

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 821**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2012 E 15173921 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3006464**

54 Título: **Anticuerpos anti-ricina y sus usos**

30 Prioridad:

**10.06.2011 US 201161495544 P**

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

**11.10.2018**

73 Titular/es:

**HER MAJESTY THE QUEEN IN RIGHT OF  
CANADA AS REPRESENTED BY THE MINISTER  
OF NATIONAL DEFENCE (100.0%)  
2459 de la Bravoure Road  
Québec, QC G3J 1X5, CA**

72 Inventor/es:

**HU, WEI-GANG;  
NEGRYCH, LAUREL, M.;  
CHAU, DAMON;  
YIN, JUNFEI;  
JAGER, SCOTT J. y  
CHERWONOGRODZKY, JOHN W.**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 685 821 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 anti-ricina y sus usos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-toxina de proteína lectina B de ricina y a sus usos. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos anti-toxina de proteína lectina B de ricina y fragmentos de los mismos, así como a su uso en terapia o profilaxis.

Antecedentes de la invención

10 La ricina es una glicoproteína de 60-65 kDa derivada de las semillas de la planta de ricino (Montanaro et al, 1973). Es una toxina relativamente simple que consiste en una proteína enzimática-A (RTA) de toxina de ricina y una proteína de lectina-B de toxina de ricina (RTB) unida mediante un enlace disulfuro. La RTB es responsable de unirse a residuos de azúcar específicos en la superficie de la célula diana y permite la internalización de la ricina por endocitosis, mientras que el RTA inactiva enzimáticamente el ribosoma para inhibir irreversiblemente la síntesis de proteínas. Una sola molécula de RTA dentro de la célula puede inhibir completamente la síntesis de proteínas, dando como resultado la muerte celular. La ricina es una de las toxinas más potentes conocidas para los humanos, con una LD<sub>50</sub> de 1-20 mg/kg de peso corporal cuando se ingiere y 1-20 µg/kg cuando se inhala o inyecta (Audi et al, 2005); esto es 400 veces más tóxico que el veneno de cobra, 1000 veces más tóxico que el cianuro y 4000 veces más tóxico que el arsénico. La ricina figura en la lista de amenazas de Categoría B de los Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, Estados Unidos) y se considera un alto riesgo de terrorismo para los civiles. Desafortunadamente, actualmente no existe una vacuna o terapia disponible contra la ricina.

20 El desarrollo de terapias contra la ricina ha demostrado ser difícil de alcanzar. Se han desarrollado inhibidores químicos dirigidos a la ricina, pero están limitados por las altas cantidades necesarias para los efectos a corto plazo y su propia toxicidad (Burnett et al, 2005, Miller et al, 2002). El desarrollo de vacunas contra la ricina está en curso, pero hasta la fecha tales vacunas solo han protegido parcialmente a los ratones contra la ricina (Smallshaw et al, 2007). De los diferentes enfoques para contramedidas médicas, el desarrollo de anticuerpos anti-ricina parece ser el más prometedor. Se ha trabajado mucho en el desarrollo de anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, como agentes terapéuticos contra la toxina. Estos anticuerpos se dirigieron contra la cadena A tóxica (bloqueando su acción destructiva para el ribosoma) o la cadena B de lectina (evitando que se una y llegue a la célula). (Neal et al, 2010; Foxwell BMJ et al, 1985)

30 En el Reino Unido se desarrolló un F(ab)<sub>2</sub> anti-ricina de oveja para investigación y desarrollo, así como para el posible uso de emergencia. Sin embargo, se necesitan grandes cantidades, aproximadamente 50-100 µg de anticuerpos policlonales (pAbs) (Neal et al, 2010) o 5-100 µg de mAb (Hewetson et al, 1993; Foxwell et al, 1985), ya sea para proteger o tratar a un ratón de la intoxicación con ricina en un lapso de tiempo pequeño, lo que proporciona limitaciones significativas para la supervivencia. Por ejemplo, se debían administrar 5 µg de anticuerpo administrado por vía intraperitoneal (i.p.) dentro de las 24 h para proteger a los ratones antes de la prueba 5×LD<sub>50</sub> de ricina (Neal et al, 2010), mientras que tuvieron que administrarse 100 µg de mAb por ratón dentro de los 30 minutos posteriores a la prueba 10×DL<sub>50</sub> de ricina (Guo et al, 2006).

40 N. J. MANTIS et. al. ("Immunoglobulin A Antibodies against Ricin A and B Subunits Protect Epithelial Cells from Ricin Intoxication", INFECTION AND IMMUNITY vol. 74, no. 6, 1 June 2006, pages 3455-3462) describen anticuerpos anti-ricina 33G2, 35H6 activos contra la subunidad de lectina de la ricina (RTB) y los anticuerpos 23D7 y 25A4 que son activos contra la subunidad enzimática de la toxina (RTA). Los cuatro anticuerpos neutralizaron la ricina en un ensayo de citotoxicidad de células Vera.

45 MCGUINNESS CAROLYN R et. al. ("Characterization of a novel high-affinity monoclonal immunoglobulin G antibody against the ricin B subunit", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 74, no. 6, 1 June 2006, pages 3463-3470) divulga dos anticuerpos anti-ricina, uno contra RTA, es decir, R70 y uno contra RTB, a saber, 24811 y su uso sinérgico para neutralizar la ricina in vitro, lo que sugiere que dichos anticuerpos podrían servir como herramientas inmunoterapéuticas en vivo.

50 JULIE PRIGENT et. al. ("Neutralising antibodies against ricin toxin", PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, US, vol. 6, no. 5, 1 May 2011, pages 1-10) describe tres anticuerpos anti-ricina. Dos de estos tres anticuerpos anti-ricina son anticuerpos anti-RTB, concretamente RB34 y RB37, y uno es un anticuerpo anti-RTA, es decir, RA36. Los anticuerpos anti-RTB protegen a los ratones de manera más eficiente que el anticuerpo anti-RTA.

Finalmente, T. L. Furukawa-Stoffer et. al. ("A novel biological-based assay for the screening of neutralizing antibodies to ricin", Hybridoma, 1 December 1999, page 505) describe tres anticuerpos anti-ricina, es decir, HRF4, HHRD7 y HHRD9 y su uso para proteger ratones.

55 Se informó previamente que pudieron inmunizarse ratones usando dosis crecientes de ricina, sus bazos fueron recolectados y se creó hibridoma fusionando los linfocitos con las células de mieloma (Furukawa-Stoffer et al, 1999). A continuación, se usó un método de envenenamiento para seleccionar clones que sobrevivieron en medio de cultivo

con ricina porque estos secretaban cantidades suficientes de mAbs neutralizantes anti-ricina. Los anticuerpos de estos clones tenían una alta actividad neutralizante contra la ricina, a juzgar por su unión a la toxina en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y por experimentos de neutralización de ricina. HRF4 se identificó como el mejor mAb.

- 5 Aunque la HRF4 mostró actividad prometedora en estudios previos, sigue existiendo la necesidad en la técnica de moléculas altamente efectivas para la neutralización de la actividad de la ricina. Dichas moléculas serían ventajosas en el desarrollo de una terapia de contramedidas médicas.

Resumen de la invención

- 10 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-ricina y usos de los mismos. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos anti-ricina y fragmentos de los mismos, así como a su uso en terapia o profilaxis.

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento aislado o purificado del mismo, que comprende una cadena ligera variable que comprende

la secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) L1 de la secuencia KASQDVTAAVA (SEQ ID NO:4);

- 15 la secuencia de CDR L2 de la secuencia SASYRYT (SEQ ID NO:8); y

la secuencia de CDR L3 de la secuencia QQYYNTPLT (SEQ ID NO:12), y

una cadena pesada variable que comprende

la secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) H1 de la secuencia EHIIN (SEQ ID NO:16);

la secuencia de CDR H2 de la secuencia LINPNSGGTNYNQKFKD (SEQ ID NO:20); y

- 20 la secuencia de CDR H3 de la secuencia LRYDAAY (SEQ ID NO:24),

en donde el anticuerpo o fragmento del mismo reconoce y se une específicamente a la proteína lectina B de toxina de ricina.

El anticuerpo o fragmento aislado o purificado del mismo como se describe puede comprender:

la secuencia de cadena ligera variable:

DIELTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVTAAVAWYQQKPGQSPKLLIHSASYRYTGVPDRFT

- 25 GSGSGSDFFTISSVQAEDLAVYYCQQYYNTPLTFGAGTKLELKR (SEQ ID NO:31)

y la secuencia de cadena pesada variable:

QVQLQESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTEHIINWVKQTHRENLEWIGLINPNSGGTNYN

QKFKDKATLTVDTASNTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLRYDAAYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:32).

El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la presente invención es específico para la proteína lectina B de toxina de ricina. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo puede ser una IgG.

- 30 La presente descripción también proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo como se describe en este documento. La descripción también proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico recién descrita, y líneas celulares de hibridoma que expresan el anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo descrito anteriormente.

- 35 La presente invención proporciona adicionalmente una composición que comprende uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención y un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede ser una composición de vacuna.

- 40 La presente invención proporciona además un método para prevenir efectos perjudiciales causados por exposición a ricina o tratar la exposición a ricina, que comprende administrar uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo o la composición de la presente invención a un sujeto que lo necesite. El sujeto que lo necesita puede ser un mamífero, tal como un ratón o un humano.

En el método como se describió anteriormente, uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo o la composición que lo comprende se pueden administrar al sujeto varias horas después de la exposición a la toxina de ricina para

tratar la exposición a ricina. Alternativamente, o además, uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo o composición del mismo se pueden administrar al sujeto varias semanas antes de la exposición a la toxina de ricina para proteger al sujeto de la exposición a la ricina.

5 Además, una combinación de anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención puede proporcionar un efecto sinérgico sobre la actividad neutralizante de la ricina en los métodos que se acaban de describir. Uno de los anticuerpos o fragmentos del mismo puede ser un anticuerpo aislado o purificado o un fragmento del mismo, que comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) L1 de la secuencia KASQDVTAAVA (SEQ ID NO:4); la secuencia de CDR L2 de la secuencia SASYRYT (SEQ ID NO:8); y la secuencia de CDR L3 de la secuencia QQYNTPLT (SEQ ID NO:12), y una cadena pesada variable que comprende la secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) H1 de la secuencia EHIIN (SEQ ID NO:16); la secuencia de CDR H2 de la secuencia LNPNSGGTNYNQKFKD (SEQ ID NO:20); y la secuencia de CDR H3 de la secuencia LRYDAAY (SEQ ID NO:24), donde el anticuerpo o fragmento aislado o purificado del mismo reconoce específicamente y se une a la proteína lectina B de toxina de ricina, y un segundo anticuerpo o fragmento aislado o purificado del mismo, que comprende una cadena ligera variable que comprende una CDR L1 de la secuencia KASQDINNYLR (SEQ ID NO:2), una CDR L2 de la secuencia RANRLVD (SEQ ID NO:6), y una CDR L3 de la secuencia LQYDEFPYT (SEQ ID NO:10); y una cadena pesada variable que comprende CDR H1 de secuencia EYIIN (SEQ ID NO:14), una CDR H2 de la secuencia WFYPGSGDIKYNEKFKD (SEQ ID NO:18), y una CDR H3 de secuencia NGRWDDDYFDY (SEQ ID NO:22), en donde preferiblemente al menos uno de los anticuerpos o fragmentos de los mismos está humanizado.

20 La presente descripción abarca además un método para conferir inmunidad contra ricina que comprende administrar uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo o una composición de la presente invención a un sujeto que lo necesita.

Adicionalmente, la presente descripción proporciona un método para identificar hibridomas que secretan anticuerpos anti-ricina eficaces, que comprende:

- 25 a) proporcionar células de hibridoma preparadas a partir de linfocitos obtenidos de ratones inmunizados contra ricina;  
 b) exponer las células a altas cantidades de ricina; y  
 c) identificar las células que sobreviven al paso de exposición b).

30 En el método que se acaba de describir, los ratones a partir de los cuales se obtienen los esplenocitos pueden haberse inmunizado usando múltiples dosis letales de ricina. En el método anterior, la gran cantidad de ricina utilizada en la etapa b) puede estar en el intervalo de 1 a 10 ng/ml o de 1 a 5 ng/ml.

35 Se desarrollaron cuatro clones de hibridoma que secretaban anticuerpos IgG anti-ricina de alto título. Estos mAb tienen un gran potencial para desarrollarse como agentes terapéuticos basados en anticuerpos o vacunas basadas en genes de anticuerpos contra la ricina. Se encontró que los cuatro mAb tenían una alta potencia de neutralización de ricina tanto en un ensayo de neutralización *in vitro* como en un ensayo de coincubación de anticuerpo/ricina *in vivo*, lo que indica la fuerte inhibición de la muerte celular mediada por ricina. El anticuerpo monoclonal D9, que se encontró que era excepcionalmente activo en el ensayo con ratones, se analizó adicionalmente para la terapia posterior a la exposición y la profilaxis de preexposición a la ricina *in vivo*. Protegió a los ratones no solo horas, sino también varias semanas (al menos 6 semanas) antes de la exposición a la toxina ( $5 \times LD_{50}$  de ricina), y salvó a los ratones hasta 6 horas después de la intoxicación ( $5 \times LD_{50}$  de ricina); adicionalmente, bajas cantidades (0.5  $\mu$ g) fueron terapéuticas contra altas cantidades de toxina (1  $\mu$ g de ricina). El anticuerpo D9 también mostró efectos sinérgicos con otros mAb anti-ricina, según se determinó mediante el ensayo de neutralización *in vitro*. Una dosis de 5  $\mu$ g de anticuerpo en un ratón es equivalente a 1.4 mg en un humano. Estos resultados indican que las cantidades de miligramos de anticuerpo monoclonal anti-ricina específico en volúmenes muy pequeños (0.1 ml) pueden ser suficientes para proteger a los primeros respondedores o tratar las víctimas expuestas a la ricina.

45 Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes a la vista de la siguiente descripción. La descripción detallada y los ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente.

Breve descripción de los dibujos

50 Estas y otras características de la invención se describirán ahora a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La FIGURA 1 es un gráfico de barras que muestra la inmunorreactividad de los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Se realizaron experimentos de ELISA en anticuerpos individuales en dosis variables. Todos los mAb (A9, B10, D3 y D9) se unieron a la ricina de una manera dependiente de la dosis. Se utilizó HRF4 como control positivo. La absorbancia se leyó a 615 nm.

La FIGURA 2 es una inmunotransferencia Western del anticuerpo monoclonal B10 contra la ricina para determinar la especificidad general del anticuerpo. Carril 1 - ricina en condiciones de reducción (2.2 µg/carril); Carril 2 - ricina (1.1 µg/carril); Carril 3 - cadena A de ricina (0.4 µg/ carril); Carril 4 - cadena B de ricina (0.4 µg/ carril); M - marcadores de peso molecular.

5 La FIGURA 3 es un gráfico que representa la vida media de D9 en suero de ratón. D9 a la dosis de 5 µg fue administrado por ruta i.p. a ratones. Los ratones se sacrificaron en diferentes momentos para calcular la concentración plasmática de D9 usando un inmunoensayo. El D9 restante en el suero se expresa como porcentajes representados en función del tiempo en días, en la figura.

10 La FIGURA 4 es un gráfico de barras que representa el efecto de combinar mAb de la presente invención. Los anticuerpos se mezclaron a una relación de 1:1 (concentración total de 313 ng/ml) y se analizaron *in vitro* usando colorante Amalar Blue. Se observó un efecto sinérgico cuando el mAb D9 se combinó con otros anticuerpos de la presente invención.

15 La FIGURA 5 representa la humanización de D9 Fv de ratón mediante injerto de CDR. Los residuos están numerados de acuerdo con Kabat. Los CDR están marcados con cuadros sin sombrear. Los residuos clave de FR están marcados con \*. Dos residuos clave de FR en D9 VH, que se mantienen en hD9 VH, están marcados con cuadros sombreados. VH D9 (SEQ ID NO:32); VH 1-18 (SEQ ID NO:37); VH JH6 (SEQ ID NO:38); VH hD9 (SEQ ID NO:41); VL D9 (aa 1-107 de SEQ ID NO:31); VL 012 (SEQ ID NO:39); VL Jk4 (SEQ ID NO:40) y VL hD9 (SEQ ID NO:42).

La FIGURA 6 representa un diagrama esquemático del diseño del gen hD9.

20 FIGURA 7, Análisis de SDS-PAGE de hD9 purificado. Las muestras se resolvieron mediante SDS-PAGE. El carril 1 es un marcador molecular; los carriles 2 y 4 son IgG1 y hD9 humanos de control en condiciones no reductoras; los carriles 3 y 5 son IgG1 y hD9 humanas de control en condiciones reductoras.

#### Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-toxina de proteína lectina B de ricina y a sus usos. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos anti-toxina de proteína lectina B de ricina y fragmentos de los mismos, así como a su uso en terapia o profilaxis.

30 La presente invención está dirigida a anticuerpos anti-toxina de proteína lectina B de ricina y a fragmentos de la misma. La presente invención también cubre métodos para obtener e identificar anticuerpos específicos para y eficaces contra la proteína lectina B de toxina de ricina. La presente invención incluye adicionalmente métodos para usar los anticuerpos anti-toxina de proteína lectina B de ricina de la invención en la terapia y la profilaxis anti-toxina ricina de proteína lectina-B.

La presente invención proporciona un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo específico para la proteína lectina B de toxina de ricina, que comprende

una cadena ligera variable que comprende

35 la secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) L1 de la secuencia KASQDVTAAVA (SEQ ID NO:4);

la secuencia de CDR L2 de la secuencia SASYRYT (SEQ ID NO:8); y

la secuencia de CDR L3 de la secuencia QQYYNTPLT (SEQ ID NO:12), y

una cadena pesada variable que comprende

la secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) H1 de la secuencia EHIIN (SEQ ID NO:16);

40 la secuencia de CDR H2 de la secuencia LNPNSGGTNYNQKFKD (SEQ ID NO:20); y

la secuencia de CDR H3 de la secuencia LRYDAAY (SEQ ID NO:24).

45 El término "anticuerpo" usado aquí, también denominado en la técnica como "inmunoglobulina" (Ig), se refiere a una proteína construida a partir de cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas emparejadas; existen diversos isotipos Ig, que incluyen IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Cuando un anticuerpo se pliega correctamente, cada cadena se pliega en un número de dominios globulares distintos unidos por secuencias de polipéptidos más lineales. Por ejemplo, la cadena ligera de inmunoglobulina se pliega en un dominio variable (V<sub>L</sub>) y constante (C<sub>L</sub>), mientras que la cadena pesada se pliega en un dominio variable (V<sub>H</sub>) y tres dominios constantes (C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>). La interacción de los dominios variables de cadena pesada y ligera (V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>) da como resultado la formación de una región de unión a antígeno (Fv). Cada dominio tiene una estructura bien establecida bien conocida por los expertos en la materia.

Las regiones variables de cadena ligera y pesada son responsables de unirse al antígeno diana y, por lo tanto, pueden mostrar una diversidad de secuencia significativa entre anticuerpos. Las regiones constantes muestran una menor diversidad de secuencias y son responsables de unir un número de proteínas naturales para provocar importantes eventos bioquímicos. La región variable de un anticuerpo contiene los determinantes de unión a antígeno de la molécula y, por lo tanto, determina la especificidad de un anticuerpo por su antígeno diana. La mayoría de la variabilidad de secuencia ocurre en seis regiones hipervariables, tres por cada cadena pesada y ligera variable; las regiones hipervariables se combinan para formar el sitio de unión al antígeno y contribuyen a la unión y reconocimiento de un determinante antigénico. La especificidad y afinidad de un anticuerpo por su antígeno está determinada por la estructura de las regiones hipervariables, así como por su tamaño, forma y química de la superficie que presentan al antígeno. Existen varios esquemas para la identificación de las regiones de hipervariabilidad, siendo las dos más comunes las de Kabat y las de Chothia y Lesk. Kabat et al (1991) definen las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) basadas en la variabilidad de secuencia en las regiones de unión a antígeno de los dominios VH y VL. Chothia y Lesk (1987) definen los "bucles hipervariables" (H o L) en función de la ubicación de las regiones del bucle estructural en los dominios VH y VL; la numeración de los bucles hipervariables se define como H1: 26-32 o 34; H2: 52-56; y H3: 95-102 (equivalente a CDR3 de numeración Kabat) para dominios VH/VHH (Chothia y Lesk, 1987). Como estos esquemas individuales definen CDR y regiones de bucle hipervariables que son adyacentes o superpuestas, los expertos en la técnica de anticuerpos a menudo utilizan los términos "CDR" y "bucle hipervariable" de forma intercambiable, y se pueden usar así en este documento. Los aminoácidos CDR en las regiones VH y VL se definen en el presente documento de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (Kabat et al., 1991).

La región fuera de la CDR se conoce como la región marco (FR). La FR proporciona integridad estructural al dominio variable y garantiza la retención del pliegue de inmunoglobulina. Esta estructura característica de anticuerpos proporciona un armazón estable sobre el que el sistema inmune puede explorar la diversidad sustancial de unión a antígeno para obtener especificidad para una amplia gama de antígenos (Padlan et al, 1994). Las FR del dominio variable generalmente muestran menos variabilidad de secuencia que las regiones hipervariables.

Un "fragmento de anticuerpo" tal como se denomina en el presente documento puede incluir cualquier fragmento de anticuerpo de unión a antígeno adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede incluir, pero de ningún modo se limita a Fv (una molécula que comprende el V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>), Fv de cadena sencilla (scFV, una molécula que comprende el V<sub>L</sub> y el V<sub>H</sub> conectados mediante un enlazante peptídico), Fab, Fab', F (ab')<sub>2</sub>, anticuerpo de dominio único (moléculas sdAb, que comprenden un solo dominio variable y 3 CDR), y presentaciones multivalentes de estos. El fragmento de anticuerpo de la presente invención se puede obtener mediante la manipulación de un anticuerpo de origen natural (tal como, pero sin limitación, digestión enzimática), o se puede obtener usando métodos recombinantes.

Por "específico para ricina", se entiende que el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención específicamente reconoce y se une a la ricina. La ricina es una glicoproteína de 60-65 kDa derivada de semillas de la planta de ricino (Montanaro et al, 1973). Es una toxina relativamente simple que comprende una proteína enzimática A de toxina de ricina (RTA) y una proteína lectina B de toxina de ricina (RTB) unidas mediante un enlace disulfuro. La RTB es responsable de unirse a residuos de azúcar específicos en la superficie celular diana y permite la internalización de la ricina por endocitosis, mientras que la RTA inactiva enzimáticamente el ribosoma para inhibir irreversiblemente la síntesis de proteínas. La toxina de ricina es una de las toxinas más potentes conocidas para los humanos.

En otro ejemplo específico, no limitante, el anticuerpo o fragmento aislado o purificado del mismo puede comprender la secuencia de cadena ligera variable

DIELTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVTA AVAWYQQKPGQSPKLLIHSASYRYTGVPDRFT  
GSGSGSDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQYYNTPLTFGAGTKLELKR (SEQ ID NO:31)

y la secuencia de cadena pesada variable

QVQLQESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTEHIINWVKQTHRENLEWIGLINPNSGGTNYN  
QKFKDKATLTVDTASNTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLRYDAAYWGQGTTVTVSS (SEQ ID

NO:32).

Una secuencia sustancialmente idéntica puede comprender una o más mutaciones conservadoras de aminoácidos. Se sabe en la técnica que una o más mutaciones conservadoras de aminoácidos en una secuencia de referencia pueden producir un péptido mutante sin un cambio sustancial en las propiedades fisiológicas, químicas o funcionales en comparación con la secuencia de referencia; en tal caso, las secuencias de referencia y mutantes se considerarían polipéptidos "sustancialmente idénticos". La mutación de aminoácidos conservadora puede incluir la adición, eliminación o sustitución de un aminoácido; en un ejemplo no limitante, la mutación de aminoácido conservadora es una sustitución de aminoácido conservadora. Una sustitución de aminoácidos conservadora se define aquí como la

sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido con propiedades químicas similares (por ejemplo, tamaño, carga o polaridad).

Una sustitución conservadora de aminoácidos puede sustituir a un aminoácido básico, neutro, hidrófobo o ácido por otro del mismo grupo. Por el término "aminoácido básico" se entiende aminoácidos hidrófilos que tienen un valor de pK de cadena lateral mayor que 7, que están típicamente cargados positivamente a pH fisiológico. Los aminoácidos básicos incluyen histidina (His o H), arginina (Arg o R) y lisina (Lys o K). Por el término "aminoácido neutro" (también "aminoácido polar"), se entiende aminoácidos hidrófilos que tienen una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, pero que tiene al menos un enlace en donde el par de electrones compartido en común por dos átomos se mantiene más cerca por uno de los átomos. Los aminoácidos polares incluyen serina (Ser o S), treonina (Thr o T), cisteína (Cys o C), tirosina (Tyr o Y), asparagina (Asn o N) y glutamina (Gln o Q). El término "aminoácido hidrófobo" (también "aminoácido no polar") pretende incluir aminoácidos que muestran una hidrofobicidad mayor que cero según la escala de hidrofobicidad consensuada normalizada de Eisenberg (1984). Los aminoácidos hidrofóbicos incluyen prolina (Pro o P), isoleucina (Ile o I), fenilalanina (Phe o F), valina (Val o V), leucina (Leu o L), triptófano (Trp o W), metionina (Met o M), alanina (Ala o A) y glicina (Gly o G). "Aminoácido ácido" se refiere a aminoácidos hidrófilos que tienen un valor de pK de cadena lateral de menos de 7, que están típicamente cargados negativamente a pH fisiológico. Los aminoácidos ácidos incluyen glutamato (Glu o E) y aspartato (Asp o D).

La identidad de secuencia se usa para evaluar la similitud de dos secuencias; se determina calculando el porcentaje de residuos que son iguales cuando las dos secuencias están alineadas para una correspondencia máxima entre las posiciones de los residuos. Se puede usar cualquier método conocido para calcular la identidad de secuencia; por ejemplo, hay disponibles softwares de ordenador para calcular la identidad de secuencias. Sin querer limitar, la identidad de secuencia puede calcularse mediante software como el servicio NCBI BLAST2 mantenido por el Swiss Institute of Bioinformatics (y como se encuentra en <http://ca.expasy.org/tools/blast/>), BLAST-P, Blast-N, o FASTA-N, o cualquier otro software apropiado que se conozca en la técnica.

Las secuencias sustancialmente idénticas de la presente invención pueden ser idénticas al menos en un 85%; en otro ejemplo, las secuencias sustancialmente idénticas pueden ser al menos 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idénticas en el aminoácido nivel a las secuencias descritas en este documento. De manera importante, las secuencias sustancialmente idénticas retienen la actividad y la especificidad de la secuencia de referencia. Como sabrá un experto en la técnica, los residuos de aminoácidos de un anticuerpo, particularmente dentro de las regiones marco, pueden mutarse (por ejemplo, mediante sustitución conservadora) sin afectar significativamente las propiedades funcionales del anticuerpo (reconocimiento y unión a antígeno).

El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la presente invención, y como se describe en este documento, puede ser específico para la proteína lectina B de la toxina de ricina. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de la presente invención puede ser una IgG.

El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención también abarca construcciones quiméricas y humanizadas basadas en la cadena ligera variable o secuencias de CDR de los anticuerpos de la presente invención. Con el término "quimérico", se entiende que las regiones ligeras variables de los anticuerpos de la presente invención, tal como se describió anteriormente, se injertan en las regiones constantes (que pueden incluir C<sub>L</sub>, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>) de una fuente diferente. En un ejemplo específico, no limitante, una construcción quimérica puede comprender las regiones ligeras variables de la presente invención y las regiones constantes humanas. Los métodos para preparar tales construcciones quiméricas son bien conocidos por los expertos en la técnica (Sun LK, 1987). Con el término "humanizado", se entiende que la CDR descrita anteriormente puede injertarse en las regiones flanqueantes de fragmentos de anticuerpos humanos (Fv, scFv, Fab, sdAb). Los constructos humanizados pueden prepararse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, pero sin limitación, humanización, injerto de CDR y recubrimiento. La humanización de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende reemplazar un aminoácido en la secuencia con su contraparte humana, tal como se encuentra en la secuencia consenso humana, sin pérdida de la capacidad o especificidad de unión a antígeno; este enfoque reduce la inmunogenicidad del anticuerpo o fragmento del mismo cuando se introduce en sujetos humanos. En el proceso de injerto de CDR, una o más de las CDR definidas en este documento puede fusionarse o injertarse en una región variable humana (V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub>), o en otras regiones de marco de fragmento de anticuerpo humano (Fv, scFv, Fab). En tal caso, la conformación de dicho uno o más de un bucle hipervariable se conserva, y la afinidad y especificidad del sdAb por su objetivo (es decir, ricina) también se conserva. El injerto de CDR es conocido en la técnica y se describe al menos en lo siguiente: Patente de Estados Unidos No. 6180370, Patente de Estados Unidos No. 5693761, Patente de Estados Unidos No. 6054297, Patente de Estados Unidos No. 5859205 y Patente Europea No. 626390. El recubrimiento, al que también se hace referencia en la técnica como "rechapado de regiones variables", implica humanizar las posiciones expuestas al disolvente del anticuerpo o fragmento; así, los residuos sepultados no humanizados, que pueden ser importantes para la conformación de CDR, se conservan mientras se minimiza el potencial de reacción inmunológica contra las regiones expuestas al disolvente. El recubrimiento es conocido en la técnica y se describe al menos en lo siguiente: Patente de Estados Unidos No. 5869619, patente de Estados Unidos No. 5766886, Patente de Estados Unidos No. 5821123 y Patente Europea No. 519596. Las personas con experiencia en la técnica estarán ampliamente familiarizadas con métodos para preparar dichos fragmentos de anticuerpos humanizados.

5 El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención también puede comprender secuencias adicionales para ayudar en la expresión, detección o purificación de un anticuerpo recombinante o fragmento del mismo. Por ejemplo, y sin querer limitar, el anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender una secuencia de señalización o señalización (por ejemplo, pero sin limitarse a ompA), una etiqueta de detección (por ejemplo, pero no limitada a c-Myc, EQKLISEEDL, SEQ ID NO:33), una etiqueta de purificación (por ejemplo, pero sin limitación, una etiqueta de purificación de histidina, HHHHH, SEQ ID NO:34) o cualquier combinación de las mismas.

10 El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención también puede estar en una presentación multivalente. La multimerización se puede lograr mediante cualquier método adecuado de conocimiento en la técnica. Por ejemplo, y sin querer limitar de ninguna manera, se puede lograr la multimerización usando moléculas de autoensamblaje (Zhang et al, 2004; Merritt & Hol, 1995), por ejemplo como se describe en el documento WO2003/046560. El método descrito produce pentámeros al expresar una proteína de fusión que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención y el dominio de pentamerización de la subunidad B de una familia de toxinas AB<sub>5</sub> (Nielson et al, 2000); el dominio de pentamerización se ensambla en un pentámero, a través del cual se forma una pantalla multivalente del anticuerpo o fragmento del mismo. Cada subunidad del pentámero puede ser igual o diferente.

15 Adicionalmente, el dominio de pentamerización se puede unir al anticuerpo o fragmento de anticuerpo usando un enlazante; dicho enlazante debería tener una longitud suficiente y una composición apropiada para proporcionar una unión flexible de las dos moléculas, pero no debería obstaculizar las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo. En un ejemplo no limitante, el enlazante puede ser el enlazante GPGGGSGGGGS (SEQ ID NO:35).

20 Otras formas de visualización multivalente también están abarcadas por la presente invención. Por ejemplo, y sin querer limitar, el anticuerpo o fragmento del mismo se puede presentar como un dímero, un trímero o cualquier otro oligómero adecuado. Esto se puede lograr mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo conexión de enlace directo (Nielsen et al, 2000), interacción c-jun/Fos (de Kruif et al, 1996), interacción "Perilla en agujeros" (Ridgway et al, 1996).

25 La presente invención también abarca secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas como se describe en este documento. La secuencia de ácido nucleico puede estar optimizada en codones. La presente invención también abarca vectores que comprenden los ácidos nucleicos como se acaba de describir.

La presente invención también comprende células de hibridoma que expresan los anticuerpos de la presente invención.

30 La presente invención también proporciona una composición que comprende uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo, como se describe en este documento. La composición puede ser una composición de vacuna. Además del uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo, la composición puede comprender un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. El diluyente, excipiente o vehículo puede ser cualquier diluyente, excipiente o vehículo adecuado conocido en la técnica, y debe ser compatible con otros ingredientes en la composición, con el método de suministro de la composición, y no debe ser nocivo para el receptor de la composición. El uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo como se describe en este documento también se puede formular en un liposoma u otra forma de encapsulación, usando métodos conocidos en la técnica. El liposoma o la encapsulación pueden formularse opcionalmente para una liberación controlada en el tiempo; tales formulaciones son bien conocidas en la técnica.

35

40 La composición puede estar en cualquier forma adecuada; por ejemplo, la composición puede proporcionarse en forma de suspensión, en forma de polvo (por ejemplo, liofilizada), en forma de cápsula o tableta. Por ejemplo, y sin desear ser limitante, cuando la composición se proporciona en forma de suspensión, el vehículo puede comprender agua, solución salina, un regulador adecuado o aditivos para mejorar la solubilidad y/o la estabilidad; la reconstitución para producir la suspensión se efectúa en un regulador a un pH adecuado para garantizar la viabilidad de las bacterias. En un ejemplo específico, no limitante, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser solución salina. Los polvos secos también pueden incluir aditivos para mejorar la estabilidad y/o los portadores para aumentar la carga/el volumen; por ejemplo, y sin desear ser limitante, la composición de polvo seco puede comprender sacarosa o trehalosa.

45

Estaría dentro de la competencia de una persona experta en la técnica preparar composiciones adecuadas que comprendan los presentes compuestos.

50 En otra alternativa más, el uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo descrito en este documento puede administrarse usando un enfoque de terapia génica. Por ejemplo, y sin querer limitar de ninguna manera, el uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo puede codificarse como un vector de ADN dentro de virus defectuosos (tales como, pero sin limitación, adenovirus) para su administración a las células del sujeto. Los métodos para administrar vacunas o productos terapéuticos de esta manera son bien conocidos en la técnica (Fang J, et al, 2005).

55 La presente invención proporciona además un método para prevenir efectos perjudiciales causados por exposición a ricina o tratar la exposición a ricina que comprende administrar uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo o una composición del mismo a un sujeto que lo necesite. El sujeto que lo necesita puede ser cualquier especie de mamífero que sea susceptible a los efectos de la ricina; por ejemplo, y sin desear ser limitante de ninguna manera, el mamífero puede ser un ratón o un ser humano.

- 5 Cuando se usa uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo para el tratamiento de exposición a ricina, uno o más de uno o más fragmentos del mismo pueden administrarse al sujeto hasta varias horas después de la exposición a la toxina de ricina para salvar al sujeto de la muerte. Por ejemplo, el uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo se puede administrar 0, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 u 8 horas después de la exposición a la ricina, o en cualquier momento entre ellas. En ejemplos específicos, no limitantes, un solo anticuerpo o fragmento del mismo como se describe aquí se puede administrar al sujeto entre 0 y 4 horas después de la exposición a ricina, mientras que una combinación sinérgica de anticuerpos o fragmentos de los mismos se puede administrar entre 0 y 8 horas después exposición a la ricina.
- 10 Cuando se utiliza uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo para prevenir efectos perjudiciales causados por exposición a ricina (es decir, profilaxis), uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo pueden administrarse al sujeto hasta varias semanas antes de la exposición a la toxina de ricina. Por ejemplo, el uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo se puede administrar 0, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, o 9.0 semanas antes de la exposición a ricina, o en cualquier momento entre los mismos para proteger al sujeto de la exposición a la ricina. En un ejemplo específico, no limitante, un único anticuerpo o fragmento del mismo, o una combinación sinérgica de anticuerpos o fragmentos del mismo, como se describe aquí, se puede administrar al sujeto entre 0 y 9 semanas antes de la exposición a la ricina.
- 15 Como se describió anteriormente, más de un anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención se puede combinar para proporcionar un efecto sinérgico con respecto a la actividad neutralizante de ricina. Por ejemplo, y sin querer limitar de ninguna manera, el mAb D9 se puede combinar con uno o más de mAb A9, B10 y/o D3 para proporcionar una actividad mejorada contra la ricina. En un ejemplo específico, los mAb D9 y B10 se pueden combinar para la administración. Además, el mAb D9 se puede administrar en combinación con cualquier anticuerpo de la técnica anterior para proporcionar un efecto sinérgico similar; por ejemplo, y sin desear ser limitante de ninguna manera, el mAb D9 se puede combinar con mAb HRF4.
- 20 Todavía otro aspecto de la presente invención proporciona un método para conferir inmunidad contra la ricina que comprende administrar uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo como se describe aquí, o una composición del mismo. El uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo o la composición que lo comprende se pueden administrar mediante cualquier ruta adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, y sin desear ser limitante, el uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo o la composición que lo comprende pueden administrarse por vía subcutánea, intramuscular, oral o por inhalación.
- 25 La presente descripción también proporciona un método para identificar hibridomas que secretan anticuerpos anti-ricina eficaces, que comprende:
- 30 a) proporcionar células de hibridoma preparadas a partir de linfocitos obtenidos de ratones inmunizados contra ricina; b) exponer las células a altas cantidades de ricina; y c) identificar las células que sobreviven al paso de exposición b).
- 35 En el método como se describió anteriormente, los ratones de los que se obtienen los linfocitos pueden haberse inmunizado usando dosis cada vez mayores de ricina; las dosis crecientes paso a paso pueden extenderse al rango letal. Esto es contrario a los métodos comúnmente usados en la técnica, donde se usan cantidades sub-letales de ricina, toxoide de ricina o ricina desglucosilada en adyuvante. Las células de hibridoma se pueden preparar a partir de la fusión de linfocitos, obtenidos de bazoos tomados de los ratones inmunizados, y una línea celular de mieloma; esto se puede lograr usando cualquier método adecuado conocido en la técnica.
- 40 Las células de hibridoma se exponen entonces a altas cantidades de ricina. Las células de hibridoma se pueden aislar por dilución en recipientes individuales (tales como, pero sin limitación, pocillos de una placa de microtitulación estéril) que contienen medio de cultivo celular estéril. La alta cantidad de ricina utilizada en la etapa b) del método descrito anteriormente puede ser cualquier concentración final de ricina adecuada; por ejemplo, y sin querer limitar de ninguna manera, la concentración final de ricina puede estar en el intervalo de 1 a 5 ng/ml; por ejemplo, la concentración de ricina puede ser 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 o 5 ng/ml, o cualquier concentración en el rango como se definió previamente. En un ejemplo específico, no limitante, la concentración de ricina puede ser de 5 ng/ml. Esta cantidad de ricina representa un aumento de 25 veces en ricina sobre lo que se ha usado en la técnica anterior (Furukawa-Stoffer et al, 1999); sin desear estar sujeto a la teoría, esto puede proporcionar una selección más rigurosa de hibridoma secretor de anticuerpos, y permitir la selección de anticuerpos neutralizantes altamente potentes.
- 45 El método descrito anteriormente puede comprender además una etapa de confirmación de que el hibridoma de la etapa c) sobrevivió a la exposición a ricina evaluando la secreción de anticuerpos anti-ricina efectivos. Esta etapa puede realizarse mediante métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos secretados por el hibridoma pueden ser altamente efectivos para neutralizar la ricina.
- 50 El método como se describió anteriormente también puede incluir una etapa de caracterización del anticuerpo secretado por el hibridoma. La caracterización puede incluir la identificación del isotipo del anticuerpo, la afinidad de unión al anticuerpo y/o la especificidad por la ricina (usando, por ejemplo, pero sin limitación, ensayos ELISA o resonancia de plasmón superficial), la actividad del anticuerpo *in vitro* (por ejemplo, pero no limitado a la neutralización
- 55

de la ricina en un cultivo de células Vero) o *in vivo* (por ejemplo, pero sin limitación, la neutralización de la ricina en un modelo de ratón).

Se desarrollaron y describieron cuatro clones de hibridoma que secretan anticuerpos IgG anti-ricina de alto título. Estos mAb tienen un gran potencial para desarrollarse como agentes terapéuticos basados en anticuerpos o vacunas basadas en genes de anticuerpos contra la ricina. Se encontró que los cuatro mAb tenían una alta potencia de neutralización de ricina tanto en un ensayo de neutralización *in vitro* como en un ensayo de coinubación de anticuerpo/ricina *in vivo*, lo que indica la fuerte inhibición de la muerte celular mediada por ricina. El anticuerpo monoclonal D9, que se encontró que era excepcionalmente activo en el ensayo de ratón, se analizó adicionalmente para la terapia posterior a la exposición y la profilaxis de preexposición a la ricina *in vivo*. Protegió a los ratones no solo horas, sino también varias semanas (al menos 6 semanas) antes de la exposición a la toxina ( $5 \times LD_{50}$  de ricina), y salvó a los ratones hasta 6 horas después de la intoxicación ( $5 \times LD_{50}$  de ricina); adicionalmente, bajas cantidades (0.5  $\mu$ g) fueron terapéuticas contra altas cantidades de toxina (1  $\mu$ g de ricina). El anticuerpo D9 también mostró efectos sinérgicos con otros mAb anti-ricina, según se determinó mediante el ensayo de neutralización *in vitro*. Una dosis de 5  $\mu$ g de anticuerpo en un ratón equivale a 1.4 mg en un humano, que se encuentra en el rango de dosis letal. Estos resultados indican que las cantidades de miligramos de anticuerpo monoclonal anti-ricina específico en volúmenes muy pequeños (0.1 ml) pueden ser suficientes para proteger a los primeros respondedores o tratar las víctimas expuestas a la ricina.

Las consideraciones éticas evitan los estudios de eficacia anti-ricina en humanos; por lo tanto, la evaluación de los anticuerpos o fragmentos de los mismos o las composiciones de la presente invención se debe realizar en modelos animales. La FDA ha ideado una política, la Animal Rule (<http://www.fda.gov/cber/rules/humeffic.htm>, también véase el Federal Register: May 31, 2002 (Volume 67, Number 105, pages 37988-37998)), que permite la aprobación de terapias o vacunas en base a estudios de eficacia realizados exclusivamente con modelos animales. La Animal Rule requiere que cualquier modelo animal de este tipo debe simular la enfermedad humana, y que el tratamiento terapéutico o la protección provocada por la vacuna en animales debe predecir la eficacia en humanos. En base a los resultados en modelos animales presentados en este documento y en la Animal Rule de la FDA, los anticuerpos o fragmentos de los mismos o composiciones de la presente invención constituyen un excelente candidato como una vacuna anti-ricina para animales y humanos.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no deben usarse para limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

#### Ejemplo 1: Preparación de reserva de ricina

Debido a que la ricina es una posible bioamenaza terrorista, es muy difícil de obtener de fuentes comerciales. Se obtuvieron semillas de ricino y se prepararon reservas de ricina en funcionamiento. No se pueden divulgar detalles sobre la fuente de ricino y la preparación de la reserva de ricino debido a problemas de seguridad.

La ricina se preparó a partir de semillas de ricino en Defense Research and Development Canada-Suffield. También se determinó la toxicidad de la reserva de ricina. Una  $LD_{50}$  de ricina para ratones se determinó por inyección i.p. de una serie de dilución de ricina en ratones. Los ratones se observaron durante 7 días. La cantidad de ricina para  $1 \times LD_{50}$  administrada por la ruta i.p. para un ratón Balb/c hembra de 20-25 gramos fue de 0.215  $\mu$ g;  $5 \times LD_{50}$  fue 1.075  $\mu$ g, o aproximadamente 1  $\mu$ g. Para  $5 \times LD_{50}$  de ricina administrada por la ruta i.p., los ratones murieron dentro del intervalo de 1-2 días.

#### Ejemplo 2: Creación y selección de hibridoma

Se usaron ratones para obtener hibridoma de anticuerpos. Los ratones se mantienen en un área segura BSL-2, atendidos bajo las directrices del Canadian Council on Animal Care (CCAC) y fueron evaluados para puntos finales alternativos.

Se inyectaron grupos de 5 ratones hembra BALB/c i.p. con cantidades crecientes de ricina (0.2, 1.0, 5 y  $25 \times LD_{50}$ ) del Ejemplo 1 en 0.1 ml de solución salina estéril al 0.9% por ratón. Dependiendo de su recuperación (aumento de peso, falta de síntomas de enfermedad), las inyecciones de cantidades crecientes de ricina tuvieron 2-3 semanas de diferencia. Dos semanas después de la dosis final, se sangraron los ratones por incisión en la vena de la cola con un bisturí mientras el ratón estaba en una cámara de retención; la sangre se recogió en un tubo de microcentrifuga estéril y se dejó coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos. La muestra se centrifugó a  $2300 \times g$  durante 5 min y se recogió el suero; en caso de haberse requerido, el suero se almacenó a  $-20^{\circ}C$  hasta que se necesitara.

Se realizó ELISA para determinar los títulos de anticuerpos IgG anti-ricina. Se recubrieron placas de ELISA de noventa y seis pocillos (Nunc Maxisorp, Canadian Life Technologies, Burlington, ON) con 100  $\mu$ l por pocillo de ricina 5  $\mu$ g/ml en regulador de bicarbonato y carbonato, pH 9.6, luego se incubaron durante la noche a  $4^{\circ}C$ . Después de bloquear con BSA diluida, las placas se incubaron con 100  $\mu$ l de diluciones de suero durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos anti-ricina se detectaron mediante incubación con IgG anti-ratón de cabra HRP diluida 1:3000 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) seguida de la adición de un sustrato de tetrametilbencidina peroxidasa

(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). La absorbancia se midió a 615 nm mediante un autolector de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

- Los dos ratones con los títulos más altos se sacrificaron tres días después del último refuerzo para recolectar linfocitos. Estos ratones se sacrificaron por dislocación cervical, luego se frotó el abdomen con etanol al 70% y se abrió con tijeras y pinzas estériles. Los bazo se diseccionaron asépticamente a partir de los ratones inmunizados y se trituraron suavemente con portaobjetos de vidrio esmerilado esterilizados en autoclave en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Invitrogen), luego se filtraron a través de un tamiz de malla de alambre para preparar los esplenocitos. Los hibridomas se produjeron fusionando los esplenocitos con células de mieloma Sp 2/0 (número de acceso ATCC CRL-1581, ATCC, Rockville, MD) usando un Kit Clonacell™ -HY (StemCell Technologies, Vancouver, BC), siguiendo las instrucciones del fabricante y haciendo crecer estos en medio semisólido con 2.5 ng/ml de ricina (10 dosis de cultivo de células de hibridoma letal). Después de 2 semanas, se recogieron clones de hibridoma individuales de medio semisólido, se transfirieron a placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y luego se cultivaron durante 1 semana en medio Clonacell E con 5 ng/ml de ricina (dosis letal de cultivo de células hibridoma 20x) para selección adicional.
- 5 A partir de los clones supervivientes, se eliminó el sobrenadante y se evaluó mediante ELISA (como se describió anteriormente) para anticuerpos anti-ricina. Los anticuerpos se caracterizaron adicionalmente usando un kit IsoStrip de ratón de Roche Diagnostics (Laval, QC) siguiendo las instrucciones del fabricante. Solamente se usaron adicionalmente clones que expresan anticuerpos IgG. Veinticinco clones sobrevivieron a esta alta concentración de toxina y, a partir de estos, se identificó mediante ELISA un panel de 4 clones de hibridoma (A9, B10, D3, D9) con alta reactividad específica para la ricina.
- 10
- 15
- 20

#### Ejemplo 3: Purificación y caracterización de anticuerpos

Los cuatro clones de hibridoma del Ejemplo 2 se cultivaron y los anticuerpos expresados se purificaron y caracterizaron.

- Los clones de hibridoma A9, B10, D3 y D9 se cultivaron por separado en DMEM complementado con 10% de FBS. Los anticuerpos monoclonales (mAb) se purificaron a partir de los sobrenadantes del cultivo celular mediante purificación Melon Gel (Kit de Purificación de IgG Monoclonal de Melón Gel, Pierce, Rockford, IL) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El sobrenadante se dializó durante dos intercambios de 1 hora en Regulador de purificación Melon Gel IgG pH 7.0 y se cargó en una columna que contenía la resina Melon Gel. Después de 5 minutos de incubación con mezcla de extremo a extremo, la IgG purificada se recogió en la fracción de flujo continuo. Todas las muestras purificadas con IgG se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -20°C. La pureza del mAb fue del 85-90%, según se evaluó mediante SDS-PAGE (datos no mostrados).
- 25
- 30

- El mAb purificado también se isotipificó usando un Kit IsoStrip™ de ratón. Todos los mAb mostraron el mismo subtipo de cadena pesada, gamma 1 y el mismo tipo de cadena ligera, kappa. Las inmunorreactividades de estos mAb a la ricina se investigaron mediante ELISA. Todos los mAb se unieron a la ricina (Figura 1) de una manera dependiente de la dosis. Se usó HRF4 (Furukawa-Stoffer, T.L., 1999) como control positivo, mostrando alta actividad. Particularmente interesante es la actividad promedio mostrada por el anticuerpo D9.
- 35

- Se determinaron cuatro secuencias variables de anticuerpo neutralizante anti-ricina usando PCR con cebadores degenerados específicos para anticuerpos de ratón (Amersham Pharmacia). En resumen, se aisló el ARN total de las líneas celulares de hibridoma (QiagenRNeasy Plus Mini) y se transcribió de forma inversa con Superscript II RNase H<sup>-</sup> (Invitrogen) y un cebador oligo dT (12-18 mer) para producir ADNc. Se usó PlatinumTaq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) para amplificar los genes ScFv, V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> con cebadores degenerados (Amersham Pharmacia Biotech) para PCR (gradiente Eppendorf Mastercycler). Se detectaron distintas bandas de aproximadamente 340 pb para V<sub>H</sub> y aproximadamente 325 pb para V<sub>L</sub> en un gel de agarosa al 1.5% después de PCR y las bandas se purificaron (Qiagen Gel Extraction) y se clonaron en vector de clonación Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen) para secuenciación (Beckman Coulter CEQ 8000 Genetic Analyzer).
- 40
- 45

Las secuencias de aminoácidos para los dominios variables de mAb A9, B10, D3 y D9 se muestran a continuación, con las regiones CDR subrayadas.

Cadena ligera variable A9

DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDIKQYIAWYQYKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSG  
 SGRDYSFISINLDPEDIATYYCLQYDHLTYFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:25)

- 50 Cadena pesada variable A9

KVQLQESGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIQWIKQRPBGHGLEWIGEILPGTGNTNYS  
EKFQKATFTTDTSSNTAYMHFSSLTSEDSAVYYCSRCEGEGYFQAWFAYWGQGTTVTVSS  
 (SEQ ID NO:26)

Cadena ligera variable B10

DIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINNYLRWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVP  
SRFS  
 GSGSGQDYSLTSSLEYEDMGFYSCLQYDEFPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:27)

Cadena pesada variable B10

5 EVQLQESGTGLVKPGASVKLSCKASGYTFTEYIINWVKQRSGGLEWIGWFYPGSGDIKYNE  
KFKDKATLTADKSSSTVYMELSRLTSEDSAVYFCARNGRWDDDYFDYWGQGTTVTVSS  
 (SEQ ID NO:28)

Cadena ligera variable D3

DIQMTQSPSSLSAFVGGKVTITCKASQDIKKYIGWYQQKPGKGRLLIHYTSTLQPGIPSRFSG  
SGSGRDYSFISISNLEPEDIATYYCLQYDSLYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:29)

Cadena pesada variable D3

KVKLQESGAELMKPGASVKISCKSTGYTFSSNYWIEWIKQRPBGHGLEWIGEILPGSGSINYDEK  
FQKATFTADTSSDTVYMFSLSGLTSEDSAVYYCARQANRGFDSAWFAYWGQGTTVTVSS  
 (SEQ ID NO:30)

10 Cadena ligera variable D9

DIELTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVTAAWYQQKPGQSPKLLIHSSASYRYTGVPDRFT  
 GSGSGSDFTTISSVQAEDLAVYYCQQYYNTPLTFGAGTKLELKR (SEQ ID NO:31)

Cadena pesada variable D9

QVQLQESGPELVKPGASMKISCKASGYSTFEHIINWVKQTHRENLEWIGLINPNSGGTNYN  
QKFKDKATLTVDTASNTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLRYDAAYWGQGTTVTVSS (SEQ ID  
 NO:32)

15 Para determinar la especificidad general de los anticuerpos, las inmunotransferencias se realizaron de la siguiente manera. La ricina, la cadena A de ricina y la cadena B de ricina se separaron mediante SDS-PAGE al 10% en un aparato Mini-Cell Sure Lock de X-Cell (Invitrogen). Las proteínas separadas se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF (Millipore Corp. Bedford, Ma) usando el sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories) con regulador MOPS (50 mM MOPS, 50 mM Tris-base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.7 y 10% de metanol). Las membranas se bloquearon con regulador Superblock (Fisher Scientific Company, Canadá), seguidas de lavado 3 veces durante 5 minutos cada una con PBS que contenía 0.05% de Tween-20 (PBST). Las membranas luego se incubaron con anticuerpos anti-ricina dilución 1:1000 en regulador Superblock durante la noche a 4°C. Después de 3 lavados con PBST, las membranas se incubaron con anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado con IgG-HRP (Jackson Immuno Research Laboratories) dilución 1: 3000 en regulador Superblock a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de 3 lavados con PBST. La unión específica se detectó con el kit ECL (Amersham Biosciences) y se obtuvieron imágenes usando el sistema VersaDoc™ 5000 (Bio-Rad Laboratories).

20

25

30 En el proceso de SDS-PAGE anterior, la ricina se disociaba en la cadena B de mayor peso molecular y la cadena A de peso molecular más bajo. Todos los mAb (A9, B10, D3 y D9) se unieron específicamente a la cadena B. Los resultados para B10, representativos de otros anticuerpos, se muestran en la Figura 2. Como se muestra, B10 se une a la ricina completa (carriles 2) y a la cadena B (carril 4) pero no a la cadena A (carril 3). Todos los mAb presentes se unieron a la cadena B, bloquearon su capacidad para unirse a las membranas celulares, y así evitaron que la cadena A tóxica entrara y matara la célula. Esto está en contraste con los anticuerpos existentes, donde la mayoría de los candidatos terapéuticos son anticuerpos monoclonales con actividad de unión contra la cadena A tóxica. Este es un curso lógico, ya que un experto en la técnica buscaría un anticuerpo que neutralizaría la parte tóxica de la ricina para una terapia eficaz.

Ejemplo 4: Ensayo de neutralización *in vitro*

Se usó un ensayo de neutralización *in vitro* que implica la coincubación de anticuerpo y toxina seguido de la administración al cultivo celular para evaluar la actividad de la IgG del Ejemplo 3.

5 La cantidad de anticuerpo se determinó mediante un kit de ensayo de IgG de ratón Easy-Titer (Easy-Titer Mouse IgG Assay Kit, Pierce, Rockford, IL) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En una placa de microtitulación, se añadieron a cada pocillo 20  $\mu$ l de perlas sensibilizadas anti-IgG seguidas de 20  $\mu$ l de la IgG bajo investigación, seguido de mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la placa se bloqueó con 100  $\mu$ l de regulador de bloqueo durante 5 minutos con mezcla y se leyó a una absorbancia de 405 nm mediante un autolector de microplacas (Molecular Devices). Las concentraciones de anticuerpo fueron 4.8 mg/ml para A9, 0.68 mg/ml para B10, 1.96 mg/ml para D3 y 1.15 mg/ml para D9.

15 Para determinar la actividad de un anticuerpo dado, primero se diluyó en medio de cultivo a 10  $\mu$ g/ml. Se añadieron 200  $\mu$ l del anticuerpo diluido al primer pocillo en una columna de placa de microtitulación, y se añadieron 100  $\mu$ L de medio de cultivo a los otros pocillos de esa columna. Se transfirieron 100  $\mu$ L al siguiente pocillo en la columna para hacer una dilución de 2 veces, esto continuó y el último pocillo en la columna se separó 100  $\mu$ L de modo que todos los pocillos tenían 100  $\mu$ L de anticuerpo diluido en serie. La ricina se diluyó en medio de cultivo a 300 ng/ml y se añadieron 50  $\mu$ L de ricina a cada pocillo; la placa se incubó con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 2 horas.

20 Las células Vero se mantuvieron en DMEM con 10% de SFB (suero bovino fetal) en matraces de cultivo Falcon de 75 cm<sup>2</sup> con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, con renovación de medio cada 2-3 días. Cuando las células fueron 60-80% confluentes, se usó tripsina para separar las células, y la concentración de células se estimó contándolas con un hemocitómetro. Las células se diluyeron a 2 $\times$ 10<sup>5</sup> células/ml y se añadieron 50  $\mu$ l de la suspensión celular a cada pocillo en la placa de microtitulación anterior después de la incubación de 2 horas de ricina y anticuerpo. La placa se incubó con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 2 días.

25 Después de la incubación, se añadieron 20  $\mu$ L de Alamar Blue (TREK Diagnostic System, Ohio) a cada pocillo y la placa se incubó con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 5-6 horas. En un lector de placas (Molecular Devices), la placa se leyó a absorbancias de 570 nm y 600 nm, las lecturas se normalizaron restando la lectura de absorbancia de los pocillos que no tenían células, y el punto de datos fue el promedio de A<sub>570nm</sub>  $\div$  A<sub>600nm</sub> de pozos por triplicado. Como conocerá un experto en la técnica, el colorante Amalar se difunde en células muertas y les da una alta absorbancia a 600 nm; si las células son viables, segregarán el colorante y oxidarán el Alamar Blue, dando una lectura reducida de 600 nm y una lectura aumentada de 570 nm. Al dividir A<sub>570nm</sub> por A<sub>600nm</sub>, números más grandes indican una mayor viabilidad de las celdas. Se trazó una curva estándar usando lecturas para pozos en ausencia de ricina (100% de viabilidad), altas cantidades de ricina y sin anticuerpos (0% de supervivencia), y cantidades variables de ricina.

35 La curva estándar se usó para evaluar la viabilidad de las células en los pocillos de prueba (ricina coincubada con mAb). Los resultados de viabilidad inferiores al 100% (por ejemplo, 49%) indican que las células en los pocillos de prueba (ricina + mAb) eran viables pero dejaron de crecer, dando como resultado lecturas bajas en comparación con las células de control que continuaron creciendo. Los resultados se muestran en la Tabla 1, donde pareció que el mAb B10 se comportó mejor en la neutralización de la ricina en este ensayo *in vitro*.

Tabla 1. Número relativo de células que sobreviven a 75 ng de ricina/ml coincubadas con mAb.

Concentración de mAb (ng/ mL)	Células viables (% de células control) con Administración de 75 ng/ml de ricina + mAb				
	A9	B10	D3	D9	HRF4
5000	65	77	60	106	46
1700	79	68	40	49	24
560	51	49	33	24	20
190	24	49	21	19	13
62	7	22	14	14	9

Concentración de mAb (ng/ mL)	Células viables (% de células control) con Administración de 75 ng/ml de ricina + mAb				
	A9	B10	D3	D9	HRF4
21	9	10	9	15	7
6.9	8	6	7	6	5
2.3	8	7	4	8	7

Ejemplo 5: Ensayo de neutralización in vivo

Se usó un ensayo de neutralización *in vivo* que implica la administración de anticuerpos con ricina a ratones para evaluar la actividad de la IgG del Ejemplo 3.

- 5 En resumen, se coincubaron diferentes cantidades de anticuerpo (de 0.4 a 10 µg/ratón) con 5 x LD<sub>50</sub> de ricina (1 hora, 37°C, con una suave inversión de mezcla cada 15 minutos); la mezcla se inyectó entonces por vía intraperitoneal (i.p.) en ratones hembra BALB/c. Se usaron dos patrones de oro-anticuerpo como controles: anticuerpo policlonal de cabra anti-ricina IgG y mAb de ratón HRF4. Los resultados son como se muestran en la Tabla 2.

- 10 Tabla 2. Supervivencia de ratones a los que se administró 5xLD<sub>50</sub> de ricina coincubada con cantidades variables de anticuerpo. Se proporciona el número de ratones viables cada día después de la administración.

Anticuerpo	Cantidad (µg)	Día 1 (número)	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 11
Control Controlar	0	3	0	-	-	-	-	-	-
Anticuerpo de cabra purificado	20	3	3	3	3	3	3	3	3
	4	3	1	0	-	-	-	-	-
	0.8	3	0	-	-	-	-	-	-
HRF4	10	3	3	2	2	1	0	-	-
	2	3	0	-	-	-	-	-	-
	0.5	5	1	0	-	-	-	-	-
	0.4	2	0	-	-	-	-	-	-
A9	10	3	3	3	3	3	3	3	3
	2	3	3	3	3	3	3	3	3
	0.5	5	1	0	-	-	-	-	-

Anticuerpo	Cantidad ( $\mu\text{g}$ )	Día 1 (número)	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 11
	0.4	3	1	0	-	-	-	-	-
B10	10	3	3	3	3	3	3	3	3
	2	3	3	3	3	3	3	3	3
	0.5	5	5	4	0	-	-	-	-
	0.4	3	1	0	-	-	-	-	-
D3	10	3	3	3	3	3	3	3	3
	2	3	3	3	3	1	1	1	1
	0.5	5	5	3	0	-	-	-	-
	0.4	3	3	0	-	-	-	-	-
D9	10	3	3	3	3	3	3	3	3
	2	3	3	3	3	3	3	3	3
	0.5	5	5	5	5	5	5	5	5
	0.4	3	3	3	1	0	-	-	-

En los ensayos *in vitro*, el mAb HRF4 fue el mejor mAb de unión en estudios ELISA (Ejemplo 3) y B10 fue el mejor anticuerpo neutralizante en el ensayo de cultivo celular (Ejemplo 4). Sin embargo, en ambos ensayos *in vitro*, el mAb D9 parecía no excepcional. Solo en el presente modelo de ratón *en vivo*, el D9 demostró tener un mérito excepcional como contramedida médica contra la ricina. Por lo tanto, los resultados del análisis *in vitro* no son necesariamente indicativos de la eficacia *in vivo* de mAb anti-ricina. Sorprendentemente, 0.5  $\mu\text{g}$  de anticuerpo D9 fueron efectivos para proteger a los ratones de 5xLD<sub>50</sub> (1  $\mu\text{g}$  de ricina). En este nivel de eficacia, el mAb D9 supera la actividad de todos los demás anticuerpos informados hasta la fecha.

5

Vale la pena señalar que todos los anticuerpos de la presente invención superaban en rendimiento al anticuerpo monoclonal estándar de oro anterior, HRF4, así como a los anticuerpos policlonales de cabra anti-ricina.

10

Ejemplo 6: Eficacia del anticuerpo administrado antes o después de la exposición a la ricina

Las publicaciones existentes sugieren que la ricina ingresa en una célula de mamífero después de solo unos 30 minutos, y que no se puede hacer mucho para salvar a una víctima o animal más allá de este tiempo. Además, la literatura actual sugiere que los anticuerpos anti-ricina pueden administrarse horas o días antes del envenenamiento con ricina para proteger a los ratones. En este Ejemplo, se evalúa la supervivencia de los ratones que recibieron la administración de los anticuerpos del Ejemplo 3 en diversos puntos temporales antes o después de la exposición a la ricina.

15

Administración de anticuerpos después de la exposición a ricina: los ratones se evaluaron usando el ensayo de neutralización *in vivo* como se describe en el Ejemplo 5, excepto que se administraron 5  $\mu\text{g}$  de anticuerpo (A9, B10, D3, D9, HRF4 (control positivo) 1, 2, 4, o 6 horas después de la exposición a la ricina, o la solución salina se administró 1 hora después de la exposición a la ricina (control negativo). Cada grupo experimental comprendió 4 ratones. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

20

ES 2 685 821 T3

Tabla 3. Supervivencia de ratones a los que se administró anticuerpo en diferentes puntos temporales después de recibir 5xLD<sub>50</sub> de ricina. Se proporciona el número de ratones viables en cada día después de la administración del anticuerpo.

	Puntos de tiempo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Control	1 h	4	1	0	-	-	-	-
HRF4 5 µg por ratón	1 h	4	2	0	-	-	-	-
	2 h	3	1	0	-	-	-	-
	4 h	4	2	0	-	-	-	-
	6 h	3	0	-	-	-	-	-
A9 5 µg por ratón	1 h	4	4	4	4	4	4	4
	2 h	4	4	2	2	0	-	-
	4 h	4	4	3	2	0	-	-
	6 h	4	3	1	1	0	-	-
B10 5 µg por ratón	1 h	4	4	4	4	4	4	4
	2 h	4	4	4	4	4	4	4
	4 h	4	4	4	2	2	2	2
	6 h	4	3	3	0	-	-	-
D3 5 µg por ratón	1 h	4	3	3	3	3	3	3
	2 h	4	4	4	4	2	2	2
	4 h	4	4	2	2	0	-	-
	6 h	4	4	2	0	-	-	-
D9 5 µg por ratón	1 h	4	4	4	4	4	4	4
	2 h	4	4	4	4	4	4	4
	4 h	4	4	4	4	4	4	4
	6 h	4	4	4	4	4	4	4
	8 h	3	2	0	-	-	-	-

5 Todos los anticuerpos de la presente invención fueron capaces de salvar ratones cuando el anticuerpo se administró 1-2 horas después de la exposición a ricina. De hecho, y como en el Ejemplo 5, los presentes anticuerpos superaron tanto a HRF4 como a los anticuerpos policlonales de cabra. La Tabla 3 muestra de manera concluyente que los anticuerpos, especialmente D9, se pueden administrar varias horas después del envenenamiento con ricina para salvar a los ratones.

10 Administración de anticuerpos antes de la exposición a la ricina: Debido a la superioridad del anticuerpo D9 y a la reducción de la cantidad de animales requeridos para la experimentación, esta parte de la prueba se realizó usando solo el mAb D9. Los ratones se evaluaron usando el ensayo de neutralización *in vivo* como se describe en el Ejemplo 5, excepto que se administraron 5 µg de mAb D9 1, 7, 14, 28 o 42 días antes de la exposición a ricina o no se administró anticuerpo antes de la exposición a ricina (control negativo). Cada grupo experimental comprendió 4 ratones. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

15 Tabla 4. Supervivencia de ratones que recibieron la administración de mAb D9 en diferentes puntos de tiempo antes de recibir 5×LD<sub>50</sub> de ricina. Se proporciona el número de ratones supervivientes 7 días después de la administración de ricina.

	Punto de tiempo	Supervivencia
Control negativo		0 *
D9	1 día	4 (100%)
	7 días	4 (100%)
	14 días	4 (100%)
	28 días	4 (100%)
	42 días	4 (100%)
* todos murieron o tuvieron que ser terminados después de 1 día		

20 La Tabla 4 muestra que, aparte de alguna pérdida de peso temporal menor (datos no mostrados), no se observaron muertes cuando se administró anticuerpo D9 1, 7, 14, 28 o 42 días antes de administrar 5×LD<sub>50</sub> de ricina a los ratones. En base a los resultados previos, se puede formular la hipótesis de que los mAb A9, B10 y D3 serían efectivos de manera similar, aunque solo ligeramente.

25 Dado que hay algo de aclaramiento o renovación con el tiempo, se abordó la cuestión de la cantidad de tiempo necesaria para que los 5 µg de anticuerpo administrado alcancen niveles por debajo de la cantidad protectora de 0.5 µg de anticuerpo (determinado en el Ejemplo 5) dentro del ratón. Para conservar el uso de ratones, se realizó una extrapolación evaluando la cantidad de anticuerpo D9 en sangre de ratón a lo largo de diferentes puntos de tiempo. Se administraron 5 µg de anticuerpo D9 a cada ratón, y cada semana se sangraba un grupo de ratones por la vena de la cola (véase el Ejemplo 2), se recolectaron los sueros y se evaluó la cantidad de anticuerpo D9 en dichos sueros por cuantificación ELISA (véase el Ejemplo 2). Los resultados se muestran en la Figura 3, donde se estimó la vida media del anticuerpo anti-ricina D9 a los 18.5 días en los ratones. A partir de estos datos, se puede extrapolar que

después de 6 semanas, la cantidad de D9 por ratón sería de aproximadamente 1 µg, por encima de 0.5 µg como mínimo. Esta gran ventana de protección es comprensible dado que D9 es un anticuerpo de ratón que circula dentro de los ratones. Un anticuerpo monoclonal anti-ricina humanizado basado en los anticuerpos de la presente invención, que circula en un ser humano, puede tener una vida media similarmente larga.

5 Es difícil comparar la eficacia de diferentes anticuerpos anti-ricina previamente reportados en la literatura usando diferentes escenarios experimentales, tales como diferentes rutas de administración de anticuerpos, diferentes modelos animales, y así sucesivamente. Sin embargo, parece que dos informes tienen configuraciones de experimento similares a los ejemplos presentes. Un informe mostró que el anticuerpo anti-ricina CD12 o R70, a la dosis de 5, 10, 20 o 40 µg/ratón podría proteger a los ratones frente a 5×LD<sub>50</sub> de exposición a ricina cuando el anticuerpo se administró 10 24 h antes de la exposición a ricina (Neal LM, et al, 2010). El segundo informe mostró que 100 µg/anticuerpo anti-ricina de ratón 4C13 podían salvar ratones 30 minutos después de la exposición a ricina (10×LD<sub>50</sub>; Guo J, et al, 2006). Por el contrario, los presentes Ejemplos muestran que la administración de 5 µg/ratón de anticuerpo D9 puede proteger a los ratones durante al menos 6 semanas antes de la exposición a ricina (5×LD<sub>50</sub>) o puede salvar ratones 6 horas después de la exposición a ricina (5×LD<sub>50</sub>).

15 Ejemplo 7: Efecto sinérgico del mAb D9

Se evaluaron combinaciones de los anticuerpos del Ejemplo 3 para evaluar la presencia de actividades sinérgicas.

Los ratones se evaluaron usando el ensayo de neutralización *in vitro* como se describe en el Ejemplo 4, excepto que se usaron mezclas de la proporción 1:1 de anticuerpo (A9, B10, D3, D9, HRF4), a una concentración total de 313 ng/ml. También se usó anticuerpo solo, a una concentración de 156 ng/ml. Los resultados se muestran en la Figura 4.

20 Se generó un gran conjunto de datos, pero en resumen, sin importar qué anticuerpo se usó, el D9 tuvo un efecto auxiliar, especialmente para B10. Si el efecto de la combinación de anticuerpos era simplemente aditivo, los resultados para el anticuerpo solo y la combinación deberían ser equivalentes. La Figura 4 muestra que los valores de supervivencia celular fueron mucho mayores cuando se añadió D9 a cualquiera de los otros mAb.

25 Para evaluar el efecto sinérgico *in vivo*, se evaluó el efecto de administrar la combinación de D9 y B10 en diversos momentos después de la exposición a la ricina. Esto se realizó según el método descrito en el Ejemplo 6, excepto con 0.5 µg de mAb D9 y 0.5 µg de mAb B10, o 5 µg de mAb D9 y 5 µg de mAb B10. Se observó sinergismo adicionalmente cuando se administraron 0.5 µg de mAb D9 y 0,5 µg de mAb B10, 5 µg de mAb D9 y 5 µg de mAb B10 o solución salina a ratones 8 horas después de la intoxicación con ricina (n=4, cada grupo). Los resultados se muestran en la Tabla 5.

30 En el Ejemplo 6, el mejor candidato, mAb D9, no difirió de los controles con solución salina cuando se administró 8 horas después de la intoxicación con ricina (Tabla 3); si la combinación de D9 y B10 tuviera algún efecto adicional sinérgico, se vería en este momento. Los presentes resultados (Tabla 5) mostraron que la combinación de anticuerpos previno la muerte o extendió el tiempo hasta la muerte. Específicamente, 1 de 4 ratones sobrevivió cuando se administraron 0.5 µg cada uno de D9 y B10, mientras que la vida se prolongó unos pocos días para los ratones cuando 35 recibieron la administración de 5 µg cada uno de D9 y B10. El tiempo prolongado hasta la muerte es alentador, ya que puede abrir una ventana de oportunidad para que las víctimas reciban cuidados de apoyo y una mayor supervivencia después de la exposición a la ricina.

40 Tabla 5. Supervivencia de ratones que recibieron administración de terapia con mAb 8 horas después de la administración de 5 × LD<sub>50</sub> de ricina. Se proporciona el número de ratones viables en cada día después de la administración del anticuerpo.

	Número de ratones supervivientes de un grupo de 4						
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Ricina + solución salina	4	0	-	-	-	-	-
0.5 µg de mAb D9 + 0.5 µg de mAb B10	4	2	1	1	1	1	1
5 µg de mAb D9 + 5 µg de mAb B10	4	4	3	2	0	-	-

Ejemplo 8: Construcción quimérica de anticuerpos anti-ricina

Se prepararon constructos quiméricos de anticuerpos del Ejemplo 3. Aquí, el término "quimérico" se usa para definir un anticuerpo en donde la región constante del anticuerpo de ratón se reemplaza por una región constante humana.

En resumen, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera para B10 y D9 se injertaron en la región constante de la cadena pesada gamma 1 y la región constante de la cadena ligera kappa 1 humanas, respectivamente, para ensamblar los genes del anticuerpo quimérico completo, dando como resultado B10 y D9 quiméricos.

5 La secuencia de ADN del anticuerpo quimérico (2 kb) se sintetizó de la siguiente manera. Una secuencia guía de cadena ligera estaba arriba de la cadena ligera, seguida por un enzima de autoescisión del virus de la fiebre aftosa 2A que codifica APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 36) antes de la cadena pesada. La secuencia de ADN completa flanqueada por *Kpn I* y *Hind III* fue sintetizada por GenScript Corporation (Scotch Plains, NJ) y clonada en el vector pUC57, dando como resultado B10 o D9 quimérico en pUC57. Se construyó un vector de adenovirus recombinante que expresa B10 quimérico o D9 quimérico usando el sistema AdEasy (Qbiogene, Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, el fragmento *Kpn I-Hind III* de B10 quimérico en pUC57 o D9 quimérico en pUC57 se ligó a un vector pShuttle-CMV digerido con *Kpn I-Hind III*. La construcción pShuttle resultante se cotransformó con el vector pAdEasy-1 en células de *E. coli* BJ5183 para producir la construcción genómica adenoviral recombinante para la proteína hu1A4A1lgG1. El constructo adenoviral recombinante, pAd-quimérico B10 o D9 se linealizó con *Pac I* y se transfeció en células HEK 293 (ATCC) cultivadas en Medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con 5% de suero bovino fetal (FBS) para la amplificación y luego el adenovirus amplificado se purificó por un método cromatográfico.

20 Para expresar B10 quimérico o D9 quimérico, las células HEK 293 se infectaron con el adenovirus recombinante pAd-quimérico B10 o pAd-quimérico D9 a una multiplicidad de infección de 1. Las células infectadas se cultivaron durante una semana y se recolectó el sobrenadante del cultivo. El B10 quimérico o D9 quimérico expresado se purificó usando gel de agarosa de proteína L de Pierce Biotechnology (Rockford, IL). En resumen, el sobrenadante del cultivo se dializó frente a solución salina regulada con fosfato (PBS) (Sigma-Aldrich) durante 12 horas y después se concentró usando PEG (Sigma-Aldrich) a menos de 50 ml. La muestra concentrada se incubó con 2 ml de gel de agarosa de proteína L a 4°C durante 1 hora. El gel y la mezcla sobrenadante se cargaron luego en una columna vacía, que posteriormente se lavó con regulador de unión. El B10 quimérico o D9 quimérico unido se eluyó con regulador de elución. El Ab eluido se desaló adicionalmente usando una columna de celulosa (Pierce Biotechnology) y luego se concentró por Centricon YM-30 (Millipore Corp., Bedford, MA).

30 Las ilustraciones y ejemplos escritos en este documento son ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención como se reivindica. Los inventores pretenden que las realizaciones anteriores, que incluyen alternativas, modificaciones y equivalentes, son abarcadas por las reivindicaciones. Además, la combinación de características discutida podría ser necesaria para la solución de la invención.

Ejemplo 9: Humanización de Anticuerpos

Modelado molecular y análisis estructural de D9 Fv

35 Se han desarrollado diferentes metodologías para humanizar anticuerpos murinos con el fin de reducir la antigenicidad de anticuerpos murinos en humanos. A pesar del desarrollo de tecnologías de visualización molecular y animales transgénicos para la generación de anticuerpos completamente humanos, el injerto de CDR para transferir todas las CDR de anticuerpos murinos a las FR de anticuerpos humanos sigue siendo una estrategia atractiva y comprobada para superar deficiencias terapéuticas de anticuerpos murinos.

40 Los anticuerpos injertados con CDR tienden a perder la afinidad de unión parental. La clave para que los anticuerpos injertados con CDR permanezcan como la afinidad de unión parental reside en la preservación de la conformación de CDR murina en el anticuerpo humanizado para la unión al antígeno. La conformación de CDR depende principalmente de las estructuras canónicas de CDR determinadas por unos pocos residuos canónicos conservados ubicados en CDRs y FRs. Además, algunos residuos clave en FRs ajustan la conformación de CDR. Incluyen residuos de zona de ajuste fino, formando una capa subyacente de los CDR y residuos de empaque intercadena, emparejamiento de CDRs de VH y VL. Para determinar esos residuos clave de FR, el modelo molecular de la región variable D9 se estableció a través de PIGS (<http://www.biocomputing.it/pigs>), un servidor web para el modelado automático de dominios variables de inmunoglobulinas basados en la mayoría de los anticuerpos VH homólogos (2NR6), que comparten el 86% de identidad y VL (1MLB), que comparten el 70% de identidad con los correspondientes VH y VL de D9 en la base de datos de estructura de inmunoglobulina conocida. La estructura tridimensional de D9 se visualizó utilizando un programa de visualización molecular pdb (Deepview), localizados los residuos de la zona vernier en 5A de las CDR y los alojamientos de empaque intercadena localizados en 5A de la interfaz VH-VL se identificaron en la Figura 5.

Humanización del mAb D9

55 Hay dos fuentes de secuencias de anticuerpos humanos: maduras y germinales. Este último tiene dos ventajas sobre el primero como donantes de FR para el injerto de CDR murino. El primero es menos inmunogénico, a diferencia de las secuencias maduras que portan mutaciones somáticas para la maduración de afinidad generada por procesos aleatorios, lo que da como resultado inmunogenicidad potencial. El otro es más flexible, lo que resulta en una mayor compatibilidad entre las CDR murinas y las FR humanas. Por lo tanto, las secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana se han utilizado cada vez más como fuente de donantes FR.

Para seleccionar el anticuerpo humano de línea germinal VH, JH y VL, y los candidatos JL como donantes FR para la humanización D9, las estructuras canónicas D9 CDR se determinaron primero basándose en la identificación de residuos únicos tanto en CDR como en FR, y luego formaron una lista corta de candidatos del anticuerpo humano germinal VH y VL. Aquellos tenían las mismas estructuras canónicas o estrechamente relacionadas que D9 para asegurar que el anticuerpo humano FR soporta las estructuras canónicas CDR de ratón. A continuación, dentro de la lista preseleccionada del anticuerpo humano VH y VL de la línea germinal, se eligieron aquellos con CDR de homología más alta y residuos clave en FR 1-3 como donantes FR 1-3. Se eligieron JH y JL humanos en base a la homología más alta con CDR3 y residuos clave en FR 4. En consecuencia, el gen VH 1-18 humano y el gen JH 6, se seleccionaron como donantes de FR para la humanización de D9 VH; el gen Vk humano 012 y el gen Jk 4 se seleccionaron como donantes de FR para la humanización del dominio VL de D9 que se muestra en la figura 5. El 75% de los residuos clave de FR de D9 era el mismo que el de los anticuerpos de donantes humanos. Otro 22% fue diferente entre donantes D9 murino y humanos, pero estas fueron sustituciones conservadoras en los mismos grupos de aminoácidos, como S => T (polar, no aromático con grupos R de hidroxilo), K => R o E => Q o Q => K (polar, hidrofílico), I => M o A => V o L => M (no polar, hidrofóbico), H => Y (polar, aromático), V => T ( $\beta$ -C) que contiene una rama, S => A (pequeña), D => S (polar). El 3% restante (2 residuos) no se conservaron, siendo VH44 (N de ratón frente a G humano) y VH82a (L de ratón frente a R humano). Lo que es más importante, VH44-N era un residuo inusual de empaque entre cadenas. Solo 0.3% de VH tiene N en la posición 44, lo que indica que proviene de una mutación somática, lo que podría mejorar la unión del anticuerpo. VH82a-L era un residuo de zona de ajuste fino. Ventajosamente, el modelado molecular reveló que ambos no eran accesibles al disolvente, lo que indica que estos no se encuentran en la superficie de Fv y podrían no provocar una respuesta inmune en humanos. Por lo tanto, cuando las CDR de D9 se injertaron en las FR de anticuerpo humano donante, se mantuvieron VH44-N y VH82a-L en la D9 humanizada (hD9).

#### Expresión y purificación de hD9

La VH de hD9 se injertó adicionalmente en la cadena pesada de gamma 1 humana CH para formar una cadena pesada completa, mientras que la VL se injertó en la cadena ligera kappa 1 humana CL para formar una cadena ligera humanizada completa (Figura 6). Además, se introdujo una secuencia de autoprocésamiento 2A derivada del virus de la fiebre aftosa entre secuencias de ADN de cadena pesada y ligera para expresar un anticuerpo de longitud completa a partir de un solo marco de lectura abierto dirigido por un único promotor en un vector adenoviral. Para obtener que el hD9 expresado se secrete a los medios de cultivo, se añadió una secuencia guía arriba a VH y VL, respectivamente. La secuencia de ADN completa incluye la secuencia guía de la cadena ligera 012 del anticuerpo humano kappa, la cadena ligera humanizada (VL+CL), el enlazante 2A, la secuencia guía de la cadena pesada 1-18, y la cadena pesada humanizada (VH+CH1+CH2+CH3) se sintetizó alrededor de 2 kb como se muestra en la Figura 6 y luego se clonó en un vector adenoviral para la expresión.

Después de que la hD9 recombinante se expresara en células de mamífero y se purificara usando una columna de agarosa ImmunoPure Protein (L), el producto purificado se sometió a SDS-PAGE al 10%. Se observó una banda obvia de aproximadamente 150 kDa en condiciones no reductoras y dos bandas claras de aproximadamente 50 kDa (cadena pesada) y aproximadamente 25 kDa (cadena ligera) en condiciones reductoras (escisión de puentes disulfuro) (Figura 7), indicando que la cadena pesada y ligera del hD9 recombinante se escindió por completo y se dimerizó adecuadamente.

#### Caracterización de afinidad de hD9

Para evaluar la afinidad de unión de hD9, se usó un biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR). La ricina se capturó en un chip biosensor, se pasaron diversas concentraciones de hD9 o D9 a través de la celda de flujo, y se registró la cinética de unión. Las constantes de velocidad cinética  $k_{\text{activado}}$  y  $k_{\text{desactivado}}$  se calcularon a partir de la tasa ascendente de unidades de resonancia durante la asociación y la velocidad descendente durante la disociación. La KD de hD9 o D9 para ricina se determinó a partir de la relación de  $K_{\text{activado}}/K_{\text{desactivado}}$ . Como se muestra en la Tabla 6, hD9 tenía una alta afinidad por la ricina con KD de 1.63 nM, incluso mayor que D9 (2.56 nM), lo que indica que la humanización de D9 es exitosa.

Tabla 6. Comparación de las constantes cinéticas de unión a la ricina entre D9 y hD9.

Anticuerpo	$K_{\text{activado}} (M^{-1}s^{-1})$	$K_{\text{desactivado}} (s^{-1})$	KD (nM)
hD9	$4.19 \times 10^5$	$6.8 \times 10^{-4}$	1.63
D9	$1.835 \times 10^5$	$4.7 \times 10^{-4}$	2.56

#### Evaluación de eficacia de hD9

Para evaluar la eficacia de hD9 *in vivo*, se administró ricina a la dosis de 5xLD50 a ratones por vía i.p. Se administró hD9 a la dosis de 5  $\mu$ g por la ruta i.p. a las 2, 4, 6 horas después de la exposición a ricina. El hD9 podría salvar a los

ratones hasta 6 horas después de la exposición, lo que permite un 50% de supervivencia del ratón (Tabla 7), comparable a D9, que mostró un 100% de protección hasta 6 horas después de la exposición. Este D9 humanizado tiene un uso potencial para fines profilácticos o terapéuticos contra el envenenamiento con ricina.

- 5 Tabla 7. Supervivencia de ratones a los que se administró hD9 en diferentes puntos temporales después de recibir 5xLD50 de ricina. Se proporciona el número de ratones viables en cada día después de la administración del anticuerpo.

	Puntos de tiempo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
hD9 5 µg por ratón	2 h	8	8	8	8	8	8	8
	4 h	8	8	8	8	8	8	8
	6 h	8	8	8	8	8	4	4

#### Referencias

- 10 Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J. Ricin poisoning: a comprehensive review. *JAMA*. 2005 Nov 9;294(18):2342-51.
- Burnett JC, Henchal EA, Schmaljohn AL, Bavari S. The evolving field of biodefence: therapeutic developments and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Apr;4(4):281-97.
- Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol*. 1987;196(4):901-17.
- 15 de Kruif, J. & Logtenberg, T. Leucine zipper dimerized bivalent and bispecific scFv antibodies from a semi-synthetic antibody phage display library. *J Biol Chem* 271, 7630-7634 (1996).
- Eisenberg, D.; E. Schwarz; M. Komaromy & R. Wall (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol*, 179, 125-142
- 20 Fang J, Qian JJ, Yi S, Harding TC, Tu GH, VanRoey M, Jooss K. Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nat Biotechnol*. 2005 May;23(5):584-90.
- Foxwell BM, Detre SI, Donovan TA, Thorpe PE. The use of anti-ricin antibodies to protect mice intoxicated with ricin. *Toxicology*. 1985 Jan;34(1):79-88.
- Furukawa-Stoffer, T.L., Mah, D.C.W., Cherwonogrodzky, J.W., Weselake, R.J. 1999. A novel biological-based assay for the screening of neutralizing antibodies to ricin. *Hybridoma* 18:505-511.
- 25 Guo J, Shen B, Sun Y, Yu M, Hu M. A novel neutralizing monoclonal antibody against both ricin toxin A and ricin toxin B, and application of a rapid sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Hybridoma*. 2006 Aug;25(4):225-9
- Hewetson JF, Rivera VR, Creasia DA, Lemley PV, Rippey MK, Poli MA. Protection of mice from inhaled ricin by vaccination with ricin or by passive treatment with heterologous antibody. *Vaccine*. 1993;11(7):743-6.
- 30 Kabat EA, Wu TT. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol*. 1991;147:1709-19.
- Lin JY, Liu SY. Studies on the antitumor lectins isolated from the seeds of *Ricinus communis* (castor bean). *Toxicon*. 1986;24(8):757-65.
- Merritt, E.A. & Hol, W.G. AB5 toxins. *Current opinion in structural biology* 5, 165-171 (1995).
- 35 Miller DJ, Ravikumar K, Shen H, Suh JK, Kerwin SM, Robertus JD. Structure-based design and characterization of novel platforms for ricin and shiga toxin inhibition. *J Med Chem*. 2002 Jan 3;45(1):90-8.
- Montanaro L, Sperti S, Stirpe F. Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro. Ribosomes as the target of the toxin. *Biochem J*. 1973 Nov;136(3):677-83.

Neal LM, O'Hara J, Brey RN 3rd, Mantis NJ. A monoclonal immunoglobulin G antibody directed against an immunodominant linear epitope on the ricin A chain confers systemic and mucosal immunity to ricin. *Infect Immun.* 2010 Jan;78(1):552-61. Epub 2009 Oct 26.

5 Nielsen, U.B., Adams, G.P., Weiner, L.M. & Marks, J.D. Targeting of bivalent anti-ErbB2 diabody antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity. *Cancer Research* 60, 6434-6440 (2000).

Padlan, E.A. Anatomy of the antibody molecule. *Molecular immunology* 31, 169-217 (1994).

Ridgway, J.B., Presta, L.G. & Carter, P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng* 9, 617-621 (1996).

10 Smallshaw JE, Richardson JA, Vitetta ES. RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, protects mice against ricin delivered by gavage or aerosol. *Vaccine.* 2007 Oct 16;25(42):7459-69. Epub 2007 Aug 30.

Sun LK, Curtis P, Rakowicz-Szulczynska E, Ghrayeb J, Chang N, Morrison SL, Koprowski H. Chimeric antibody with human constant regions and mouse variable regions directed against carcinoma-associated antigen 17-1A. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987 Jan;84(1):214-8.

15 Zhang, J. et al. Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents. *J Mol Biol* 335, 49-56 (2004).

International PCT Publication No. WO2003/046560, US Patent No. 6180370, US Patent No. 5693761, US Patent No. 6054297, US Patent No. 5859205, US Patent No. 5869619, US Patent No. 5766886, US Patent No. 5821123, European Patent No. 519596 and European Patent No. 626390.

Listado de secuencias

20 <110> Su Majestad la Reina en el Derecho de Canadá, representada por el Ministro de Defensa Nacional Hu, Weigang Negrych, Laurel M. Chau, Damon Yin, Junfei Jager, Scott J. Cherwonogrodzky, John W.

<120> Anticuerpos anti-ricina y sus usos

<130> 50689-98

<150>US 61/495,544

25 <151> 2011-06-10

<160> 42

<170>PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

30 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

**Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Gln Tyr Ile Ala**  
**1 5 10**

<210> 2

35 <211> 11

<212>PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

**Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Arg**  
**1 5 10**

40 <210> 3



<213> Mus musculus

<400> 8

**Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr**  
**1 5**

<210> 9

5 <211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

**Leu Gln Tyr Asp His Leu Tyr Thr**  
**1 5**

10 <210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

**Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr**  
**1 5**

15 <210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

20 <400> 11

**Leu Gln Tyr Asp Ser Leu Tyr Thr**  
**1 5**

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Mus musculus

<400> 12

**Gln Gln Tyr Tyr Asn Thr Pro Leu Thr**  
**1 5**

<210> 13

<211> 5

30 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

**Ser Tyr Trp Ile Gln**  
1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 14

**Glu Tyr Ile Ile Asn**  
1 5

<210> 15

<211> 5

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

**Asn Tyr Trp Ile Glu**  
1 5

<210> 16

15 <211> 5

<212>PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

**Glu His Ile Ile Asn**  
1 5

20 <210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

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

25 **Gly**

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

30 <400> 18

Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

**Asp**

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 19

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

**Gly**

<210> 20

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

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

**Asp**

15 <210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

20 Cys Glu Gly Glu Gly Tyr Phe Gln Ala Trp Phe Ala Tyr  
 1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

25 <400> 22

Asn Gly Arg Trp Asp Asp Asp Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 23

<211> 13

ES 2 685 821 T3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

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

5 <210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Leu Arg Tyr Asp Ala Ala Tyr  
 1 5

10

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 25

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

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

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

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Asp Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp His Leu Tyr Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 26

<211> 122

20

<212> PRT

ES 2 685 821 T3

<213> Mus musculus

<400> 26

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ser Arg Cys Glu Gly Glu Gly Tyr Phe Gln Ala Trp Phe Ala Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 27

5 <211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

ES 2 685 821 T3

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

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

Leu Arg Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr  
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 28

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

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

Ile Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

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

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

ES 2 685 821 T3

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 29

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

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

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

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro  
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 30

<211> 122

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

ES 2 685 821 T3

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

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

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asp Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asp Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 31

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

ES 2 685 821 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
100 105

<210> 32

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 32

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala



<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Enlazante

<400> 35

**Gly Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser**  
**1 5 10**

<210> 36

10 <211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazante

15 <400> 36

**Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly**  
**1 5 10 15**

**Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro**  
**20**

<210> 37

<211> 98

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 37

ES 2 685 821 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu  
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 38

<211> 18

<212>PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 38

Tyr Asp Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
1 5 10 15

Ser Ser

<210> 39

<211> 95

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

ES 2 685 821 T3

Asp Ile Gln Met 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 Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Ser Tyr Ser Thr Pro  
85 90 95

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 40

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
1 5 10

<210> 41

<211> 116

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH de hD9

<400> 41

ES 2 685 821 T3

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

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

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

Gly Leu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Arg Tyr Asp Ala Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de hD9

<400> 42

ES 2 685 821 T3

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 Tyr Tyr Asn Thr Pro Leu  
 85 90 95

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo, que comprende una cadena ligera variable que comprende la secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) L1 de la secuencia KASQDVTAAVA (SEQ ID NO:4);
- 5 la secuencia de CDR L2 de la secuencia SASYRYT (SEQ ID NO:8); y la secuencia de CDR L3 de la secuencia QQYYNTPLT (SEQ ID NO:12), y una cadena pesada variable que comprende la secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) H1 de la secuencia EHIIN (SEQ ID NO:16);
- 10 la secuencia de CDR H2 de la secuencia LINPNSGGTNYNQKFKD (SEQ ID NO:20); y la secuencia de CDR H3 de la secuencia LRYDAAY (SEQ ID NO:24), en donde el anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo reconoce específicamente y se une a la proteína lectina B de toxina de ricina.
2. El anticuerpo o fragmento aislado o purificado del mismo de la reivindicación 1, que comprende:
- 15 la secuencia de cadena ligera variable:  

DIELTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVTAAWAWYQQKPGQSPKLLIHSASYRYTGVPDRFTG  
 SGGSDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQYYNTPLTFGAGTKLELKR (SEQ ID NO:31)

 y la secuencia de cadena pesada variable:  

QVQLQESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTEHIINWVKQTHRENLEWIGLINPNSGGTNYNQKF  
 KDKATLTVDTASNTAYMELLSLTSSESAVYYCARLRYDAAYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:32).
- 20 3. El anticuerpo o fragmento aislado o purificado del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento aislado o purificado del mismo está humanizado.
4. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo es una IgG.
5. Una composición que comprende uno o más de un anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 6. La composición de la reivindicación 5, en la que la composición es una composición de vacuna.
7. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de la reivindicación 6 para uso en la prevención de efectos perjudiciales causados por exposición a ricina o en el tratamiento de exposición a ricina.
- 30 8. Una combinación de anticuerpos o fragmentos de los mismos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de la reivindicación 5, proporcionando dicha combinación o dicha composición un efecto sinérgico sobre la actividad neutralizante de ricina, en donde uno de los anticuerpos o fragmentos del mismo es el aislado o anticuerpo purificado o un fragmento del mismo como se define en la reivindicación 1, y un segundo anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera variable que comprende una CDR L1 de secuencia KASQDINNYLR (SEQ ID NO:2); una CDR L2 de secuencia RANRLVD (SEQ ID NO:6), y una CDR L3 de la secuencia LQYDEFPYT (SEQ ID NO:10); y una cadena pesada variable que comprende CDR H1 de secuencia EYIIN (SEQ ID NO:14), una CDR H2 de la secuencia WFYPGSGDIKYNEKFKD (SEQ ID NO:18), y una CDR H3 de secuencia NGRWDDDYFDY (SEQ ID NO:22), en donde preferiblemente al menos uno de los anticuerpos o fragmentos del mismo está humanizado, para su uso en la prevención de los efectos nocivos causados por la exposición a la ricina o en el tratamiento de la exposición a la ricina.
- 35 9. El anticuerpo aislado o purificado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de la reivindicación 5 para uso en conferir inmunidad contra ricina.
- 40

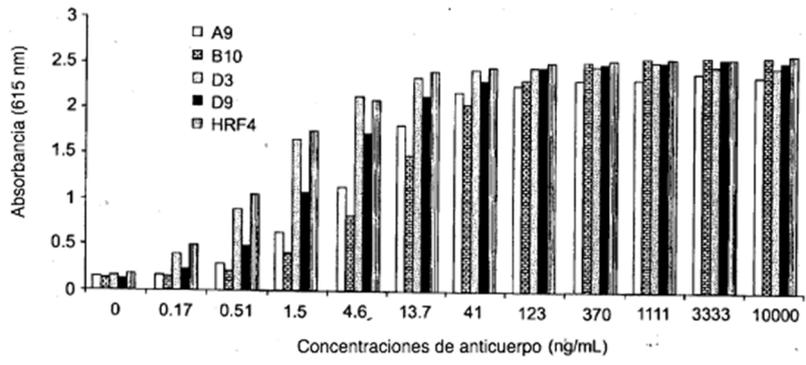


FIG. 1

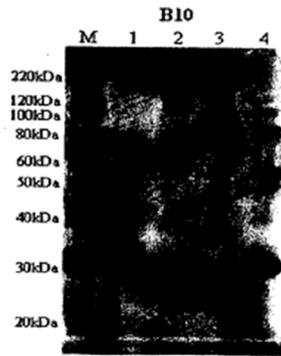


FIG. 2

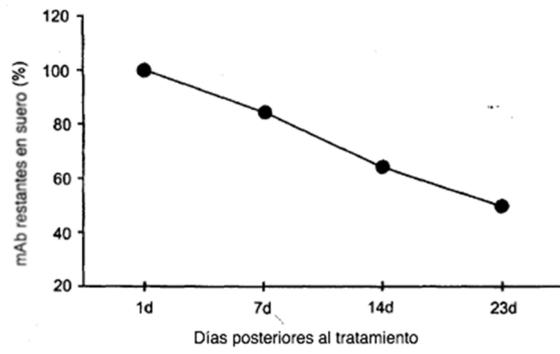


FIG. 3

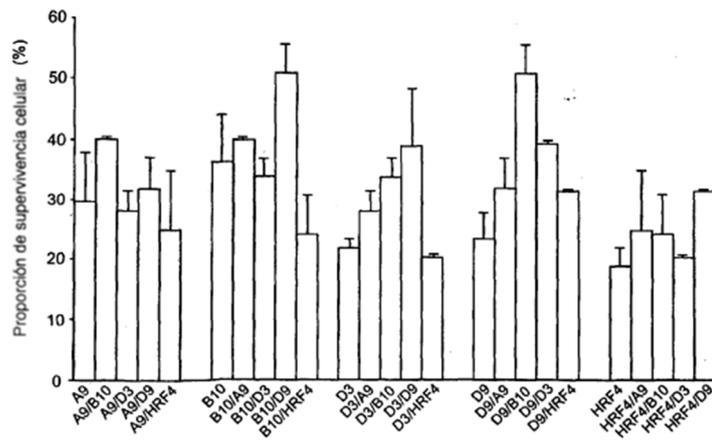


FIG. 4



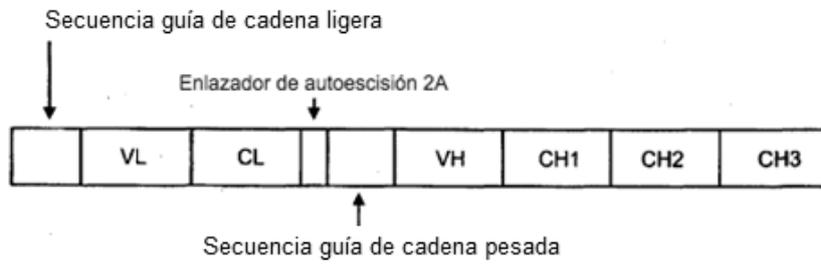


FIG. 6

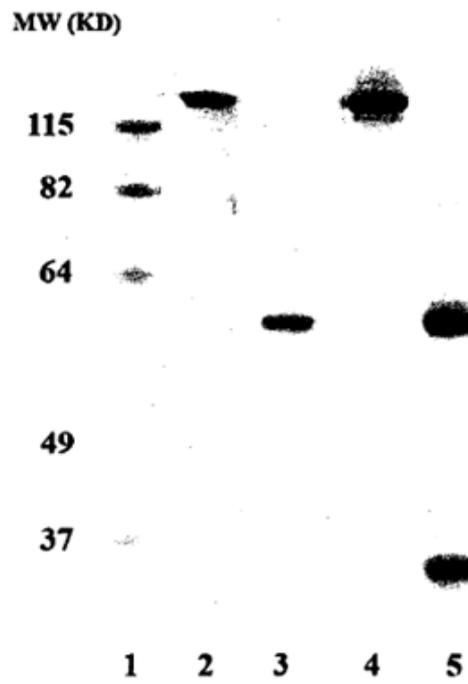


FIG. 7