

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 686**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 31/12** (2006.01)

**A61K 38/21** (2006.01)

**A61K 39/42** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2013 PCT/KR2013/006025**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14010890**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2013 E 13817251 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 2858674**

54 Título: **Una composición de anticuerpos para la prevención o el tratamiento de una infección por un virus de la hepatitis B mutante**

30 Prioridad:

**10.07.2012 KR 20120075063**

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

**14.05.2019**

73 Titular/es:

**GREEN CROSS CORPORATION (100.0%)  
107 Ihyeon-ro 30beon-gil, Giheung-gu, Yongin-si  
Gyeonggi-do 446-855, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SE-HO;  
HONG, KWANG-WON;  
SHIN, WONG-WON y  
CHANG, KI HWAN**

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

ES 2 712 686 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

Una composición de anticuerpos para la prevención o el tratamiento de una infección por un virus de la hepatitis B mutante

5

### Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición para la prevención o el tratamiento de una enfermedad causada por un virus mutante de la hepatitis B, que contiene, como principio activo, un virus de la hepatitis B (VHB) mutante, humano, con en el que no actúa o se une un inhibidor convencional de replicación de virus (por ejemplo, lamivudina o adefovir dipivoxil) o una IGHB (inmunoglobulina de la hepatitis B) procedente de plasma.

10

### Técnica anterior

El virus de la hepatitis B (VHB) es un virus con un genoma de ADN, que pertenece a la familia *Hepadnaviridae* y produce la hepatitis aguda y crónica. El virus de la hepatitis B (VHB) se clasifica en ocho genotipos que tienen una diferencia de aproximadamente 8 % o más en la secuencia génica de nucleótidos, o se clasifica en cuatro serotipos (adw, adr, ayw y ayr) basándose en los dos determinantes antigénicos (d/y y w/r) del antígeno de superficie de la hepatitis B (AgsHB). Aproximadamente 3,5 mil millones de personas en todo el mundo padece infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB), y particularmente, en Corea y China, las personas con infección crónica por virus de la hepatitis B alcanzan aproximadamente el 5-8 %, y la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) es la causa principal de hepatopatía y cáncer de hígado. Las vacunas desarrolladas actualmente pueden ser algo eficaces en la prevención de la infección causada por el virus de la hepatitis B, aunque aún existe una cantidad significativa de pacientes con infección crónica con virus de la hepatitis B. La infección crónica con virus de la hepatitis B (VHB) produce hepatitis, cirrosis y cáncer de hígado y la frecuencia de cáncer de hígado es aproximadamente 300 veces mayor en las personas con virus de la hepatitis B crónica en comparación con las personas no infectadas. De acuerdo con informes de la OMS, aproximadamente el 80 % del cáncer de hígado está producido por hepatitis B crónica.

15

20

25

30

35

Los agentes terapéuticos actualmente conocidos para la hepatitis B incluyen los análogos de nucleósidos entre los que se incluyen la lamivudina y el adefovir dipivoxil, que inhiben la replicación del ADN del virus de la hepatitis B (VHB) inhibiendo la transcriptasa inversa de la polimerasa del virus de la hepatitis B (polimerasa del VHB). Sin embargo, cuando estos fármacos se administran durante 3 años, se produce un virus resistente al fármaco, en aproximadamente el 75 % de los pacientes lo que reduce su efecto terapéutico. Debido a este problema, es imposible tratar la infección por hepatitis B utilizando solo inhibidores de replicación de virus. Por esta razón, se intentó utilizar estos inhibidores junto con agentes interferones, aunque estos inhibidores no se utilizan actualmente debido a graves efectos secundarios.

40

Para un fin similar, se consideró una preparación de inmunoglobulina de hepatitis B (IGHB) que comprendía un anticuerpo del virus de la hepatitis B (VHB) aislado de sangre que tenía un título alto de anticuerpos. Sin embargo, existen problemas entre los que se incluyen la dificultad para obtener plasma, la posibilidad de que se produzca una infección vírica, baja actividad, altos costes y problemas similares, debido a que el anticuerpo de la preparación de IGHB está aislado y purificado del plasma.

45

En los últimos años, ha habido informes de virus mutantes capaces de impedir dichos anticuerpos, por ejemplo, un mutante que tiene una sustitución de glicina por arginina en la posición 145 de la proteína de superficie del virus de la hepatitis B (VHB). Además, han aparecido diversos mutantes capaces de impedir los anticuerpos. Por esta razón, es difícil que los agentes terapéuticos convencionales del virus de la hepatitis B muestren efectos terapéuticos satisfactorios.

50

Por tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar un anticuerpo para el tratamiento del virus de la hepatitis B (VHB), que se una específicamente a un epítipo del virus de la hepatitis B (VHB) en el que no se produzca mutación, de tal manera que la mutación no reduzca el efecto terapéutico del anticuerpo.

55

### Divulgación de la invención

Es un objeto de la presente invención, proporcionar una composición para la prevención o el tratamiento de una enfermedad causada por una infección por un virus mutante que tiene resistencia a un agente terapéutico convencional que se ha utilizado para la prevención o el tratamiento del virus de la hepatitis B (en lo sucesivo en el presente documento denominado "VHB").

60

Para conseguir el objeto anterior, la presente invención proporciona una composición de anticuerpos para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección por un VHB que tiene una mutación G145R del antígeno de superficie del VHB (AgsHB) o una mutación en el motivo YMDD (tirosina-metionina-aspartato-aspartato) de la polimerasa del ADN del VHB, comprendiendo la composición un anticuerpo que comprende: una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y una región variable de cadena ligera que

65

tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

Otras características y realizaciones de la presente invención serán más evidentes a partir de las siguientes descripciones detalladas y de las reivindicaciones que se adjuntan.

5

### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama gráfico que muestra la actividad neutralizante contra el VHB del anticuerpo de la presente invención en chimpancés.

10 La FIG. 2 muestra fotografías (véanse las FIGURAS 2a y 2c) y un diagrama gráfico (véase la FIGURA 2b), que muestra los resultados de un ensayo de inmunoprecipitación realizado para examinar si el anticuerpo de la presente invención se une al VHB de la sangre de pacientes con hepatitis B.

15 En la FIG. 2(a), 1: 0,1 µg del anticuerpo de la presente invención, 2: 0,5 µg del anticuerpo de la presente invención, 3: 1 µg del anticuerpo de la presente invención, 4: 5 µg del anticuerpo de la presente invención y 5: tampón PBS.

En la FIG. 2(c), 1: PBS, 2: tratado con 1 µg del anticuerpo humano contra toxoides tetánicos (TT-F9), 3: tratado con 1 µg de Hepabig, 4: tratado con 1 µg del anticuerpo humanizado contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HuS 10) y 5: tratado con 1 µg del anticuerpo de la presente invención.

20 La FIG. 3 es un conjunto de fotografías que muestran los resultados de un ensayo de tinción inmunohistoquímica realizado para examinar si los anticuerpos se unen a tejido hepático humano infectado con el VHB. Específicamente, la FIG. 3(a) es una fotografía que muestra que el anticuerpo de la presente invención se unió con fuerza a tejido hepático humano infectado con el VHB y la FIG. 3(b) es una fotografía que muestra que el anticuerpo de control de isotipo negativo no se unió al mismo tejido.

25 La FIG. 4 es un mapa genético del virus de la hepatitis B (VHB). El plásmido pHBV1.3-MBRI se construyó insertando una secuencia de 1,3 veces de un gen del VHB (subtipo adr) (n.º de Registro del Gene Bank DQ683578) (gen del VHB cadena arriba del potenciador I de un genoma del VHB y cadena debajo de una región de poliadenilación) en el sitio de la enzima de restricción PmeI de pcDNA3.1 (Invitrogen, USA).

30 La FIG. 5 muestra los resultados de un experimento realizado para examinar la actividad neutralizante de un anticuerpo contra un virus mutante G145R utilizando un modelo hidrodinámico de ratón e indica que el antígeno de superficie y las partículas víricas del VHB de tipo silvestre y del VHB mutante G145R estaban eliminados de la sangre del ratón.

### Mejor modo para llevar a cabo la invención

35 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle.

La presente invención se refiere a una composición de anticuerpos para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección por un VHB que tiene una mutación G145R del antígeno de superficie del VHB (AgSHB) o una mutación en YMDD (tirosina-metionina-aspartato-aspartato) de la polimerasa de ADN del VHB, comprendiendo la  
40 composición, como principio activo, un anticuerpo que comprende: una región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

45 En el presente documento se describe una composición de anticuerpos para la prevención o el tratamiento de una infección por un VHB que tiene una mutación G145R del antígeno de superficie del VHB (AgSHB) o una mutación en YMDD (tirosina-metionina-aspartato-aspartato) de una polimerasa de ADN del VHB, comprendiendo la composición un anticuerpo que comprende:

50 una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre una cualquiera de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 5; y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre una cualquiera de SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO: 10.

55 El anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede ser un anticuerpo contra un antígeno de superficie del VHB (AgSHB) que tiene una mutación G145R o una mutación en el motivo YMDD de la polimerasa de ADN, que se produce a partir de la línea celular HBAb-49 (KCLRF-BP-00054). La mutación G145R es una sustitución de glicina por arginina en la posición 145 de la proteína de superficie del VHB, a la que no se une la IGHB procedente de plasma, y el motivo YMDD se localiza en la región C terminal del gen de la polimerasa de ADN del virus de la hepatitis B y tiene una sustitución de metionina (M) por valina (V) o isoleucina (I) en la posición 552 de la secuencia de aminoácidos.

60 La composición de anticuerpo se utiliza para la prevención o el tratamiento de infección por un virus mutante resistente al agente terapéutico contra el VHB, lamivudina o adefovir dipivoxil.

65 Además, la composición de anticuerpos puede comprender adicionalmente un agente antivírico. El agente antivírico es preferentemente uno o más seleccionado de entre interferón, anticuerpos monoclonales contra el VHB, anticuerpos policlonales contra el VHB, análogos de nucleósido, inhibidores de la polimerasa de ADN y preparaciones de ARNip, pero sin limitarse a estos.

La composición de anticuerpos contiene preferentemente el anticuerpo a una concentración de 0,1-50 mg/ml. La presente invención también proporciona una formulación farmacéutica que contiene la composición de anticuerpos como principio activo. La formulación farmacéutica se administra preferentemente a mamíferos incluyendo seres humanos a una dosis de 0,001-10 mg/kg (de peso corporal).

5 La composición farmacéutica puede prepararse en una formulación farmacéutica de acuerdo con cualquier método convencional. En la preparación de la formulación, el anticuerpo se mezcla o diluye preferentemente con un transportador, o se incluye en un transportador. Cuando el transportador se utiliza como un diluyente, este puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como un vehículo, un excipiente o un medio para el principio activo. Por tanto, las formulaciones pueden estar en forma de un comprimido, una píldora, un polvo, una bolsita, un elixir, una suspensión, una emulsión, una solución, un jarabe, un aerosol, una cápsula de gelatina blanda y dura, una solución inyectable estéril, un polvo estéril envasado y similares.

15 Como ejemplos de transportadores, excipientes y diluyentes adecuados se incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, alginatos, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoatos, propilhidroxibenzoatos, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente cargas, agentes antiaglutinantes, agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes aromatizantes, emulsionantes, conservantes y similares. Las composiciones de la invención pueden formularse de acuerdo con cualquier método bien conocido en la técnica para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de su administración a un mamífero.

25 En un experimento realizado para demostrar la actividad neutralizante contra el VHB del anticuerpo de la presente invención utilizando chimpancés, se observó que los chimpancés no estaban infectados con el VHB durante un año después de la administración de una mezcla de VHB y del anticuerpo. En los chimpancés utilizados en un grupo de control, se observó que se producían las partículas de virus del VHB y que durante la fase de recuperación (véase la FIG. 1), se producía un anticuerpo contra el antígeno de superficie del VHB.

30 Además, mediante un ensayo de inmunoprecipitación se observó que el anticuerpo de la presente invención tenía una excelente capacidad para unirse al VHB de la sangre del paciente (véase la FIG. 2). Además, mediante un ensayo de tinción inmunohistoquímica se observó que el anticuerpo de la presente invención se unía con fuerza a tejido hepático humano infectado con VHB (véase la FIG. 3).

35 El anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede tener la capacidad de unirse al AgsHB, y neutralizar el AgsHB del VHB resistente a anticuerpos o puede tener la capacidad de escapar a anticuerpos que no pueden inhibirse mediante un inhibidor "convencional" de replicación de virus (lamivudina o adefovir dipivoxil) o a IGHB procedente de plasma. En un ejemplo de la presente invención, la capacidad de unión del anticuerpo se examinó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando sangre de un paciente que contenía un virus mutante en YMDD que tenía una mutación en YMDD en la transcriptasa inversa de la polimerasa del virus de la hepatitis B, que tenía resistencia a inhibidores de replicación de virus. Como resultado, se observó que el anticuerpo se unía con fuerza a todos los virus mutantes en YMDD (véase la Tabla 5 y la Tabla 6).

45 La principal característica del anticuerpo de la presente invención es su capacidad para unirse a, y neutralizar, un mutante que tiene una sustitución de glicina por arginina en la posición 145 de la proteína de superficie del VHB, que no puede neutralizarse mediante la IGHB procedente de plasma. Para verificar esta capacidad, se produjo un virus mutante utilizando un modelo hidrodinámico de ratón y se examinó si el anticuerpo tenía la capacidad de neutralizar el virus mutante producido. Como resultado, se observó que, en la sangre del modelo de ratón, tanto el AgsHB como el VHB estaban eliminados (véase la FIG. 5).

50 Se demostró que el anticuerpo de la presente invención se unía a virus de la hepatitis B (VHB) de pacientes que, después de un trasplante de hígado, eran recurrentes, y que todos virus VHB eran mutantes teniendo una sustitución de glicina por arginina en la posición 145 de la proteína de superficie del VHB (véase la Tabla 8).

55 Los resultados descritos anteriormente sugieren que el anticuerpo de la presente invención y una composición que lo comprende, pueden utilizarse de un modo eficaz para la prevención o el tratamiento de infección causada por un virus VHB mutante que tiene resistencia a agentes terapéuticos convencionales. Particularmente, puede observarse que el anticuerpo y la composición pueden ser muy eficaces cuando se utilizan para la prevención o el tratamiento de infección causada por el VHB mutante G145R o el VHB mutante en YMDD.

## 60 Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con mayor detalle con referencia a los ejemplos. Para un experto habitual en la materia será obvio que estos ejemplos solo tienen fines ilustrativos y que no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

65 Ejemplo 1: experimento realizado con chimpancés sobre la capacidad neutralizante del VHB

Para examinar si el anticuerpo de la presente invención tenía la capacidad de neutralizar el VHB *in vivo*, se realizó el siguiente experimento.

5 Un VHB con una  $CID_{50}$  (dosis infecciosa de chimpancé al 50 %) de 100 obtenido en la Hepatitis Research Foundation (USA) se colocó en tres tubos. El anticuerpo de la presente invención, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, se añadió a dos de los tres tubos en cantidades de 0,1 mg y 10 mg, respectivamente, y al tubo restante no se le añadió ningún anticuerpo. En cada uno de los tubos, la mezcla se ajustó a un volumen de 3 ml con tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato),  
10 después de lo cual la mezcla se dejó reaccionar a 37 °C durante 1 hora, y después a 4 °C durante una noche, seguido de congelación con nitrógeno líquido, preparando de este modo los materiales de ensayo.

Para un experimento realizado con animales, los materiales de ensayo se administraron por vía intravenosa a tres chimpancés, respectivamente, que nunca habían estado infectados con el virus VHB (véase la Tabla 1).  
15

Tabla 1

[Tabla 1]

Dosis de anticuerpo administrada a cada chimpancé					
		Sexo	Edad (años)	Peso (kg)	Dosis de anticuerpo
Controles	Chimpancé 1	Macho	4	12,2	-
Grupo de ensayo 1	Chimpancé 2	Macho	4	11,6	0,1 mg
Grupo de ensayo 2	Chimpancé 3	Hembra	4	10,8	10 mg

20 A intervalos de 1 semana durante un período que variaba de 1 semana después de la administración del anticuerpo a 8 semanas después de la administración del anticuerpo y a intervalos de 2 semanas después de la administración del anticuerpo, se recogió sangre de los chimpancés para medir los índices relacionados con la infección por VHB, incluyendo ADN del VHB, AgsHB (antígeno de superficie del VHB), anti HBs (anticuerpo contra el antígeno de superficie del VHB), anti HBc (anticuerpo contra el núcleo del VHB), ALT, AST y similares. Además, la seguridad *in vivo* del anticuerpo se analizó mediante análisis de sangre y orina.  
25

Adicionalmente, se midieron los cambios en el ADN del VHB, AgsHB y anti HBs de los chimpancés, y los resultados de las mediciones se muestran gráficamente en la FIG. 1.

30 Como se muestra en las Tablas 2, 3 y 4, como control, en el chimpancé 1, se observó infección por VHB, mientras que en los chimpancés 2 y 3, a los que se administró anticuerpo junto con VHB, no se observó infección por VHB, durante todo el período experimental. Dichos resultados revelan que el anticuerpo de la presente invención tiene una excelente capacidad para neutralizar el VHB. Además, al examinar la función hepática, en diversos exámenes hematológicos, en exámenes de orina y similares, no se observaron hallazgos anómalos especiales, lo que sugiere que el anticuerpo es inocuo *in vivo*.  
35

Tabla 2

[Tabla 2]

Medición de los índices de infección por el VHB (chimpancé 1)						
Tiempo desde la administración	ALT (unidades sf)	AST (unidades sf)	VHB PCR Log <sub>10</sub> (ADN mol/ ml)	AgsHB (EIA)	Anti HBs (EIA)	Anti HBc (EIA)
Antes de 1 semana	6	11	N			
Día de la administración	5	10	N			
Después de 1 semana	15	13	N			
Después de 2 semanas	6	16	N			
Después de 3 semanas	8	22	N			
Después de 4 semanas	2	6	N			
Después de 5 semanas	6	11	N			
Después de 6 semanas	5	12	N			
Después de 7 semanas	6	20	N			

ES 2 712 686 T3

Medición de los índices de infección por el VHB (chimpancé 1)						
Tiempo desde la administración	ALT(unidades sf)	AST (unidades sf)	VHB PCR Log <sub>10</sub> (ADN mol/ ml)	AgsHB (EIA)	Anti HBs (EIA)	Anti HBc (EIA)
Después de 8 semanas	7	18	N			
Después de 10 semanas	8	18	2,21	,015(-)		
Después de 12 semanas	10	23	2,43	,023(-)		
Después de 14 semanas	13	25	3,24	,064(-)		
Después de 16 semanas	12	18	3,47	,209(+)		
Después de 18 semanas	8	20	4,10	,600(+)		1,004(-)
Después de 20 semanas	8	13	4,50	> 2,000 (+)		1,264(-)
Después de 22 semanas	10	12	4,82	> 2,000 (+)	,056(-)	1,038(-)
Después de 24 semanas	15	18	N	0,03(-)	,085(-)	,0129(+)
Después de 28 semanas	23	22	N	N	> 2,000(+)	0,156(+)
Después de 32 semanas	19	18	N	N	> 2,000(+)	0,119(+)
Después de 36 semanas	21	19	N	N	> 2,000(+)	0,061(+)
Después de 40 semanas	7	23	N			
Después de 44 semanas	25, 24	19	N			
Después de 48 semanas	19	16	N			
Después de 51 semanas	28, 29	23	N			

Tabla 3

[Tabla 3]

Medición de los índices de infección por el VHB (chimpancé 2)					
Tiempo desde la administración	ALT(unidades sf)	AST (unidades sf)	VHB PCR Log <sub>10</sub> (ADN mol/ml)	Anti HBs (EIA)	Anti HBc (EIA)
Antes de 1 semana	26	22	N		
Día de la administración	9	26, 25	N		
Después de 1 semana	10	23	N		
Después de 2 semanas	6	24	N		
Después de 3 semanas	9	25	N		
Después de 4 semanas	4	18	N	(-)	
Después de 5 semanas	9	37, 37	N	(-)	
Después de 6 semanas	5	25	N	(-)	
Después de 7 semanas	5	9	N	(-)	
Después de 8 semanas	5	13	N	(-)	
Después de 10 semanas	8	17	N		
Después de 12 semanas	14	21	N		
Después de 14 semanas	17	23	N		
Después de 16 semanas	15	19	N		
Después de 18 semanas	22	16	N		
Después de 20 semanas	20	16	N		
Después de 22 semanas	13	19	N		
Después de 24 semanas	24	22	N		
Después de 28 semanas	28, 28	25	N		
Después de 32 semanas	24	26	N		
Después de 36 semanas	23	25	N		
Después de 40 semanas	11	20	N		

ES 2 712 686 T3

Medición de los índices de infección por el VHB (chimpancé 2)					
Tiempo desde la administración	ALT(unidades sf)	AST (unidades sf)	VHB PCR Log <sub>10</sub> (ADN mol/ml)	Anti HBs (EIA)	Anti HBc (EIA)
Después de 44 semanas	27, 27	17	N		
Después de 48 semanas	18	13	N	N	
Después de 51 semanas	30, 29	24	N		N

Tabla 4

[Tabla 4]

Medición de los índices de infección por el VHB (chimpancé 3)						
Tiempo desde la administración	ALT(unidades sf)	AST (unidades sf)	VHB PCR Log <sub>10</sub> (ADN mol/ ml)	AgsHB (EIA)	Anti HBs (EIA)	Anti HBc (EIA)
Antes de 1 semana	5	18	N			
Día de la administración	11	22	N			
Después de 1 semana	7	18	N			
Después de 2 semanas	5	20	N			
Después de 3 semanas	13	31, 31	N			
Después de 4 semanas	9	19	N	(-)	(-)	
Después de 6 semanas	14	26	N	(-)	(-)	
Después de 7 semanas	7	15	N	(-)	(-)	
Después de 8 semanas	10	19	N	(-)	(-)	
Después de 10 semanas	20	16	N			
Después de 12 semanas	13	19	N			
Después de 14 semanas	16	21	N			
Después de 16 semanas	16	24	2,24*, N, N			
Después de 18 semanas	21	24	N			
Después de 20 semanas	14	22	N			
Después de 22 semanas	16	19	N			
Después de 24 semanas	21	17	N			
Después de 28 semanas	18	21	N			
Después de 32 semanas	23	16	N			
Después de 36 semanas	22	17	N			
Después de 40 semanas	16	23	N			
Después de 44 semanas	24, 25	15	2,24*, N, N			
Después de 48 semanas	20	19	N		N	
Después de 51 semanas	28, 31	22	N			N

(\* dudoso (+))

Ejemplo 2: examen mediante inmunoprecipitación de la capacidad de unión del anticuerpo al VHB

Mediante inmunoprecipitación (véase la FIG. 2) se examinó si el anticuerpo de la presente invención, que comprendía una región variable de cadena pesada que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una  
 5 región variable de cadena ligera que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, se unía al VHB en la sangre de un paciente con hepatitis B (proporcionada por la Ajou University School of Medicine).

(1) Preparación de sangre de un paciente con hepatitis B

10 Para retirar la inmunoglobulina de la sangre, se dejaron reaccionar 1.000 µl de una dilución de sangre con factor 10 de un paciente con hepatitis B en tampón de BSA/PBS al 0,2 % con un anticuerpo de cabra anti IgG humana (específica de Fc) conjugado con agarosa (Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ).

(2) Reacción de unión entre el anticuerpo y el anticuerpo de cabra anti IgG humana conjugado con agarosa

15 Se mezclaron entre sí 10 µl del anticuerpo de la presente invención (0,1, 0,5, 1 y 5 µg), solución de PBS y 50 µl de un anticuerpo de cabra anti IgG humana conjugado con agarosa (Research Diagnostics) y se dejaron reaccionar con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, y después, a esto, se añadieron 10 mg de inmunoglobulina humana (IV-Globulina-S, Green Cross) y se dejó reaccionar con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora  
 20 para bloquear la parte de unión del anticuerpo de cabra anti IgG humana conjugado con agarosa. Para realizar una comparación, se utilizó 1 µg de cada uno del anticuerpo contra el VHB de sangre (Hepabig), TT-F9 (anticuerpo humano contra el toxoide tetánico) y HuS 10 (anticuerpo humanizado contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B) de la misma manera que la indicada anteriormente.

25 (3) Reacción de unión entre anticuerpo de cabra anti IgG humana conjugado con agarosa unido a anticuerpo y la sangre del paciente

Se mezclaron 200 µl de la sangre preparada en el Ejemplo 2-(1) con anticuerpo de cabra anti IgG humana conjugado con agarosa unido al anticuerpo preparado en el Ejemplo 2-(2), y la mezcla se agitó a temperatura  
 30 ambiente durante 1 hora para permitir que el anticuerpo reaccionara con el VHB de la sangre del paciente.

(4) Examen de precipitación del VHB

La solución de reacción del Ejemplo 2-(3) se centrifugó, el sobrenadante se recogió y el VHB existente en el sobrenadante se midió utilizando un Ensayo de control Cobas Amplicor del VHB (v2.0; Roche Diagnostics, Basel, Suiza).

Después de la centrifugación, la agarosa restante se lavó 10 veces con tampón BSA/PBS al 0,2 % y después se añadió a 100 µl del mismo tampón, y a esto se añadieron 5 µl de SDS al 10 %, 2 µl de EDTA 50 mM y 200 µg de  
 40 proteasa K (Sigma-Aldrich) y se dejó reaccionar a 55 °C durante 30 minutos. Después, el sobrenadante se recogió y el ADN se aisló del mismo utilizando un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania), después de lo cual el ADN específico del VHB se amplificó mediante PCR utilizando una premezcla LiquiMix GM de PCR (Neurotics, Corea), el cebador M3 (SEQ ID NO: 11) y el cebador POL8 (SEQ ID NO: 12). En su interior, la PCR se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 55 °C durante 5 minutos y después 35 ciclos de 1  
 45 minuto a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de extensión final a 72 °C durante 10 minutos. El ADN amplificado se analizó en gel de agarosa al 1,0 %. Como controles, se utilizó el anticuerpo humanizado contra el VHB y el anticuerpo humano contra el toxoide tetánico (Green Cross, Corea). Los resultados del análisis se muestran en la FIGURA 2.

50 Como se muestra en las FIGS. 2(a) y 2(b), la cantidad de precipitación del VHB aumentaba a medida que lo hacía la cantidad de anticuerpo utilizada en la reacción de inmunoprecipitación, y la cantidad de VHB en el sobrenadante después de la reacción de inmunoprecipitación aumentaba a medida que disminuía la cantidad del anticuerpo. Además, la cantidad de precipitación del VHB aumentaba a medida que aumentaba la cantidad de anticuerpo. Además, como se muestra en la FIG. 2(c), cuando se utilizaba la misma cantidad de anticuerpo, el anticuerpo contra  
 55 el VHB (Hepabig) purificado de sangre no precipitaba con el VHB debido a su baja capacidad para unirse al VHB, mientras que el anticuerpo de la presente invención precipitaba con VHB debido a su alta capacidad para unirse al VHB.

Ejemplo 3: examen de la actividad de unión del anticuerpo al VHB mediante inmunohistoquímica

60 Mediante inmunohistoquímica, se examinó si el anticuerpo de la presente invención, que comprendía una región variable de cadena pesada que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, se unía a tejido infectado por VHB.

65 Un portaobjetos congelado, que tenía tejido de hígado humano infectado con VHB (Spring Bioscience, Fremont, CA, USA, catálogo n.º STS-025), se fijó con acetona y se dejó reaccionar en metanol con una dilución de peróxido de

hidrógeno. Después, el portaobjetos con el tejido se dejó reaccionar con suero normal de conejo, seguido de reacciones secuenciales con avidina y biotina. Después, el portaobjetos con el tejido se dejó reaccionar con cada uno de: el anticuerpo de la presente invención y una inmunoglobulina humana de isotipo (anticuerpo de control negativo de isotipo IgG1; Sigma-Aldrich), que se marcaron con biotina utilizando un kit de biotilación de inmunosonda (Sigma-Aldrich), y el portaobjetos con el tejido se dejó reaccionar con Complejo de estreptavidina-AB/HRP (Dako, Holanda). Cada uno de los productos de reacción se tiñó con tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina (DAB) y se realizó tinción con contraste con hematoxilina y los resultados de la tinción se muestran en las FIG. 3(a) y 3(b).

Como puede observarse en las FIG. 3(a) y 3(b), el anticuerpo de control negativo de isotipo (véase la FIG. 3(b)) no se unió al tejido de hígado humano infectado con VHB, mientras que el anticuerpo de la presente invención (véase la FIG. 3(a)) se unió con fuerza al tejido de hígado humano infectado con VHB.

Ejemplo 4: examen de la capacidad de unirse al mutante de resistencia al inhibidor de replicación del VHB

Para examinar si el anticuerpo de la presente invención, que comprendía una región variable de cadena pesada que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que tenía una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se unía, muestras de sangre de pacientes (obtenidas en el Hospital St. Mary, Universidad Católica) se dejaron reaccionar en una placa de 96 pocillos cubierta con el anticuerpo de la presente invención y la detección se realizó en un kit de Genedia AgsHB ELISA 3.0 (Green Cross MS, Corea) utilizando un anticuerpo de cabra anti AgsHB conjugado con peroxidasa. Como resultado, como se muestra en la Tabla 5 a continuación, el anticuerpo de la presente invención se unió con fuerza al AgsHB de todos los virus mutantes en YMDD. Por tanto, como puede observarse en la Tabla 5, el anticuerpo de la presente invención puede unirse a virus mutantes en YMDD en la sangre de pacientes con hepatitis B crónica (HBC).

Tabla 5

[Tabla 5]

Resultados del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para determinar la capacidad del anticuerpo de la presente invención para unirse a virus mutantes en YMDD			
Muestra	A450	Muestra	A450
(-)Control	0,063	YMDD n.º 9	0,834
	0,09	YMDD n.º 10	1,134
	0,058	YMDD n.º 11	0,786
(+)Control	0,488	YMDD n.º 12	0,876
	0,524	YMDD n.º 13	1,066
YMDD n.º 1	1,16	YMDD n.º 14	0,815
YMDD n.º 3	0,957	YMW(+)	0,747
YMDD n.º 4	1,019	CSY(+)	1,023
YMDD n.º 5	0,356	SYW(-)	0,073
YMDD n.º 6	1,043	Q101K, 1126N, G145A	0,857
YMDD n.º 7	1,104	BSA(-)	0,251
YMDD n.º 8	1,143		0,263

Ejemplo 5: examen de la capacidad para unirse a diversos mutantes de AgsHB procedentes de pacientes con hepatitis B crónica, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular

Se analizaron mutantes de antígeno de superficie del virus (AgsHB) procedentes de 100 pacientes con hepatitis B crónica (HBC), de 100 pacientes con cirrosis hepática (CH) y de 100 pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC) para examinar si el anticuerpo de la presente invención, que comprendía una región variable de cadena pesada que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, se unía a todos los virus mutantes. Las muestras de sangre de los pacientes (obtenidas en el Hospital St. Mary, Universidad Católica) se dejaron reaccionar en una placa de 96 pocillos cubierta con el anticuerpo de la presente invención y la detección se realizó en un kit de Genedia AgsHB ELISA 3.0 (Green Cross MS, Corea) utilizando anticuerpo de cabra anti AgsHB conjugado con peroxidasa. Como resultado, como se muestra en la Tabla 6 a continuación, el anticuerpo de la presente invención se unió con fuerza a todos los mutantes de AgsHB procedentes de los pacientes.

Tabla 6

[Tabla 6]

Resultados de medición de la unión del anticuerpo de la presente invención a virus típicos mutantes de antígeno de superficie			
Número de paciente	ELISA	Título NDA	mutación S(aminoácido 124-147)
HC 15	3,059	3,864 * 10 <sup>3</sup>	L110M, T113S, S114T, L126T, G130D, T131D, S143T, R160K
HC 32	2,949	10 <sup>8</sup>	P142T
HC 33	2,833	10 <sup>8</sup>	L126S
HC 34	1,37	56646 * 10 <sup>1</sup>	Y100S, L126S, T131N, M133T
HC 62	3,085	10 <sup>8</sup>	T131L, R160K
HC 75	2,933	10 <sup>8</sup>	L126S, T131N, M133T
CH 32	2,726	< 2,5pcr	P127R, Q129K, T131A, M133L, T140S, K141R, P142S, C147Y, A159W
CH 53	3,497	< 2,5pcr	L126T
CH 59	3,633	< 2,5pcr	T131P
CH 98	3,553	9761 * 10 <sup>3</sup>	G130N
CHC 1	3,611	11943 * 10 <sup>3</sup>	Q101K, L126T
CHC 11	3,358	> 100000 * 10 <sup>3</sup>	L126T, G130N, R160K
CHC 22	3,517	270,8 * 10 <sup>3</sup>	Y100C, L126T
CHC 94	3,556	39687 * 10 <sup>3</sup>	T123A, S143W

[HC: (hepatitis crónica, 100 pacientes); CH: cirrosis hepática, 100 pacientes); CHC: (carcinoma hepatocelular, 100 pacientes)]

Ejemplo 6: examen del efecto *in vivo* del anticuerpo en ratones con hepatitis B aguda inducida

- 5 En este ejemplo, se crearon ratones C57BL6 que mostraban síntomas similares a los de la hepatitis B aguda, inyectando ADN del VHB en los ratones mediante inyección hidrodinámica y se midió la capacidad del anticuerpo de la presente invención, que comprendía una región variable de cadena pesada y que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, para neutralizar el antígeno de superficie de la hepatitis B (AgsHB).

10 Los ratones C57BL6 utilizados, eran ratones hembra de 26 semanas de vida (peso: aproximadamente 20 g; adquiridos en Charles Liver Laboratory, MA, USA) y se dividieron en 4 grupos, consistiendo cada uno de ellos en 5 ratones, como se muestra en la Tabla 7 a continuación. Se diluyeron 20 µg de un vector pHBV-MBRI (Shin *et al.*, Virus Research 119, 146-153, 2006; véase la FIG. 4) obtenido, insertando en pcDNA3.1 (Invitrogen, USA), una secuencia de nucleótidos de ADN del VHB, a un volumen que correspondía a un 9,5 % del peso del ratón y se inyectaron en la vena de la cola de cada uno de los ratones a una velocidad de 0,3 ml/min para inducir una hepatitis B aguda en los ratones. Después de 24 horas, se inyectaron 0,2 ml del material de ensayo mostrado en la Tabla 7 a continuación, en la vena de la cola de cada uno de los ratones. Antes de la inyección del material de ensayo (0 h) y a las 24 y 48 horas después de la inyección, se extrajo sangre de los ratones, y el suero se separó de la misma y se diluyó 10 veces con suero de cabra, después de lo cual, utilizando el kit de Genedia AgsHB ELISA 3.0 (Green Cross MS, Corea), se midió la concentración del AgsHB en la sangre.

Tabla 7

[Tabla 7]

Diseño experimental para medir la capacidad para neutralizar el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (AgsHB) en sangre de ratón			
Grupo	Número	Material de ensayo y vía de la dosis	Dosis
AgsHB (ayw)	5	PBS, inyección intravenosa	0,2 ml
AgsHB (ayw)	5	rIGHB 0,1 mg (400 UI), inyección intravenosa	0,2 ml
G145R	5	PBS, inyección intravenosa	0,2 ml
G145R	5	rIGHB 0,1 mg (400 UI), inyección intravenosa	0,2 ml

25 Los resultados de la medición se muestran en la FIG. 5. Como puede observarse en la FIG. 5(a), en el grupo de control al que se inyectó PBS por vía intravenosa entre los grupos de virus de tipo silvestre, la concentración de AgsHB en sangre y la replicación de ADN del VHB, se mantuvieron a los niveles pico de hasta 48 horas, mientras que en el grupo al que se le administraron 0,1 mg del anticuerpo contra rIGHB, el AgsHB en sangre y la replicación de ADN del VHB no se detectaron sustancialmente después de 24 horas hasta 48 horas debido a la neutralización completa. Además, como puede observarse en la FIG. 5(b), en el grupo de control al que se administró PBS por vía intravenosa entre los grupos de virus mutantes G145R, la concentración de AgsHB en sangre y el ADN del VHB se mantuvieron a los niveles pico hasta 48 horas, mientras que en el grupo al que se administraron 0,1 mg del anticuerpo, el AgsHB en sangre y la replicación del ADN del VHB no se detectaron sustancialmente después de 24

horas hasta 48 horas debido a la neutralización completa. Por tanto, los resultados descritos anteriormente, indican que el anticuerpo de la presente invención, que comprendía una región variable de cadena pesada que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, tiene un efecto de neutralización muy excelente contra los antígenos de superficie del VHB mutante G145R y de tipo silvestre. Además, el número de copias de ADN del VHB en cada uno de los grupos se cuantificó utilizando PCR en tiempo real y como resultado, se detectó ADN vírico en los VHB tanto mutante G145R como de tipo silvestre. Esto sugiere que el anticuerpo de la presente invención tiene un efecto de neutralización muy excelente contra los VHB tanto mutante G145R como de tipo silvestre.

10 Ejemplo 7: examen de la capacidad para unirse a mutantes G145R del AgsHB procedentes de pacientes en los que después de un trasplante de hígado, el VHB reapareció debido a mutantes G145R

15 Se examinó la capacidad del anticuerpo de la presente invención, que comprendía una región variable de cadena pesada que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, para unirse a mutantes G145R del AgsHB procedentes de pacientes que tenían un VHB que reapareció debido a una mutación G145R en el AgsHB. Se permitió que las muestras de sangre de los pacientes reaccionaran en una placa de 96 pocillos cubierta con el anticuerpo de la presente invención y la detección se realizó en un kit Genedia AgsHB ELISA 3.0 (Green Cross MS, Corea) utilizando un anticuerpo de oveja anti AgsHB conjugado con peroxidasa. Como resultado, como puede observarse en la Tabla 8 a continuación, el anticuerpo se unió con fuerza a todos los mutantes G145R del AgsHB.

Tabla 8

[Tabla 8]

Resultados de la medición de la unión del anticuerpo de la presente invención con todos los mutantes del AgsHB procedentes de pacientes		
Muestra	Anticuerpo inmovilizado rIGHB	Mutación
S**	2,526	G145R
C**	2,471	G145R
B**	3,078	G145R
L**	2,717	G145R
W**	2,660	G145R
Control negativo	0,015	G145R
Control positivo	1,048	G145R

25 **Aplicabilidad industrial**

Como se ha descrito anteriormente, la composición de anticuerpos de la presente invención, puede utilizarse de un modo eficaz para la prevención o el tratamiento de una infección por virus mutantes que tienen resistencia a agentes terapéuticos convencionales. Particularmente, puede utilizarse de un modo muy eficaz para la prevención o el tratamiento de infección con el VHB mutante G145R o el VHB mutante en el motivo YMDD.

30 Aunque la presente invención se ha descrito con detalle con referencia a las características específicas, para el experto en la técnica será obvio que esta descripción sea solo para una realización preferida y que no limita el alcance de la presente invención. Por tanto, el alcance sustancial de la presente invención vendrá definido por las reivindicaciones adjuntas.

35 **Listado de secuencias, texto libre**

Archivo adjunto.

- 40 <110> GREEN CROSS CORPORATION
- <120> Una composición de anticuerpos para la prevención o el tratamiento de una infección por un virus de la hepatitis B mutante
- 45 <130> PP-B1232
- <150> KR10-2012-0075063
- 50 <151> 10-07-2012
- <160> 12
- <170> KopatentIn 2.0

ES 2 712 686 T3

<210> 1  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> región variable de la cadena H del anticuerpo humano

10 <400> 1

```

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

Ser
  
```

15 <210> 2  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> región variable de la cadena H del anticuerpo humano

20 <400> 2

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

ES 2 712 686 T3

```

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

```

Ser

5 <210> 3  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> región variable de la cadena H del anticuerpo humano

<400> 3

```

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

```

15 <210> 4  
 <211> 117

ES 2 712 686 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> región variable de la cadena H del anticuerpo humano

<400> 4

```

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly His Thr Asn Tyr Ala Arg Lys Phe
      50                55                60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
      115
  
```

10 <210> 5  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> región variable de la cadena H del anticuerpo humano

20 <400> 5

ES 2 712 686 T3

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

5 <210> 6  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> región variable de la cadena L del anticuerpo humano  
 <400> 6

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

15 <210> 7  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>

ES 2 712 686 T3

<223> región variable de la cadena L del anticuerpo humano

<400> 7

```

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

```

5

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable de la cadena L del anticuerpo humano

15 <400> 8

```

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

```

20

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 712 686 T3

<220>  
<223> región variable de la cadena L del anticuerpo humano

5 <400> 9

```

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

10 <210> 10  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> región variable de la cadena L del anticuerpo humano

<400> 10

```

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

20 Lys Arg

<210> 11

# ES 2 712 686 T3

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

5 <220>  
<223> cebador M3

<400> 11  
ctggaggag ttggggagg agatt 25

10 <210> 12  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> cebador POL8

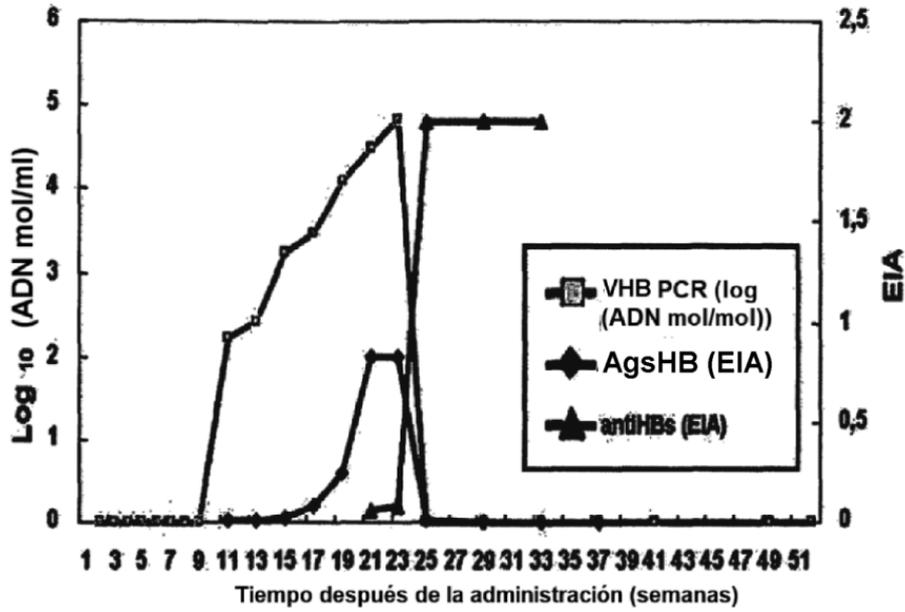
<400> 12  
aggatagaac cttagcaggc 19

20

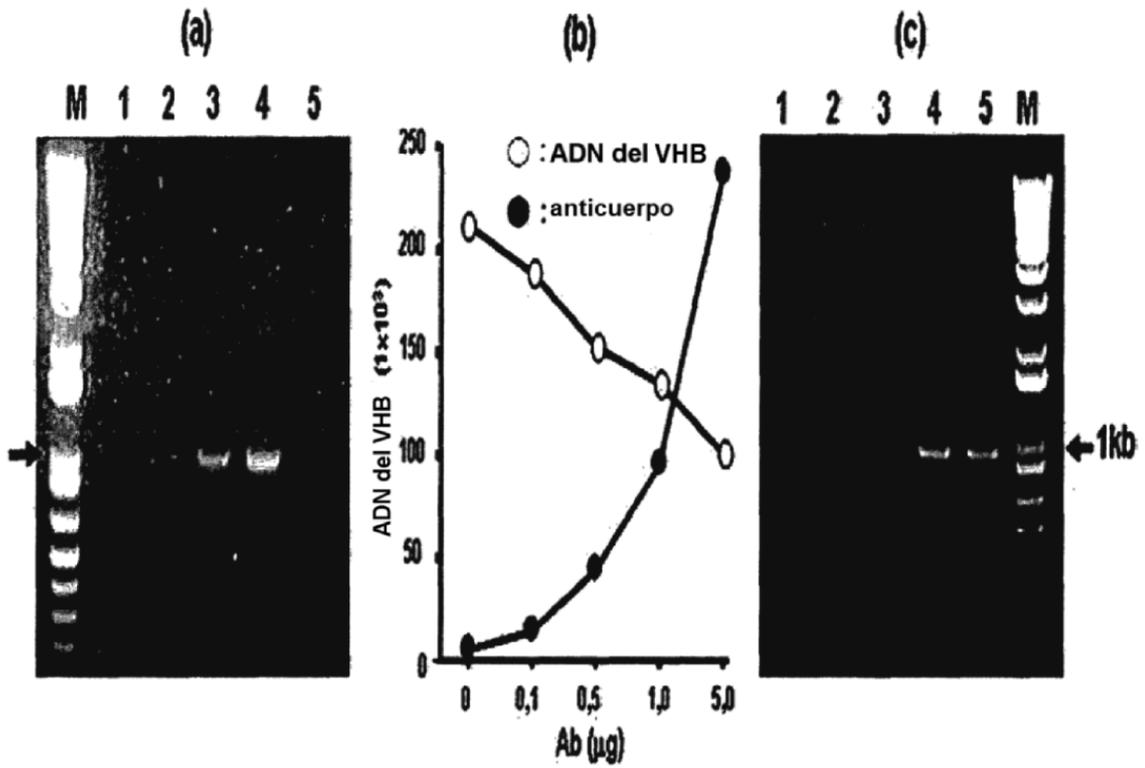
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición de anticuerpos para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección por un VHB que tiene una mutación G145R del antígeno de superficie del VHB (AgsHB) o una mutación en YMDD (tirosina-metionina-aspartato-aspartato) de la polimerasa de ADN del VHB, comprendiendo la composición, como principio activo, un anticuerpo que comprende: una región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y una región variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
- 10 2. La composición de anticuerpos para el uso de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un agente antivírico.
- 15 3. La composición de anticuerpos para el uso de la reivindicación 2, en la que el agente antivírico comprende uno o más seleccionados del grupo que consiste en interferón, anticuerpos monoclonales anti VHB, anticuerpos policlonales anti VHB, análogos de nucleósido, inhibidores de polimerasa de ADN, y preparaciones de ARNip.
- 20 4. La composición de anticuerpos para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la mutación YMDD es una mutación M552V o M552I.
- 25 5. La composición de anticuerpos para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el virus es un virus de la hepatitis B (VHB) mutante, resistente a lamivudina, adefovir dipivoxil o a IGHB (inmunoglobulina de la hepatitis B).
- 30 6. La composición de anticuerpos para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende el anticuerpo a una concentración de 0,1-50 mg/ml.
- 35 7. Una formulación farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección con un VHB que tiene una mutación G145R del antígeno de superficie del VHB (AgsHB) o una mutación YMDD (tirosina-metionina-aspartato-aspartato) de la polimerasa de ADN del VHB, que contiene, como principio activo, la composición de anticuerpos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 40 8. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 7, que adicionalmente comprende uno o más seleccionados del grupo que consiste en transportadores, excipientes y diluyentes.
9. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 7 u 8, en la que la formulación está en la forma seleccionada del grupo que consiste en un comprimido, una píldora, un polvo, una bolsita, un elixir, una suspensión, una emulsión, una solución, un jarabe, un aerosol, una cápsula de gelatina blanda y dura, una solución inyectable estéril y un polvo estéril envasado.
10. La formulación farmacéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que la formulación farmacéutica se administra a mamíferos a una dosis de 0,001-10 mg/kg.

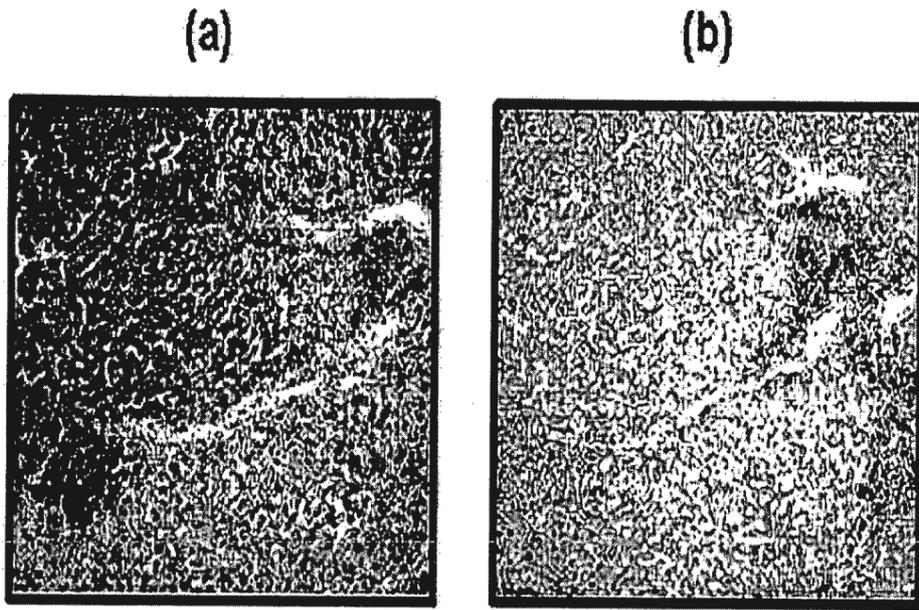
[Fig. 1]



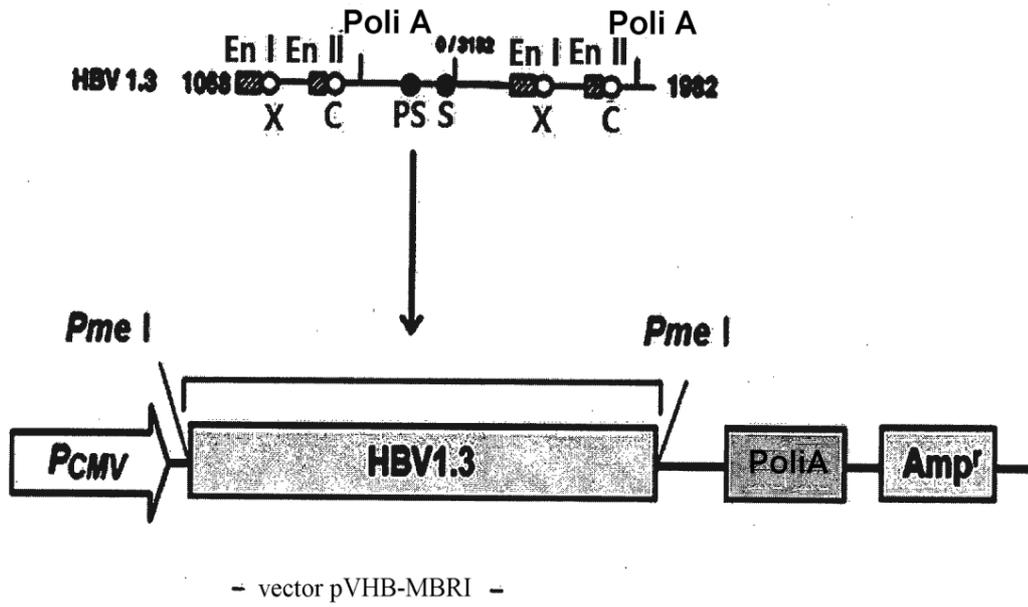
[Fig. 2]



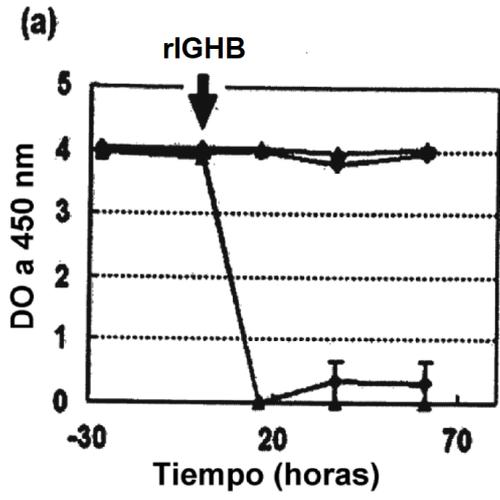
[Fig. 3]



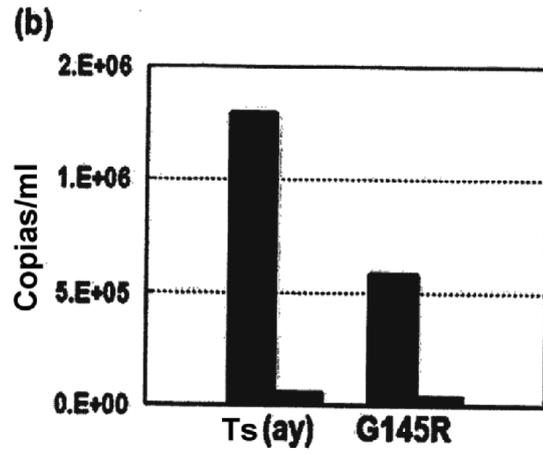
[Fig. 4]



[Fig. 5]



- ◆ AgsHB (ay) + PBS
- ◆ AgsHB (ay) + rIGHB 400 UI
- ▲ G145R + PBS
- ▲ G145R + rIGHB 400 UI



- AgsHB (ay) + PBS
- AgsHB (ay) + rIGHB 400 UI
- G145R + PBS
- G145R + rIGHB 400 UI