | N/A           | KSVRTWNEILPSKGCL    |
| <i>L. borealis-TN</i> | N/A           | KSVKTWNEVIPSKGCL    |
| <i>L. cinereus-AZ</i> | N/A           | KSVKTWNEVIPSKGCL    |
| <i>ERA nativa</i>     | N/A           | KSVRTWNEIIPSKGCL    |
| <i>ABLV</i>           | AF406693      | KSVRTWNEIIPSKGCL    |
| <i>EBLV-1</i>         | AF298143      | KSVREWTEVIPSKGCL    |
| <i>EBLV-2</i>         | AF298145      | KSIREWTDVIPSKGCL    |
| <i>Lagos</i>          | AF429312      | LKVDNWSEILPSKGCL    |
| <i>Mokola</i>         | MVU17064      | KRVDRWADILPSRGCL    |

10 El HuMab 17C7 reconoce un epítipo discontinuo debido a su capacidad de unirse con mayor reactividad con proteína no reducida. La interacción del HuMab 17C7 con glucoproteína de la rabia es también única, porque es capaz de inmunoprecipitar glucoproteínas unidas a membrana de una variedad de aislamientos de la rabia, y de neutralizar todos estos aislamientos, pero solo es capaz de interactuar con un subconjunto de glucoproteínas secretadas solubles en ELISA e inmunotransferencias.

20 El reconocimiento de proteína no reducida por el HuMab 17C7 indica que el sitio antigénico II, sitio secundario a o determinante conformacional desconocido de la glucoproteína de la rabia es importante para el reconocimiento por el HuMab 17C7. El análisis de las glucoproteínas mutantes reveló que 2 cambios aminoácidos en el sitio secundario a reducían drásticamente el reconocimiento por el HuMab 17C7 de la glucoproteína de la rabia. Estos dos cambios aminoácidos desestabilizaban el sitio de unión de HuMab 17C7 a la glucoproteína de la rabia y/o daban como resultado una modificación de la estructura terciaria de la glucoproteína de la rabia crítica para la unión del HuMab 17C7.

Estos datos muestran que los virus resistentes al HuMab 17C7 indican que la asparagina 336 es importante para la neutralización por HuMab 17C7. El cambio de aminoácido en el residuo 336 desestabiliza el sitio de unión del HuMab 17C7 a la glucoproteína de la rabia y/o da como resultado una modificación de la estructura de la glucoproteína de la rabia crítica para la unión del HuMab 17C7.

5 El análisis de las glucoproteínas mutantes creadas por mutagénesis dirigida a sitio reveló también que el HuMab 17C7 reconoce tanto el sitio secundario a como parte del sitio antigénico III.

10 Tomados en conjunto, estos resultados indican que el HuMab 17C7 reconoce un epítopo que está ampliamente conservado. La amplia reactividad cruzada del HuMab 17C7 indica que puede usarse en lugar de RIG para profilaxis postexposición.

Ejemplo 5. Protección de hámsteres ante provocación con virus de la rabia letal mediante la administración de anticuerpos antivirales de la rabia

15 Se ensayó la capacidad de los anticuerpos de proteger a hámsteres ante la provocación con una dosis letal de virus de la rabia (véanse las Tablas 14-15).

20 Se ensayó también el anticuerpo monoclonal humano 17C7 en un modelo de hámster de profilaxis postexposición (PPE) para determinar su potencial como profilaxis para infección por el virus de la rabia en seres humanos. Se provocaron los hámsteres en el músculo gastrocnemio de la pata trasera con una dosis letal de virus de la rabia. Se aisló originalmente el virus de provocación de un coyote de Texas. En este modelo, los animales no tratados mueren por la infección del virus de la rabia en menos de dos semanas.

25 Brevemente, se provocaron los animales en el músculo gastrocnemio con 50 µl de virus de la rabia y se les procuraron anticuerpos antivirales de la rabia en el mismo sitio 24 horas después. Se trataron los animales (n= 9) con una dosis única de 19 mg/kg de inmunoglobulina derivada de suero de la rabia humano comercialmente disponible (HRIG, Imogam, Aventis) o anticuerpo monoclonal humano 17C7 a diversas dosis (5, 0,5 o 0,25 mg/kg). Todos los animales del grupo de provocación no tratado murieron de rabia al cabo de 2 semanas de la provocación. El porcentaje de supervivencia a los 63 días después de la provocación mostró una mejor protección por el anticuerpo monoclonal a una dosis de 0,25 mg/kg que la inmunoglobulina humana comercialmente disponible (Tabla 14).

30 Se realizó un experimento similar en que se trataron animales con anticuerpo postexposición a la rabia y, además, se trataron con vacuna de la rabia. Se administró vacuna humana comercial en el músculo gastrocnemio opuesto al sitio de provocación a un volumen de inyección de 50 µl 1, 3, 7, 14 y 28 días después de la provocación con la rabia. Se administraron los anticuerpos como se describe anteriormente. De nuevo, el porcentaje de supervivencia a los 53 días después de la provocación mostró una mejor protección por el anticuerpo monoclonal a una dosis de 0,125 mg/kg que la inmunoglobulina humana comercialmente disponible (Tabla 15).

40 Se administró anticuerpo solo y con vacuna y los resultados mostrados en las Tablas 14-15 demuestran que los hámsteres provocados con una dosis letal de virus de la rabia pueden protegerse con anticuerpos de la invención procurados después de la exposición al virus solo (véase la Tabla 14) o junto con la administración de una vacuna de la rabia (Tabla 15).

45 Para demostrar que 17C7 no interfiere con la respuesta de vacuna, se procuraron a los hámsteres 17C7 y vacuna de la rabia. Como se muestra en la Tabla 16, los animales respondieron a la vacuna incluso cuando se procuró 17C7, demostrado así que el anticuerpo 17C7 no interfiere con la respuesta de vacuna.

Tabla 14. Protección postexposición a la rabia con un anticuerpo monoclonal humano<sup>a</sup>

|   | Muestra                         | UI/kg | Mg/kg | Supervivencia |
|---|---------------------------------|-------|-------|---------------|
| A | Inmunoglobulina de rabia humana | 15    | 8,0   | 5/9           |
| B | Inmunoglobulina de rabia humana | 6     | 4,0   | 4/9           |
| C | Inmunoglobulina de rabia humana | 1     | 0,4   | 0/9           |
| D | Inmunoglobulina de rabia humana | 0,05  | 0,0   | 0/9           |
| E | HuMoAb 17C7                     | 26    | 1,7   | 9/9           |
| F | HuMoAb 17C7                     | 7     | 0,9   | 9/9           |
| G | HuMoAb 17C7                     | 1     | 0,1   | 6/9           |
| H | HuMoAb 17C7                     | 0,05  | 0,0   | 1/9           |
| I | Controles                       | -     | -     | 0/9           |

50 <sup>a</sup> A las 24 h después de la inoculación de un aislamiento de virus de la rabia de coyote de Texas (nº 323), se inició la

profilaxis en 8 grupos de tratamiento de 9 animales cada uno con anticuerpo monoclonal humano 17C7 (26 UI/kg; 7 UI/kg, 1 UI/kg o 0,05 UI/kg) o inmunoglobulina de la rabia humana comercial (15 UI/kg, 6 UI/kg, 1 UI/kg o 0,05 UI/kg), administrados en el sitio de inoculación del virus. El grupo de control no tratado consistía en 9 animales.

5 Tabla 15. Profilaxis postexposición a rabia que incluye vacuna: comparación de un anticuerpo monoclonal humano con inmunoglobulina de la rabia humana<sup>a</sup>

| Muestra |                                 | UI/kg | Mg/kg | Supervivencia a los 90 d |
|---------|---------------------------------|-------|-------|--------------------------|
| A       | Inmunoglobulina de rabia humana | 20    | 21    | 17/18                    |
| B       | Anticuerpo monoclonal humano    | 20    | 1     | 17/18                    |
| C       | Anticuerpo monoclonal humano    | 10    | 0,5   | 16/18                    |
| D       | Anticuerpo monoclonal humano    | 2     | 0,1   | 16/18                    |
| E       | Controles                       | -     | -     | 0/18                     |

<sup>a</sup> A las 24 h después de la inoculación del virus de la rabia (50 µl de un homogeneizado de glándula salivar 1:1000 (10<sup>6,8</sup> MICLD<sub>50</sub>/ml) de un coyote infectado naturalmente (aislamiento de virus de la rabia de coyote de Texas nº 323)), se inició la profilaxis en 4 grupos de tratamiento (A-D) de 18 hámsteres cada uno con anticuerpo monoclonal humano 17C7 (20 UI/kg; 10 UI/kg o 2 UI/kg) o inmunoglobulina de la rabia humana comercial (20 UI/kg), administrados en el sitio de inoculación del virus. Se administró un volumen de 50 µl de vacuna de la rabia comercial en el músculo gastrocnemio izquierdo. Se administraron dosis adicionales de vacuna los días 3, 7, 14 y 28. El grupo de control no tratado consistía en 18 animales.

15 Tabla 16. Media geométrica de títulos de anticuerpos neutralizantes de virus de la rabia después de combinaciones de virus de la rabia y anticuerpo

| Grupos                         | Día  |       |             |              |             |
|--------------------------------|------|-------|-------------|--------------|-------------|
|                                | 3    | 7     | 14          | 28           | 42          |
| Ig de la rabia humana + vacuna | 15   | 26    | 1.315       | 10.013       | 5.878       |
| ± desv. est.                   | 9-26 | 13-50 | 1.241-1.393 | 3.730-26.783 | 4.293-8.049 |
| huMoAb B + vacuna              | 12   | 22    | 339         | 4.442        | 6.704       |
| ± desv. est.                   | 8-17 | 11-45 | 129-8.889   | 2.754-7.158  | 6.257-7.189 |
| huMoAb C + vacuna              | 10   | 17    | 404         | 9.304        | 5.812       |
| ± desv. est.                   | 9-11 | 9-31  | 181-900     | 1.186-21.378 | 4.708-7.161 |

<sup>a</sup> Tres grupos de tratamiento (A-C) de animales recibieron anticuerpo monoclonal 17C7 (25 UI/kg (grupo B) o 15 UI/kg (grupo C)) o inmunoglobulina de la rabia humana comercial (25 UI/kg) administrados por vía intramuscular en el músculo gastrocnemio izquierdo. Se administró un volumen de 50 µl de vacuna de la rabia comercial en el músculo gastrocnemio derecho. Se administraron dosis adicionales de vacuna los días 3, 7, 14 y 28. Los días 3, 7, 14, 28 y 42, se sedaron 6 animales por grupo, se recogió su sangre y se sacrificaron los animales.

Tomados en conjuntos estos datos indican que el HuMab 17C7 proporciona consistentemente protección *in vivo* frente a la rabia y puede usarse en lugar de RIG para profilaxis postexposición.

Ejemplo 6. Producción de anticuerpos antiviral de la rabia para administración a seres humanos

Los anticuerpos de la presente invención pueden clonarse y expresarse recombinantemente para facilitar o aumentar su producción usando técnicas conocidas.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera variables de un clon de anticuerpo de la invención pueden clonarse en un vector pIE-Ugamma1F usando metodología de ADN recombinante estándar. Se amplifica el vector en *E. coli*, se purifica y se transfecta en células CHO. Se siembran placas a 4 x 10<sup>5</sup> células por pocillo en un disco de 96 pocillos y se seleccionan para transfección de vector con G418. Se ensayan entonces los clones resistentes por resistencia a G418 junto con otros transfectomas para la producción de IgG. La expresión de un anticuerpo puede amplificarse mediante crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de metotrexato. Se elige un cultivo capaz de crecimiento en metotrexato 175 nM para clonar células individuales para un desarrollo posterior. Sembrar el cultivo en placas de 96 pocillos a baja densidad permitía la generación de cultivos surgidos de una célula individual o clones. Se criba en los cultivos la producción de IgG humana, y se selecciona típicamente para uso posterior la célula que produce el mayor nivel de IgG. Se expande el clon amplificado con metotrexato, produciendo un banco celular que incluye múltiples viales congelados de células. Como alternativa, pueden usarse vectores de glutamina sintetasa (GS) con selección celular conseguida usando, por ejemplo, metionina sulfoximina

(véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.827.739, 5.122.464, 5.879.936 y 5.891.693).

5 Para preparar anticuerpos a partir de células transfectadas, se cultivan células de un clon aislado en las etapas previas y se expanden como inóculo para un biorreactor. El biorreactor contiene típicamente un volumen de 500 l de medio de cultivo. Se cultivan las células en el biorreactor hasta que cae la viabilidad celular, lo que indica que se ha producido la concentración máxima de anticuerpo en el cultivo. Se retiran las células por filtración. Se aplica el filtrado a una columna de proteína A. Los anticuerpos se unen a la columna y se eluyen con un lavado de bajo pH. A continuación, se aplican los anticuerpos a una columna de Q-Sepharose para retirar los contaminantes residuales tales como proteínas de células CHO, ADN y otros contaminantes (por ejemplo, contaminantes víricos, si están presentes). Se eluyen los anticuerpos de la columna de Q-Sepharose, se nanofiltran, se concentran y se lavan con tampón tal como PBS. Se divide asépticamente entonces la preparación en viales alícuotas para administración.

**Listado de secuencias**

15 <110> THOMAS, JR., William D AMBROSINO, Donna MANDELL, Robert SCHONHOFF, Susan BABCOCK, Gregory J. RUPPRECHT, Charles  
 <120> Anticuerpos humanos contra la rabia y usos de los mismos  
 <130> MJ1-003PC  
 <150> 60/649512  
 20 <151> 02-02-2006  
 <160> 34  
 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0  
 <210> 1  
 <211> 144  
 25 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 1

```

Met Glu Phe Gly Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1          5          10          15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20          25          30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35          40          45
Ser Thr Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50          55          60
Glu Trp Val Ala Val Val Ser Tyr Asp Gly Arg Thr Lys Asp Tyr Ala
 65          70          75          80.
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85          90          95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
 100         105         110
Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Arg Phe Ser Gly Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp
 115         120         125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130         135         140
    
```

30 <210> 2  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 2

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser  
 20 25 30  
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
 35 40 45  
 Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

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

<210> 3  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 5 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 3

Thr Tyr Ala Met His  
 1 5

<210> 4  
 <211> 17  
 10 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 4

Val Val Ser Tyr Asp Gly Arg Thr Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 5  
 15 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 5

Glu Arg Phe Ser Gly Ala Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 6  
 20 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
 1 5 10

<210> 7  
 25 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 30 <400> 7

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
 1 5

<210> 8  
 35 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 8



Gln Gln Arg Asn Asn Trp Pro  
 1 5

<210> 9

<211> 705

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> constructo sintético

<400> 9

```

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctctgtga gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatc ctgtcagcag cgtaacaact ggctcccac tttcggcgga 360
gggaccaagg tggagatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat ctccccgcca 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag cacctgacg 600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcaac ccatcagggc 660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705
  
```

10 <210> 10

<211> 234

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

15 <223> constructo sintético

<400> 10

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser  
 20 25 30  
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
 35 40 45  
 Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
 50 55 60  
 Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala  
 65 70 75 80  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95  
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Ser Cys Gln Gln Arg Asn  
 100 105 110  
 Asn Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140  
  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 11

<211> 1407

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> constructo sintético

<400> 11

```

atggagtttg ggctgaactg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggagggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagc tatgctatgc actgggtccg ccaggctcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttgta tcatatgatg gacgcactaa agactacgca 240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gectgagaac tgaggacacg gctgtgtatt tctgtgagag agagaggttc 360
tctggggcct actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420
accaagggcc catcgggtctt ccccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480
gcgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gcccaaactc 720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccacogtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccaacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcca gcccccctcg agaaaacat ctccaaagcc 1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260
tccgacggct ctttcttct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380
agcctctccc tgtctccggg taaatag 1407

```

<210> 12

<211> 468

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> constructo sintético

<400> 12

```

Met Glu Phe Gly Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
  1           5           10           15

```

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
 20 25 30  
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45  
 Ser Thr Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Val Ala Val Val Ser Tyr Asp Gly Arg Thr Lys Asp Tyr Ala  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
 85 90 95  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Arg Phe Ser Gly Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 115 120 125  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 130 135 140  
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
 145 150 155 160  
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 165 170 175  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 180 185 190  
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 195 200 205  
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 210 215 220  
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser  
 225 230 235 240  
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 245 250 255  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 260 265 270  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 275 280 285  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 290 295 300  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
 305 310 315 320  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 325 330 335  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 340 345 350  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 355 360 365  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 370 375 380  
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 385 390 395 400  
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 405 410 415  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 420 425 430  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 435 440 445  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 450 455 460  
 Ser Pro Gly Lys  
 465

<210> 13  
 <211> 432  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 13

5  
 atggagtttg ggctgaactg ggttttctctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60  
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120  
 tgtgcagcct ctggattcac cttcagtacc tatgctatgc actgggtccg ccaggctcca 180  
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttgta tcatatgatg gacgcactaa agactacgca 240  
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300  
 caaatgaaca gcctgagaac tgaggacacg gctgtgtatt tctgtgagag agagaggttc 360  
 tctggggcct actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420  
 accaagggcc ca 432

<210> 14  
 <211> 381  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 14

10  
 atggaagccc cagctcagct tctcttctctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60  
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtagca acagaaacct 180  
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catccagcc 240  
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300  
 gaagatthtg cagtttattc ctgtcagcag cgtaacaact ggocctccac tttcggcgga 360  
 gggaccaagg tgagatcaa a 381

<210> 15  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 15

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

<210> 16  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 16

20

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

```

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

```

<210> 17  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 5 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 17

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly<sup>1</sup>  
 1 5

<210> 18  
 <211> 5  
 10 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 18

Val Ala Val Ile Leu  
 1 5

<210> 19  
 <211> 12  
 15 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 19

Ala Arg Ile Ala Pro Ala Gly Ser Ala Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 20  
 <211> 6  
 20 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 20

Gln Gly Ile Ser Ser Val  
 1 5

<210> 21  
 <211> 3  
 25 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 30 <400> 21

Asp Ala Ser  
 1

<210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 35 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 22

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Pro Thr  
 1 5

<210> 23  
 <211> 708  
 40 <212> ADN

ES 2 453 973 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(708)

5 <400> 23

```

atg gac atg atg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctt ctg ctg ctc tgg 48
Met Asp Met Met Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

ctc cca ggt gcc aga tgt gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc 96
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

ctg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt 144
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

cag ggc att agc agt gtt tta gcc tgg tat cag cag aaa tca ggg aaa 192
Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys
 50 55 60

gct cct aag ttc ctg atc tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc 240
Ala Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
 65 70 75 80

cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc 288
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

atc agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag 336
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

ttt aat agt tac cct ccc act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc 384
Phe Asn Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

aaa cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat 432
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac 480
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc 528
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac 576
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac 624
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc 672
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 708
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

```

<210> 24  
 <211> 236  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 24

5

```

Met Asp Met Met Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1      5      10      15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20      25      30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35      40      45
Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys
 50      55      60
Ala Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
 65      70      75      80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85      90      95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100     105     110
Phe Asn Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115     120     125
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130     135     140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145     150     155     160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165     170     175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180     185     190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195     200     205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210     215     220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225     230     235
    
```

<210> 25  
 <211> 1404  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) ... (1404)  
 <400> 25

10



ES 2 453 973 T3

|   |     |
|---|-----|
| atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt | 48  |
| Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly |     |
| 1 5 10 15   |     |
| gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag | 96  |
| Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln |     |
| 20 25 30  |     |
| cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc | 144 |
| Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe |     |
| 35 40 45  |     |
| agt agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg | 192 |
| Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu |     |
| 50 55 60  |     |
| gag tgg gtg gca gtt ata tta tat gat gga agt aat aaa tac cat gca | 240 |
| Glu Trp Val Ala Val Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr His Ala |     |
| 65 70 75 80   |     |
| gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac | 288 |
| Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn |     |
| 85 90 95  |     |
| acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg | 336 |
| Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val |     |
| 100 105 110   |     |
| tat tac tgt gcg cga ata gca cca gct ggt tcg gcc ttt gac tac tgg | 384 |
| Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Ala Pro Ala Gly Ser Ala Phe Asp Tyr Trp |     |
| 115 120 125   |     |
| ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg gcc tcc acc aag ggc cca | 432 |
| Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro |     |
| 130 135 140   |     |
| tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca | 480 |
| Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr |     |
| 145 150 155 160   |     |
| gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg | 528 |
| Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr |     |
| 165 170 175   |     |
| gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg | 576 |
| Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro |     |
| 180 185 190   |     |
| gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc | 624 |
| Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr |     |

ES 2 453 973 T3

| 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| gtg | ccc | tcc | agc | agc | ttg | ggc | acc | cag | acc | tac | atc | tgc | aac | gtg | aat | 672  |
| Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn |      |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |      |
| cac | aag | ccc | agc | aac | acc | aag | gtg | gac | aag | aga | ggt | gag | ccc | aaa | tct | 720  |
| His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Pro | Lys | Ser |      |
|     | 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |      |
| tgt | gac | aaa | act | cac | aca | tgc | cca | ccg | tgc | cca | gca | cct | gaa | ctc | ctg | 768  |
| Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu |      |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |      |
| ggg | gga | ccg | toa | gtc | ttc | ctc | ttc | ccc | cca | aaa | ccc | aag | gac | acc | ctc | 816  |
| Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu |      |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |      |
| atg | atc | tcc | cgg | acc | cct | gag | gtc | aca | tgc | gtg | gtg | gtg | gac | gtg | agc | 864  |
| Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser |      |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |      |
| cac | gaa | gac | cct | gag | gtc | aag | ttc | aac | tgg | tac | gtg | gac | ggc | gtg | gag | 912  |
| His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu |      |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |      |
| gtg | cat | aat | gcc | aag | aca | aag | ccg | cgg | gag | gag | cag | tac | aac | agc | acg | 960  |
| Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr |      |
|     | 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |
| tac | cgt | gtg | gtc | agc | gtc | ctc | acc | gtc | ctg | cac | cag | gac | tgg | ctg | aat | 1008 |
| Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn |      |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |      |
| ggc | aag | gag | tac | aag | tgc | aag | gtc | tcc | aac | aaa | gcc | ctc | cca | gcc | ccc | 1056 |
| Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro |      |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |      |
| atc | gag | aaa | acc | atc | tcc | aaa | gcc | aaa | ggg | cag | ccc | cga | gaa | cca | cag | 1104 |
| Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln |      |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |      |
| gtg | tac | acc | ctg | ccc | cca | tcc | cgg | gag | gag | atg | acc | aag | aac | cag | gtc | 1152 |
| Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val |      |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |      |
| agc | ctg | acc | tgc | ctg | gtc | aaa | ggc | ttc | tat | ccc | agc | gac | atc | gcc | gtg | 1200 |
| Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val |      |
|     | 385 |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |      |
| gag | tgg | gag | agc | aat | ggg | cag | ccg | gag | aac | aac | tac | aag | acc | acg | cct | 1248 |
| Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro |      |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |      |
| ccc | gtg | ctg | gac | tcc | gac | ggc | tcc | ttc | ttc | ctc | tat | agc | aag | ctc | acc | 1296 |
| Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr |      |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |      |
| gtg | gac | aag | agc | agg | tgg | cag | cag | ggg | aac | gtc | ttc | tca | tgc | tcc | gtg | 1344 |
| Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val |      |

ES 2 453 973 T3

```

                435                        440                        445
atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      1392
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    450                        455.                        460

tct ccg ggt aaa                                                    1404
Ser Pro Gly Lys
465
<210> 26
<211> 468
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<400> 26
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
  1   5   10   15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
  20   25   30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
  35   40   45
Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
  50   55   60
Glu Trp Val Ala Val Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr His Ala
  65   70   75   80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
  85   90   95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100  105  110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Ala Pro Ala Gly Ser Ala Phe Asp Tyr Trp
 115  120  125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130  135  140
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 145  150  155  160
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165  170  175
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180  185  190
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195  200  205
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210  215  220
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 225  230  235  240
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245  250  255
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260  265  270
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275  280  285
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290  295  300
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305  310  315  320
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325  330  335
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340  345  350

```

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 355 360 365  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 370 375 380  
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 385 390 395 400  
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 405 410 415  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 420 425 430  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 435 440 445  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 450 455 460  
 Ser Pro Gly Lys  
 465

<210> 27  
 <211> 143  
 <212> PRT  
 5 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 27

Met Glu Phe Gly Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly  
 1 5 10 15  
 Val Gln Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro  
 20 25 30  
 Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 35 40 45  
 Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 50 55 60  
 Trp Val Ala Val Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr His Ala Asp  
 65 70 75 80  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
 85 90 95  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 100 105 110  
 Tyr Cys Ala Arg Ile Ala Pro Ala Gly Ser Ala Phe Asp Tyr Trp Gly  
 115 120 125  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 130 135 140

<210> 28  
 <211> 127  
 10 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 28

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1          5          10          15
Asp Thr Thr Gly Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
          20          25          30
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
          35          40          45
Ile Ser Ser Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys Ala Pro
          50          55          60
Lys Phe Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
65          70          75          80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

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

          100          105          110
Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          115          120          125

```

<210> 29  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 5 <213> *Homo sapiens*  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 6  
 <223> Xaa = Thr o Ser  
 10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 8  
 <223> Xaa = Ala o Gly  
 <400> 29

```

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr Xaa Met His
 1          5          10

```

15 <210> 30  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa = Val o Ile  
 <220>  
 25 <221> VARIANTE  
 <222> 5  
 <223> Xaa = Ser o Leu  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 30 <222> 9  
 <223> Xaa = Arg o Ser  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 10  
 35 <223> Xaa = Ile o Asn  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 12  
 <223> Xaa = Asp o Tyr  
 40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 13  
 <223> Xaa = Tyr o His  
 <400> 30

**Val Ala Val Xaa Xaa Tyr Asp Gly Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Ala Asp Ser**  
**1 5 10 15**  
**Val Lys Gly**  
 <210> 31  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 5 <213> *Homo sapiens*  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 3  
 <223> Xaa = Glu o Ile  
 10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa = Arg o Ala  
 <220>  
 15 <221> VARIANTE  
 <222> 5  
 <223> Xaa = Phe o Pro  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 20 <222> 7  
 <223> Xaa = Ala o Ser  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 8  
 25 <223> Xaa = Tyr o Ser  
 <400> 31  
**Ala Arg Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Phe Asp Tyr**  
**1 5 10**  
 <210> 32  
 <211> 10  
 30 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 5  
 35 <223> Xaa = Ser o Gly  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 6  
 <223> Xaa = Val o Ile  
 40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 9  
 <223> Xaa = Tyr o Val  
 <400> 32  
**Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Ser Ser Xaa Leu**  
**1 5 10**  
 45 <210> 33  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 50 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa = Asn o Ser  
 <220>  
 55 <221> VARIANTE  
 <222> 5  
 <223> Xaa = Arg o Leu  
 <220>  
 <221> VARIANTE

<222> 6  
 <223> Xaa = Ala o Glu  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 5 <222> 7  
 <223> Xaa = Thr o Ser  
 <400> 33  
**Asp Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa**  
**1 5**  
 <210> 34  
 10 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 15 <222> 4  
 <223> Xaa = Arg o Phe  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 6  
 20 <223> Xaa = Asn o Ser  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 7  
 <223> Xaa = Trp o Tyr  
 25 <400> 34  
**Cys Gln Gln Xaa Asn Xaa Xaa Pro**  
**1 5**

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une a proteína G del virus de la rabia e inhibe la capacidad del virus de infectar células, y que comprende una secuencia CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 5, una secuencia CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 8, una secuencia CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 4, una secuencia CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 7, una secuencia CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 3 y una secuencia CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 6.
2. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1 que comprende las secuencias aminoacídicas de la región variable de cadena pesada y ligera mostradas en los residuos 20 a 144 de la SEQ ID NO: 1 y los residuos 21 a 127 de la SEQ ID NO: 2, respectivamente.
3. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1 que comprende las secuencias aminoacídicas de la región variable de cadena pesada mostrada en los residuos 20 a 144 de la SEQ ID NO: 1.
4. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1 que comprende las secuencias aminoacídicas de la región variable de cadena ligera mostrada en los residuos 21 a 127 de la SEQ ID NO: 2.
5. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo:
- (a) inhibe la unión de virus de la rabia a células de mamífero; o
- (b) inhibe la unión de proteína G de virus de la rabia a células de mamífero.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es un anticuerpo completo.
7. Un polipéptido aislado que comprende la porción de unión a antígeno de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
8. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo monocatenario o un fragmento Fab.
9. El anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, está ligado a un marcaje o toxina.
10. Una composición que comprende el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en un portador farmacéuticamente aceptable.
11. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo del anticuerpo de la reivindicación 1, siendo dicho ácido nucleico idéntico a la SEQ ID NO:13, en combinación con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera del anticuerpo de la reivindicación 1, siendo dicho ácido nucleico idéntico a la SEQ ID NO:14.
12. Un vector de expresión que comprende (i) un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo del anticuerpo de la reivindicación 1, siendo dicho ácido nucleico idéntico a la SEQ ID NO: 13 y (ii) un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera del anticuerpo de la reivindicación 1, siendo dicho ácido nucleico idéntico a la SEQ ID NO: 14.
13. Una célula hospedadora que comprende los vectores de expresión de la reivindicación 11 o el vector de expresión de la reivindicación 12.
14. Un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una composición de la reivindicación 10, para uso en un procedimiento de tratamiento de infección por rabia en un cuerpo humano o animal, en el que el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se administra solo o en combinación con otro agente terapéutico.
15. El anticuerpo para uso, o porción de unión a antígeno del mismo para uso, o la composición para uso según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se administra por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea al sujeto.
16. El anticuerpo para uso, o porción de unión a antígeno del mismo para uso, o composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, en el que el agente terapéutico es un segundo anticuerpo monoclonal



humano terapéutico o porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un segundo aislamiento de la rabia.

5 17. El anticuerpo para uso, o porción de unión a antígeno del mismo para uso, según la reivindicación 14, en el que el agente terapéutico es un agente antivírico o vacuna del virus de la rabia.

18. El anticuerpo para uso, o porción de unión a antígeno del mismo para uso, según la reivindicación 17, en el que la vacuna del virus de la rabia es una proteína G de virus de la rabia o fragmento de la misma.

10 19. Un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una composición de la reivindicación 10, para uso en un procedimiento de tratamiento de infección por rabia en un cuerpo humano o animal, en el que el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se administra en combinación con un segundo anticuerpo antiviral de la rabia humano, o porción de unión a antígeno del mismo.

15 20. Un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una composición de la reivindicación 10, para uso en un procedimiento de tratamiento de infección por rabia en un cuerpo humano o animal, en el que el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, no se administra con un segundo agente.

FIG. 1

SECUENCIA AMINOACÍDICA DE LA REGIÓN VARIABLE DEL ANTICUERPO 7C17 HUMANO ANTIRRÁBICO EJEMPLAR

Región variable de la cadena pesada (VH de 17C7)  
(SEQ ID NO: 1)

líder  
MEFGLNWNVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSITIAMHWVRQAP 60  
CDR 1  
(SEQ ID NO: 3)

CDR 2  
GKGLEWVAVVSYDGRTKDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRTEDTAVYFCARERF 119  
(SEQ ID NO: 4)

CDR 3  
SGAYFDYWGQGLTVTVSSASTKGP 144  
(SEQ ID NO: 5)

Región variable de la cadena ligera (VL de 17C7)  
(SEQ ID NO: 2)

líder  
MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP 60  
CDR 1  
(SEQ ID NO: 6)

CDR 2  
GQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYSCQQRNWFPTFGG 120  
(SEQ ID NO: 7) CDR 3  
(SEQ ID NO: 8)

GTKVEIK 127

FIG. 2

SECUENCIA AMINOACÍDICA DE LA REGIÓN VARIABLE DEL ANTICUERPO 6G11 HUMANO ANTIRRÁBICO  
EJEMPLAR

Región variable de la cadena pesada (VH de 6G11)  
(SEQ ID NO: 15)

líder  
MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<sup>CDR 1</sup>MHWVRQAPGKLEW<sup>CDR 2</sup>VAVIL  
(SEQ ID NO: 17) (SEQ ID NO: 18)  
YDGSNKYHADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARIAPAGSAFDYWGQGTLLVTVSSASTKGP<sup>CDR 3</sup>  
(SEQ ID NO: 19)

Región variable de la cadena ligera (VL de 6G11)  
(SEQ ID NO: 16)

líder  
MDMMVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRAS<sup>CDR 1</sup>OGISSVLAWYQQKSGKAPKFLIY  
(SEQ ID NO: 20)  
DASSLESGVPSRFRSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQ<sup>CDR 2</sup>QFNSYPH<sup>CDR 3</sup>TFGQGTKLEIK  
(SEQ ID NO: 21) (SEQ ID NO: 22)

FIG. 3

CARTOGRAFÍA EPITÓPICA DE LA GLUCOPROTEÍNA DEL VIRUS DE LA RABIA

Esquema de la estructura proteica

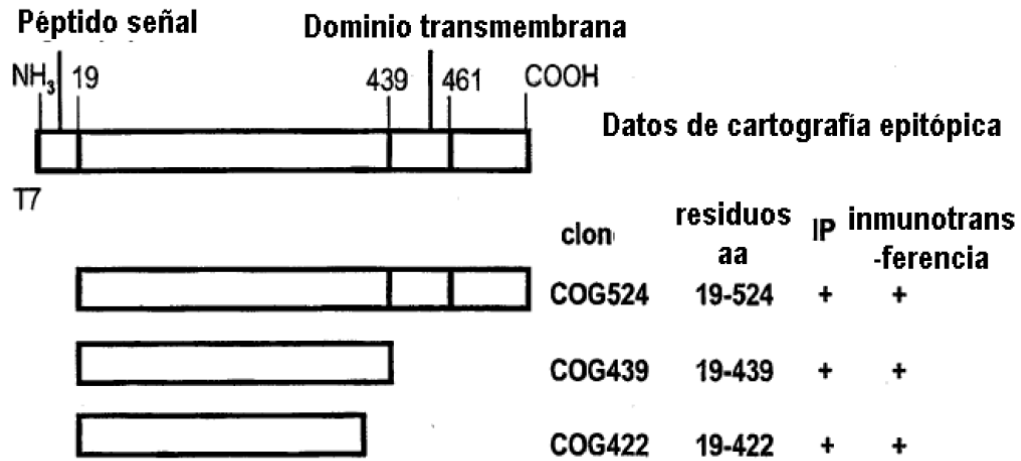


FIG. 4

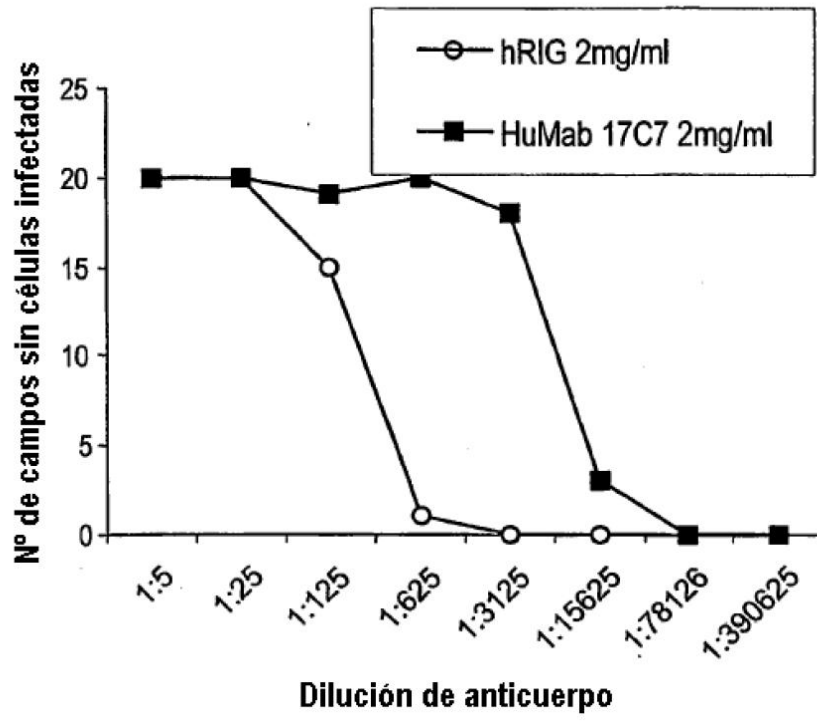


FIG. 5

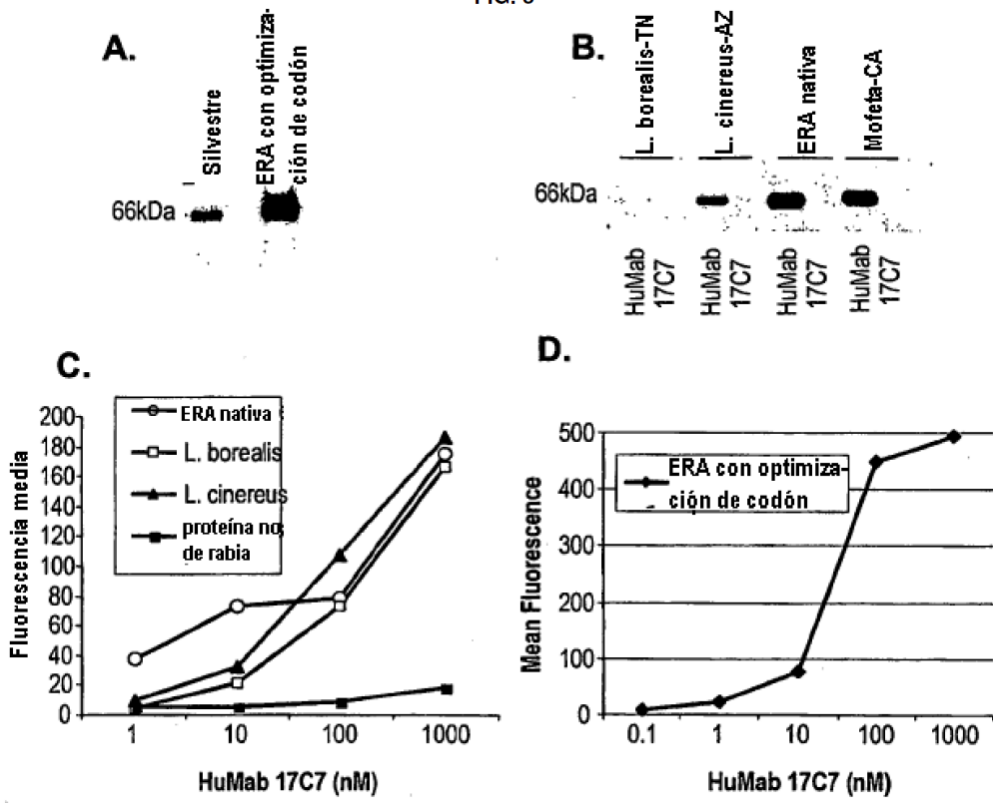


FIG. 6

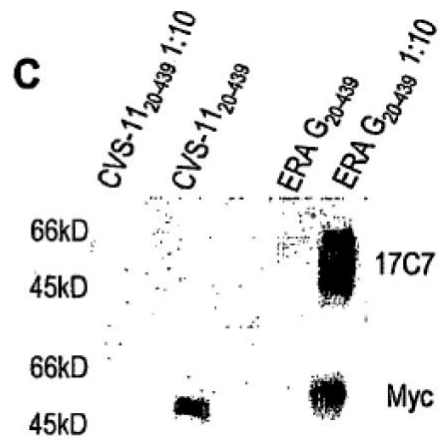
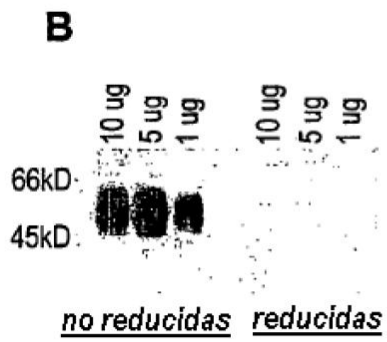
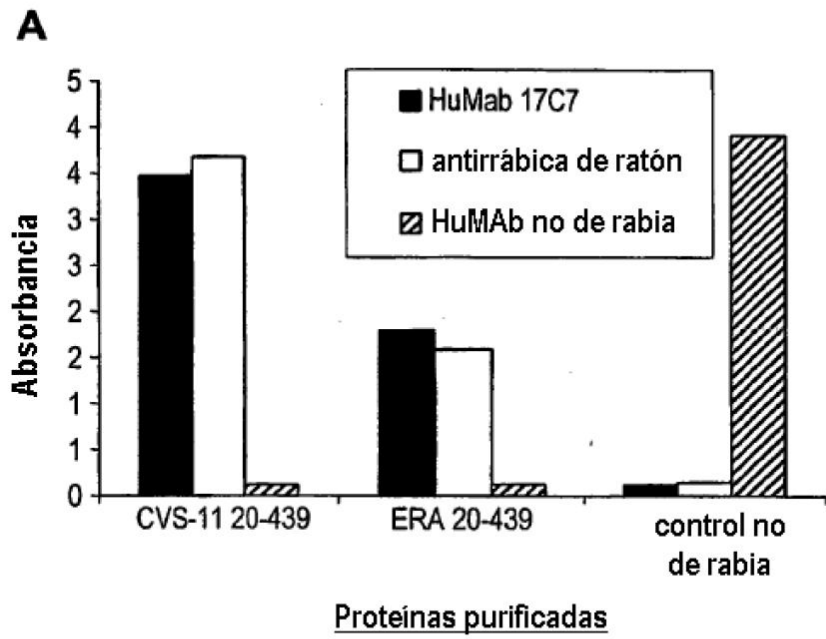


FIG. 7

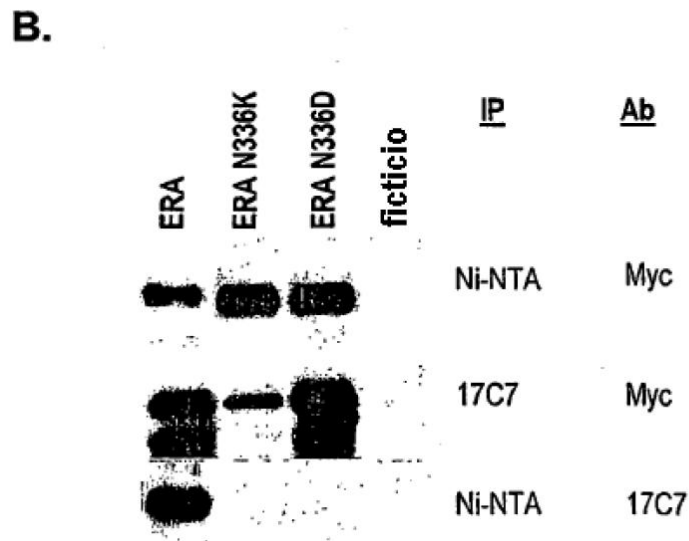
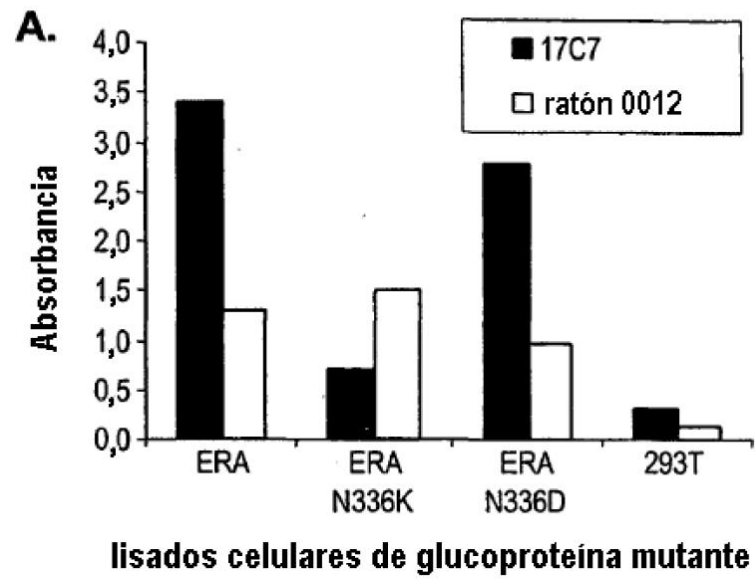




FIG. 8

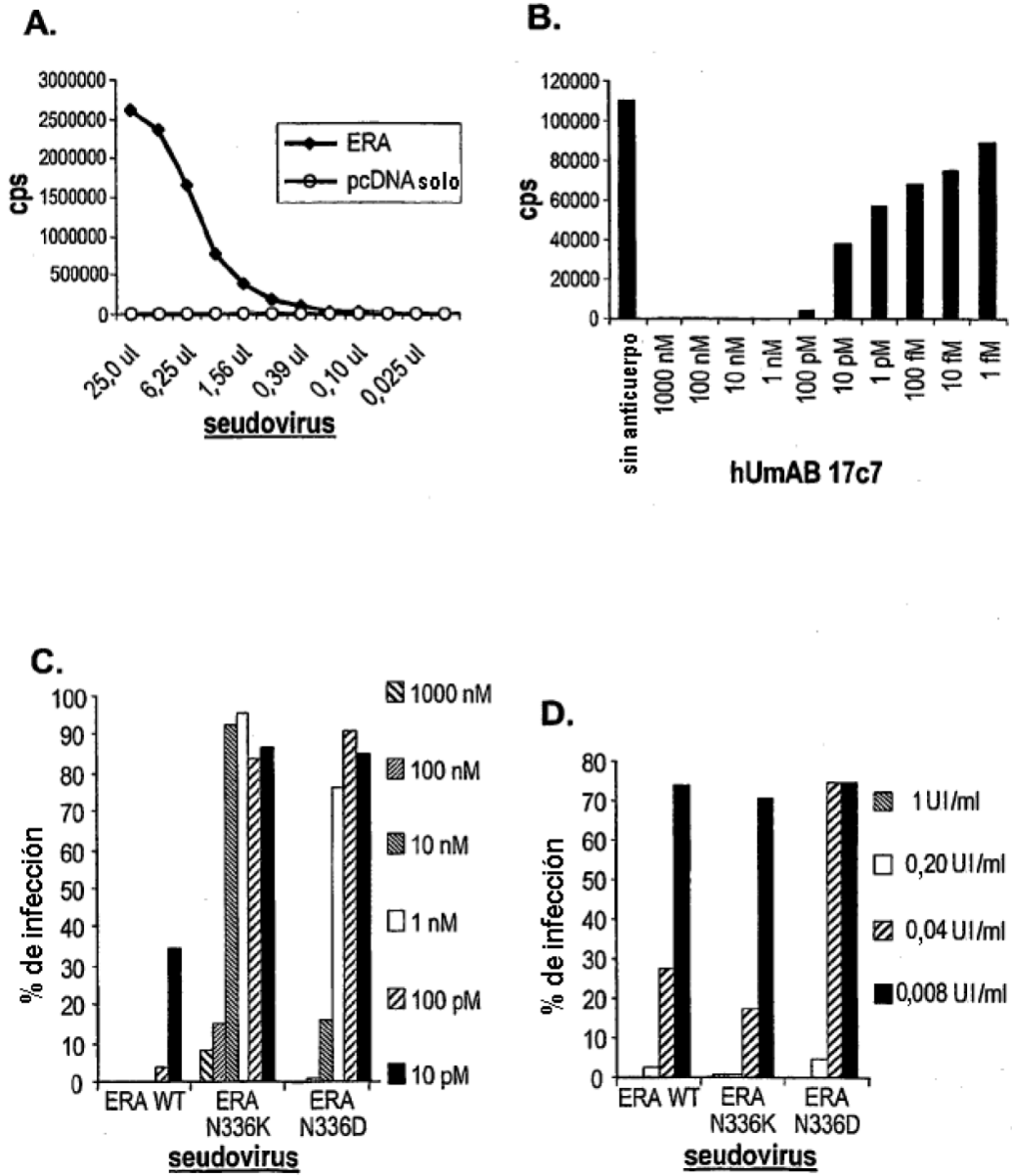


FIG. 9

