(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 728 095**

(51) Int. CI.:

C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2009 E 15196615 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3048115**

(54) Título: **Anticuerpos monoclonales para los virus del Ébola y Marburgo**

(30) Prioridad:

01.02.2008 US 25491 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2019

(73) Titular/es:

HER MAJESTY THE QUEEN IN RIGHT OF CANADA AS REPRESENTED BY THE MINISTER OF HEALTH (50.0%)
1015 rue Arlington Piece T2420
Winnipeg, Manitoba R3E 3P6/ CA, CA y
JONES, STEVEN (50.0%)

(72) Inventor/es:

JONES, STEVEN;
QIU, XIANGGUO;
FELDMANN, HEINZ y
STROEHER, UTE

(74) Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

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 monoclonales para los virus del Ébola y Marburgo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los virus del Ébola y Marburgo son virus altamente patógenos y virulentos que causan fiebre hemorrágica rápidamente mortal en los seres humanos.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende anticuerpos monoclonales que se unen a la glucoproteína del virus del Ébola como se define en las reivindicaciones adjuntas al presente documento.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de diagnóstico que comprende detectar la presencia de un antígeno del virus del Ébola dentro de una muestra con la composición de la invención.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para preparar la composición de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas al presente documento.

TÉCNICA ANTERIOR

El documento WO2004/018649 describe catorce MAb, de los cuales 10 eran protectores en ratones. Algunos de los MAb protectores (13F6, 6D8, 12B5, 13C6 y 6D3) fueron eficaces cuando se administraron hasta 2 días después de la exposición.

Jones, Steven, Feldmann, Heinz, "Therapeutic Antibodies to Ebola and Marburg Viruses", Google, (20060613), URL: Las actas del Simposio de verano CTRI de 2006 hacen referencia a anticuerpos monoclonales (mAb) contra los virus del Ébola y Marburgo, y su uso como profilaxis posterior a la exposición para evitar enfermedades graves en las personas expuestas a los virus.

SOLTES *ET AL.*, "On the influence of vector design on antibody phage display", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 127(4) (2006), páginas 626-637, describen el uso de la presentación en fagos en la generación de anticuerpos monoclonales.

CHRIS DRUAR *ET AL.*, "Analysis of the expressed heavy chain variable-region genes of Macaca fascicularis and isolation of monoclonal antibodies specific for the Ebola virus' soluble glycoprotein", IMMUNOGENETICS, vol. 57(10) (2005), páginas 730-738, describen diversos anticuerpos monoclonales específicos contra la glucoproteína soluble del virus del Ébola.

TAKADA, A. *ET AL.*, "Protective efficacy of neutralizing antibodies against Ebola virus infection", VACCINE, (2007), vol. 25, páginas 993-999, describen diversos anticuerpos neutralizantes contra el virus del Ébola y su potencial utilidad terapéutica en el tratamiento posterior a la exposición de las infecciones por el virus del Ébola.

SHAHHOSSEINI, S. *ET AL.*, "Production and characterization of monoclonal antibodies against different epitopes of Ebola virus antigens", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, (2007), vol. 143, páginas 29-37, describen la producción y caracterización por ELISA y análisis mediante inmunoelectrotransferencia de diversos anticuerpos monoclonales contra diferentes epítopos de antígenos del virus del Ébola.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones infectados por MA-ZEBOV y tratados con MAb 1 día después de la infección. Curva de supervivencia de ratones infectados por el virus de MA-Ébola tratados con 100 µg de MAb. Se trató por vía intraperitoneal a los ratones con 100 µg de cada MAb el día 1. Los ratones de control recibieron volúmenes iguales de PBS.

Figura 2 Cambios en el peso de cobayas infectadas por GPA-Ébola tratadas con MAb. Cambios en el peso de cobayas infectadas por virus tratadas con cóctel de MAb. Se trató por vía intraperitoneal a las cobayas con 5D2, 5E6, 7C9, 7G4 o 10C8 (3 mg/tratamiento) el día 1 y 4G7 + 1H3 + 2G4 [(2 mg + 1 mg + 1 mg)/tratamiento] el día 2. Las cobayas de control recibieron un volumen igual de PBS. Los resultados se muestran como las medias y desviaciones estándar de 6 cobayas.

Figura 3 Cambios en el peso de cobayas infectadas por GPA-Ébola tratadas con MAb. Cambios en el peso de cobayas infectadas por virus tratadas con cóctel de MAb. Se trató por vía intraperitoneal a las cobayas con 5D2, 5E6, 7C9, 7G4 o 10C8 (3 mg/tratamiento) el día 1 y 4G7 + 1H3 + 2G4 [(2 mg + 1 mg + 1 mg)/tratamiento] el día 2. Las cobayas de control recibieron un volumen igual de PBS. Los resultados se muestran como el peso del grupo de 6 cobayas.

Figura 4 Inmunoprecipitación. Se transfectaron células 293T con pCAGGS-ZEbovGP1,2 usando Fugene 6. Después de 48 horas, se recogieron las células y se lavaron 2X con PBS frío antes de lisarlas con tampón RIPA 2X. Después de clarificar el lisado celular, se le añadió 100 µg de proteína a cada perla de proteína A+G acoplada a McAb (5 µg). Las muestras de IP se procesaron en SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a la membrana Hybond-P. La transferencia se sondó con anti-EBOV-GP1 de ratón.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento se puede usar en la práctica o pruebas de la presente invención, ahora se describen los procedimientos y materiales preferentes.

DEFINICIONES

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo neutralizante" se refiere a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, que puede romper una partícula vírica formada o inhibir la formación de una partícula vírica o evitar la unión a o la infección de células de mamíferos por una partícula vírica.

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo de diagnóstico" o "anticuerpo de detección" o "anticuerpo para detectar" se refiere a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, que puede detectar la presencia de una diana antigénica dentro de una muestra. Como apreciará un experto en la técnica, dichos anticuerpos de diagnóstico tienen preferentemente una alta especificidad por su diana antigénica.

Como se usa en el presente documento, "anticuerpos humanizados" se refiere a anticuerpos con inmunogenicidad reducida en humanos.

Como se usa en el presente documento, "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos con inmunogenicidad reducida en humanos construidos mediante la unión genética de una región variable no humana a dominios constantes humanos.

En el presente documento se describen una serie de anticuerpos monoclonales contra los virus del Ébola y Marburgo. Específicamente, se desarrollaron antígenos usando un vector de replicación vivo del virus de la estomatitis vesicular descrito en la solicitud PCT PCT/CA03/001125.

El sistema de administración de vacunas basado en VSV se utilizó para desarrollar anticuerpos monoclonales en ratones.

Específicamente, en el presente documento se describen los anticuerpos monoclonales 1H3, 2G4, 4G7, 5D2, 5E6, 7C9, 7G4 y 10C8. Como se analiza a continuación, 1H3 comprende una cadena pesada de 1H3 (SEQ ID NO: 1) y una cadena ligera de 1H3 (SEQ ID NO: 2); 2G4 comprende una cadena pesada de 2G4 (SEQ ID NO: 3) y una cadena ligera de 2G4 (SEQ ID NO: 4); 4G7 comprende una cadena pesada de 4G7 (SEQ ID NO: 5) y una cadena ligera de 4G7 (SEQ ID NO: 6); 5D2 comprende una cadena pesada de 5D2 (SEQ ID NO: 7) y una cadena ligera de 5D2 (SEQ ID NO: 8); 5E6 comprende una cadena pesada de 5E6 (SEQ ID NO: 9) y una cadena ligera de 5E6 (SEQ ID NO: 10); 7C9 comprende una cadena pesada de 7C9 (SEQ ID NO: 11) y una cadena ligera de 7C9 (SEQ ID NO: 12); 7G4 comprende una cadena pesada de 7G4 (SEQ ID NO: 13) y una cadena ligera de 7G4 (SEQ ID NO: 14); y 10C8 comprende una cadena ligera de 10C8 (SEQ ID NO: 16) y una cadena pesada de 10C8 (SEQ ID NO: 15).

Estos anticuerpos también parecen tener una alta afinidad y avidez por las glucoproteínas del virus del Ébola, lo que significa que se podrían usar como herramientas de diagnóstico altamente sensibles.

Por ejemplo, como se muestra en la figura 1, los ratones infectados por MA-ZEBOV y posteriormente tratados con los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente mostraron un incremento de la supervivencia en comparación con los ratones tratados con PBS. Los resultados se resumen en las tablas 1 y 2.

Las figuras 2 y 3 muestran cambios de peso en cobayas tratadas con anticuerpos monoclonales o mezclas de los mismos después de la infección. Como se puede observar, las cobayas tratadas con los anticuerpos monoclonales mostraron un peso consecuente, mientras que las tratadas con PBS mostraron un adelgazamiento significativo. Los resultados se resumen en la tabla 3.

Siguen las secuencias de nucleótidos de las cadenas pesada y ligera de 1H3, 2G4, 4G7, 5D2, 5E6, 7C9, 7G4 y 10C8. Como apreciará un experto en la técnica, las secuencias de aminoácidos de estos anticuerpos se pueden deducir fácilmente a partir de las secuencias de nucleótidos. En consecuencia, en algunos modos de realización, la invención se refiere a secuencias de aminoácidos deducidas de la cadena ligera de 1H3 (SEQ ID NO: 2); la cadena ligera de 2G4 (SEQ ID NO: 4); la cadena ligera de 4G7 (SEQ ID NO: 6); la cadena ligera de 5D2 (SEQ ID NO: 8); la cadena ligera de 5E6 (SEQ ID NO: 10); la cadena ligera de 7C9 (SEQ ID NO: 12); la cadena ligera de 7G4 (SEQ ID NO: 14), la cadena ligera de 10C8 (SEQ ID NO: 16), la cadena pesada de 1H3 (SEQ ID NO: 1); la cadena pesada

de 2G4 (SEQ ID NO: 3); la cadena pesada de 4G7 (SEQ ID NO: 5); la cadena pesada de 5D2 (SEQ ID NO: 7), la cadena pesada de 5E6 (SEQ ID NO: 9), la cadena pesada de 7C9 (SEQ ID NO: 11), la cadena pesada de 7G4 (SEQ ID NO: 13) y la cadena pesada de 10C8 (SEQ ID NO: 15).

secuencia de la cadena pesada de mAb 1H3: 373 pb

TGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGC
TTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATACATTGGGTGAAACAGGGGCCTG
AACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAA

ATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATCACAGCAGACACATCCTCC
AATACAGCCTACCTGCAGCTCAGCGGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCT
ATTACTGTGCTAGGGAGTCGAGGATATCTACTATGCTTACGACGGGGTACTTT
GACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACAG
CCCCATCG (SEQ ID No. 1)

secuencia de la cadena ligera de mAb 1H3: 303 pb

GCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCA
GCTCAAGTGTAAGTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCC
CAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCGCT
TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGA
GGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTTACCCGTAC
ACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGCTGAT (SEQ ID No. 2)

secuencia de la cadena pesada de mAb 2G4: 364 pb

TGGAGGAGGCTTGATGCAACCTGGAGGATCCATGAAACTCTCCTGTGTTGCC
TCAGGATTCACTTTCAGTAACTACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGA
GAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGATTGAAATCTAATAATTATGCAA
CACATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTCACCATTTCAAGAGATGATTCC
AAAAGGAGTGTCTACCTGCAAATGAATACCTTAAGAGCTGAAGACACTGGCAT
TTATTACTGTACCCGGGGGAATGGTAACTACAGGGCTATGGACTACTGGGGT
CAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCCCATCA (SEQ ID No. 3)

secuencia de la cadena ligera de mAb 2G4: 306 pb

GCCTCCCTATCTGTATCTGTGGGAGAAACTGTCTCCATCACATGTCGAGCAA
GTGAGAATATTTACAGTAGTTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCT
CCTCAGCTCCTGGTCTATTCTGCAACAATCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAG
GTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACTCAGTATTCCCTCAAGATCAACAGCCTG
CAGTCTGAAGATTTTGGGACTTATTACTGTCAACATTTTTGGGGTACTCCGTA
CACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGCTGAT (SEQ ID No. 4)

secuencia de la cadena pesada de mAb 4G7: 358 pb

TGGACCTGAGCTGGAGATGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT
TCTGGTTCCTCATTCACTGGCTTCAGTATGAACTGGGTGAAGCAGAGCAATG
GAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTGATACTTATTATGGTGGTACTACC
TACAACCAGAAATTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTGGACAAATCCTCCA
GCACAGCCTACATGCAGCTCAAGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTA
TTACTGTGCAAGATCGGCCTACTACGGTAGTACTTTTGCTTACTGGGGCCAAG
GGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACAACAGCCCCATCG (SEQ ID No. 5)

secuencia de la cadena ligera de mAb 4G7: 306 pb

GCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAA
GTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCT
CCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCCAAAACCTTAATAGAGGGTGTGCCATCAAG
GTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTG
CAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTTCTGTCAACATCATTTTGGTACTCCATTC
ACATTCGGCTCGGGGACAGAGTTGGAAATAAAACGGGCTGAT (SEQ ID No. 6)

secuencia de la cadena pesada de mAb 5D2: 340 pb

GGGACCTGGCCTGGTGAGACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTC
ACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGCCTGGAACTGGATCCGGCAGTTTC
CAGGAAACAAACTGGAGTGGCTGGGCTATATAACCAACACTGGTAGCACTGG
CTTCAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGA
ACCAGTTCTTCCTGCAGTTGATTTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATAT
CACTGTGCAAGGGGCCTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCT
CTGCAGCCAAAACAACAGCCCCATCG (SEQ ID No. 7)

secuencia de la cadena ligera de mAb 5D2: 321 pb

CTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAG
TCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATCTGAATTGGTTGTTACAGA
GGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTC
TGGAGTCACTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTG
AAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGTTGGCAAG
GTACACACTCTCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACG
GGCTGAT (SEQ ID No. 8)

secuencia de la cadena pesada de mAb 5E6: 370 pb

TGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGC
CTCTGGATCCGCTTTCAGTAGATATGACATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCG
GAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCATACATTAGTCGTGGTGGTGGTTTCATCT
ACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAA
GAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGACGACACAGCCATG
TATTACTGTGCAAGACACGTTTACTACGGTAGTAGCCCCCTCTATGCTATGGA
CTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCC
CCATCG (SEQ ID No. 9)

secuencia de la cadena ligera de mAb 5E6: 324 pb

TCAGCCTCTTTCTCCCTGGGAGCCTCAGCAAAACTCACGTGCACCTTGAGTA
GTCAGCACAGTACGTTCACCATTGAATGGTATCAGCAACAGCCACTCAAGCC
TCCTAAGTATGTGATGGAGCTTAAGAAAGATGGAAGCCACAGTACAGGTGAT
GGGATTCCTGATCGCTTCTCTGGATCCAGCTCTGGTGCTGATCGCTACCTTA
GCATTTCCAACATCCAGCCTGAAGATGAAGCAATATACATCTGTGGTGTGGGT
GATACAATTAATGAACAATTTGTGTATGTTTTCGGCGGTGGAACCAAGGTCAC
TGTCCTAGGT (SEQ ID No. 10)

secuencia de la cadena pesada de mAb 7C9: 358bp

TGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGC
TTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGGAGAGGCCT
GACAAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCAGCGAATGGTAATACTA
AATGTGACTCGAGGTTTCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCTC
CAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTC
TATTACTGTGCTAGAAGGATCTACTTTGGTAAGGGCTTTGACTTTTGGGGCCA
AGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCG (SEQ ID
No. 11)

secuencia de la cadena ligera de mAb 7C9: 324 pb

TCCTCCCTGAGTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCCA
GTCAGAGTCTGTTTAACAGTGGAGATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCA
GCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACGGGGCATCCACTAGG
GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACCGATTTCA
CTCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAG
AATGATCAATTTTATCCTCCCACGTTCGGTGATGGGACCAAGCTGGACCTGAA
ACGGGCTGAT (SEQ ID No. 12)

secuencia de la cadena pesada de mAb 7G4: 367 pb

TGGAGGGGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAACT
TCTGGCTTCACCTTTACTGATCACTACATGGGCTGGGTCCGCCAGCCTCCAG
GAAAGGCACTTGAGTGGTTGGCTTTTGTTAGATACAAAGCTAAGGGTTACACA
ACAGAGTACACTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGATAATTC
CCAAAGCATCCTCTATCTTCAAATGAACACCCTGAGAACTGAGGACAGTGCCA
CTTATTACTGTGCAAGAGATAGAGGGGGTTACGTGGGAGCTATGGACTACTG
GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCT
(SEQ ID No. 13)

secuencia de la cadena ligera de mAb 7G4: 321 pb

CTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAG
TCAGAGCCTTGTACACAGGAATGGAAACACCTATTTCCATTGGTACCTGCAGA
AGCCAGGCCAGTCTCCAAAACTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCT
GGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCA
AGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAG
TACACATGTTCCGTACACTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG
GCTGAT (SEQ ID No. 14)

secuencia de la cadena pesada de mAb 10C8: 352 pb

TGGGGCAGAGCTTGTGAGGTCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACATCT
TCTGGCTTCAACATTAAAGACTACTTTCTACACTGGGTGAAACAGAGGCCTGA
ACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAATGGTGATACTGAA
TATGCCCCGAAGTTCCAGGACAAGGCCACTATGACTGCAGACACATCCTCCA
ACACAGCCTACCTGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGGCGTCTA

TTACTGTAATGCAGATGGTAACTACGGGAAGAACTACTGGGGCCAAGGCACC
ACTCTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCG (SEQ ID No. 15)

secuencia de la cadena ligera de mAb 10C8: 324 pb

CTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAG
TCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTTTTTACATTGGTACCTGCAGA
AGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAGAGTTTCCAACCGATTTTCT
GGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCA
AGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAG
TACACATGTTCCTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
CGGGCTGAT (SEQ ID No. 16)

Una o más de las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente que codifican el anticuerpo se pueden someter a técnicas de humanización o convertir en moléculas humanas quiméricas para generar una variante de anticuerpo que tiene inmunogenicidad reducida en humanos. Las técnicas de humanización son bien conocidas en la técnica; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 6.309.636 y la patente de EE. UU. 6.407.213 a las que se hace referencia específicamente para su divulgación sobre técnicas de humanización. Los quiméricos también son bien conocidos, véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. 6.461.824, la patente de EE. UU. 6.204.023, la patente de EE. UU. 6.020.153 y la patente de EE. UU. 6.120.767.

Se pueden preparar anticuerpos quiméricos preparando un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un dominio de región constante de una cadena ligera o pesada humana unida genéticamente a un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en cadena ligera de 1H3 (SEQ ID NO: 2); cadena ligera de 2G4 (SEQ ID NO: 4); cadena ligera de 4G7 (SEQ ID NO: 6); cadena ligera de 5D2 (SEQ ID NO: 8); cadena ligera de 5E6 (SEQ ID NO: 10); cadena ligera de 7C9 (SEQ ID NO: 12); cadena ligera de 7G4 (SEQ ID NO: 14) y cadena ligera de 10C8 (SEQ ID NO: 16) o una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en cadena pesada de 1H3 (SEQ ID NO: 1); cadena pesada de 2G4 (SEQ ID NO: 3); cadena pesada de 4G7 (SEQ ID NO: 5); cadena pesada de 5D2 (SEQ ID NO: 7), cadena pesada de 5E6 (SEQ ID NO: 9), cadena pesada de 7C9 (SEQ ID NO: 11), cadena pesada de 7G4 (SEQ ID NO: 13) y cadena pesada de 10C8 (SEQ ID NO: 15). Es de destacar que todas estas secuencias se describen anteriormente.

En el presente documento también se describen anticuerpos recombinantes que comprenden al menos una región variable modificada, seleccionada dicha región del grupo que consiste en cadena ligera de 1H3 (SEQ ID NO: 2); cadena ligera de 2G4 (SEQ ID NO: 4); cadena ligera de 4G7 (SEQ ID NO: 6); cadena ligera de 5D2 (SEQ ID NO: 8); cadena ligera de 5E6 (SEQ ID NO: 10); cadena ligera de 7C9 (SEQ ID NO: 12); cadena ligera de 7G4 (SEQ ID NO: 14), cadena ligera de 10C8 (SEQ ID NO: 16), cadena pesada de 1H3 (SEQ ID NO: 1); cadena pesada de 2G4 (SEQ ID NO: 3); cadena pesada de 4G7 (SEQ ID NO: 5); cadena pesada de 5D2 (SEQ ID NO: 7), cadena pesada de 5E6 (SEQ ID NO: 9), cadena pesada de 7C9 (SEQ ID NO: 11), cadena pesada de 7G4 (SEQ ID NO: 13) y cadena pesada de 10C8 (SEQ ID NO: 15), en la que al menos uno, pero menos de aproximadamente 30 de los residuos de aminoácidos de dicha región variable se ha cambiado o eliminado sin interrumpir la unión con el antígeno. Es de destacar que todas estas secuencias se describen anteriormente.

En el presente documento también se describen fragmentos inmunorreactivos de cualquiera de los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente, se preparan anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados usando medios conocidos en la técnica, por ejemplo, preparando deleciones anidadas usando degradación enzimática o enzimas de restricción convenientes.

Es de destacar que, en todos los modos de realización que describen la preparación de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos o fragmentos inmunorreactivos de anticuerpos monoclonales, estos anticuerpos se someten a cribado para garantizar que la unión al antígeno no se haya interrumpido. Esto se puede lograr por cualquiera de una variedad de medios conocidos en la técnica, pero un procedimiento conveniente implicaría el uso de una colección de presentación de fagos. Como apreciará un experto en la técnica, como se usa en el presente documento, "fragmento inmunorreactivo" se refiere en este contexto a un fragmento de anticuerpo de longitud reducida en comparación con el anticuerpo natural u original que conserva un grado o porcentaje aceptable de

actividad de unión al antígeno diana. Como apreciará un experto en la técnica, lo que sea un grado aceptable dependerá del uso previsto.

Es de destacar que, como se analiza en el presente documento, cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente o variante humanizada de los mismos se puede formular en un tratamiento farmacéutico para proporcionar inmunidad pasiva a individuos con sospecha o riesgo de desarrollar fiebre hemorrágica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo. La preparación farmacéutica puede incluir un excipiente o vehículo adecuado. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 1995, Gennaro ed. Como será evidente para un experto en la técnica, la dosificación total variará de acuerdo con el peso, la salud y las circunstancias del individuo, así como la eficacia del anticuerpo.

Tabla 1 Eficacia protectora dependiente de la dosis de McAb en ratones

Tratamiento[a]	Dosis (µg/tratamiento)	Tiempo medio hasta la muerte[b]	N.º de supervivientes/total
McAb 4G7	100	7,00 (*n* = 1)	5/6
	50	7,00 (*n* = 1)	5/6
	25	6,00 (*n* = 3)	3/6
	12,5	6,80 (*n* = 5)	1/6
	6,25	8,20 (*n* = 5)	2/6
McAb 5D2	100	NP[c]	6/6
	50	NP[c]	6/6
	25	NP[c]	6/6
	12,5	NP[c]	6/6
	6,25	7,50 (*n* = 2)	4/6
McAb 5E6	100	NP[c]	6/6
	50	NP[c]	6/6
	25	NP[c]	6/6
	12,5	6,50 (*n* = 2)	4/6
	6,25	6,67 (*n* = 3)	3/6
McAb 7C9	100	NP[c]	6/6
	50	NP[c]	6/6
	25	7,00 (*n* = 1)	5/6
	12,5	7,00 (*n* = 1)	5/6
	6,25	6,50 (*n* = 4)	2/6
McAb 7G4	100	NP[c]	6/6
	50	7,50 (*n* = 1)	4/6
	25	7,00 (*n* = 1)	5/6
	12,5	7,60 (*n* = 5)	1/6
	6,25	6,60 (*n* = 5)	1/6
McAb IOCS	100	7,00 (*n* = 1)	5/6
	50	7,00 (*n* = 1)	516
	25	7,50 (*n* = 4)	2/6
	12,5	7,00 (*n* = 5)	1/6
	6,25	6,40 (*n* = 5)	1/6
PBS		5,80 (*n* = 5)	0/5

[a]Se trataron ratones por vía intraperitoneal con anticuerpos 1 día después de la exposición con 1000 LD50 del virus del Ébola adaptado a ratón.
[b] Datos de animales que murieron (el número de animales se muestra entre paréntesis).
[c] NP: no procede.

Tabla 2. Dependencia temporal de la eficacia protectora de los MAb en ratones

MAb	Día de tratamiento[a]	Media de tiempo hasta la muerte[b]	N.º de supervivientes/total
1H3 100 µg	-4	6,70 ± 0,61 (*n* = 10)	0/10
	-1	6,60 ± 0,61 (*n* = 10)	0/15
	+ 1	8,10 ± 0,74 (*n* = 9)	6/15
	+2	6,60 ± 0,80 (*n* = 5)	5/10
	+3	6,40 ± 0,97 (*n* = 10)	0/10
2G4 100 µg	-4	7,40 ± 0,63 (*n* = 10)	0/10
	-1	7,86 ± 0,74 (*n* = 14)	1/15
	+1	8,00 (*n* = 6)	9/15

	+2	7,30 ± 0,47 (*n* = 3)	7/10
	+3	5,70 ± 1,13 (*n* = 10)	0/10
4G7 100 µg	-4	7,42 ± 0,46 (*n* = 7)	3/10
	-1	7,08 ± 0,74 (*n* = 14)	1/15
	+1	8,25 ± 0,43 (*n* = 4)	11/15
	+2	NP[c]	10/10
	+3	5,67 ± 1,34 (*n* = 9)	1/10
5D2 100 µg	-4	7,00 (*n* = 1)	9/10
	-1	8,00 ± 1,00 (*n* = 2)	13/15
	+1	no disponible	15/15
	+2	7,00 (*n* = 4)	6/10
	+3	6,30 ± 1,05 (*n* = 10)	0/10
5E6 100 µg	-4	7,00 (*n* = 2)	8/10
	-1	8,25 ± 0,43 (*n* = 4)	11/15
	+1	7,00 (*n* = 1)	14/15
	+2	6,00 (*n* = 1)	9/10
	+3	5,80 ± 1,03 (*n* = 10)	0/10
7C9 100 µg	-4	7,00 (*n* = 1)	9/10
	-1	7,75 ± 0,43 (*n* = 4)	11/15
	+1	8,00 ± 0,82 (*n* = 3)	12/15
	+2	7,00 (*n* = 1)	9/10
	+3	6,10 ± 0,67 (*n* = 10)	0/10
7G4 100 µg	-4	8,20 ± 0,71 (*n* = 10)	0/10
	-1	8,07 ± 0,59 (*n* = 14)	1/15
	+ 1	no disponible	15/15
	+2	7,10 ± 0,57 (*n* = 9)	1/10
	+3	6,70 ± 0,44 (*n* = 10)	0/10
10C8 100 µg	-4	7,83 ± 0,64 (*n* = 6)	4/10
	-1	7,64 ± 1,17 (*n* = 14)	1/15
	+1	8,50 ± 0,50 (*n* = 2)	13/15
	+2	6,83 ± 0,37 (*n* = 6)	4/10
	+3	6,30 ± 1,13 (*n* = 10)	0/10
17F8[d] 100 µg	-4	6,00 ± 1,10 (*n* = 9)	1/10
	-1	6,13 ± 0,88 (*n* = 15)	0/15
	+1	7,21 ± 0,86 (*n* = 14)	1/15
	+2	6,10 ± 0,83 (*n* = 10)	0/10
	+3	6,00 ± 1,13 (*n* = 10)	0/10
PBS	-4	5,40 ± 1,43 (*n* = 10)	0/10
	-1	6,60 ± 0,80 (*n* = 5)	0/5
	+3	5,00 ± 0,60 (*n* = 10)	0/10

[a]Se trataron ratones por vía intraperitoneal con cada anticuerpo en el momento indicado antes o después de la exposición con 1000 LD50 del virus del Ébola adaptado a ratón.
[b] Datos de animales que murieron (el número de animales se muestra entre paréntesis).
[c] NP: no procede.
[d] Mab de control: anti-MAR GP.

Tabla 3 Eficacia protectora de los MAb en cobayas

Tratamiento	Día de tratamiento[a]	Tiempo medio hasta la muerte[b]	N.º de supervivencia/Total[c]
Cóctel de			
5D2 (3 mg) +	1		
4G7(2 mg) + 1H3 (1 mg) + 2G4(1 mg)	2	NP[d]	6/6
Cóctel de			
5E6 (3 mg) +	1		

4G7(2 mg) + 1H3 (1 mg) + 2G4(1 mg)	2	N/A	6/6
Cóctel de 7C9 (3 mg) +	1		
4G7(2 mg) + 1H3 (1 mg) + 2G4(1 mg)	2	N/A	6/6
Cóctel de 7G4 (3 mg) +	1		
4G7(2 mg) + 1H3 (1 mg) + 2G4(1 mg)	2	N/A	6/6
Cóctel de 10C8 (3 mg) +	1		
4G7(2 mg) + 1H3 (1 mg) + 2G4(1 mg)	2	9,00 (*n* = 1)	5/6
Cóctel de PBS +	1		
PBS	2	7,00 (*n* = 6)	0/6

[a] Se trataron cobayas institucionalmente con los MAb con la dosis que se muestra en la tabla en los días indicados después de la exposición con 1000 LD_{50} del virus del Ébola adaptado para cobayas.
[b] Datos de todos los animales que murieron (el número de animales se muestra entre paréntesis).
[c] Tasa de supervivencia el día 28 después de la exposición.
[d] NP: no procede.

Tabla 4. Resumen del resultado mediante ELISA de McAb anti-Ebola-GP

McAb	Isotipo	Antígeno					
		eVLP	eGP1,2 Δ Tm	sGP 1-295aa	Rf-GP1 sub-f-D 157-369aa	Dominio mucina 333-458aa	GP1 1-501aa
1H3	IgG2a,κ	+	+	+	-	-	+
2G4	IgG2b,κ	+	+	-	-	-	-
4G7	IgG2a,κ	+	+	-	-	-	+
5D2	IgG2a, κ	+	+	-	+	+	+
5E6	IgG2a,λ	+	+	-	-	+	+
7C9	IgG2a,κ	+	+	-	+/-	+	+
7G4	IgG1, κ	+	+	-	-	+/-	+
10C8	IgG2a,κ	+	+	-	-	+/-	+

Se recubrieron antígenos (0,3 µg/pocillo) en una placa de microtitulación de 96 pocillos después de bloquear con leche desnatada al 2 %. Se aplicaron diluciones en serie de cada MAb a la placa, seguido de anticuerpo de cabra contra IgG de ratón conjugado con HRP. Después de incubar con sustrato, se leyó la absorbancia en OD405. El valor de corte fue 2X el fondo.

Tabla 5 Supervivencia prolongada observada en cobayas tratadas con McAb

Tratamiento[a]	Media de tiempo hasta la muerte[b]	Prueba de la *t* de Student
MAb1H3	11,7 ± 2,18 (*n* = 5)	*p* = 0,0181
MAb 2G4	11,5 ± 1,50 (*n* = 2)	NP[c]

MAb 4G7	**10,5 ± 1,50 (*n* = 2)**	**NP[c]**
MAb 5D2	**9,4 ± 1,02 (*n* = 5)**	***p* = 0,0244**
MAb 5E6	**10,8 ± 1,47 (*n* = 5)**	***p* = 0,0092**
MAb 7C9	**9,6 ± 0,80 (*n* = 5)**	***p* = 0,0056**
MAb 7G4	**9,6 ± 0,80 (*n* = 5)**	***p* = 0,0056**
MAb 10C8	**9,4 ± 1,20 (*n* = 5)**	***p* = 0,0428**
PBS	**7,67 ± 0,75 (*n* = 6)**	**NP[c]**

[a] Se trataron cobayas por vía intraperitoneal con 5 mg del MAb como se muestra en la tabla el día 1 después de la exposición con 1000 LD_{50} del virus del Ébola adaptado para cobayas.
[b] Datos de todos los animales que murieron (el número de animales se muestra entre paréntesis).
[c] NP: no procede.

Tabla 6 Eficacia protectora de los MAb en cobayas

Tratamiento	Día de tratamiento[a]	Tiempo medio hasta la muerte[b]	N.º de supervivencia/Total[c]
Cóctel de 4G7 (2 mg) + 1H3 (1,5mg) + 2G4 (1,5mg)	-1	11,176 ± 3,09 (*n* = 3)	3/6
Cóctel de 4G7 (2 mg) + 1H3 (1,5mg) + 2G4 (1,5mg)	+1	7,92 ± 0,42 (*n* = 3)	3/6
Cóctel de 4G7 (2 mg) + 1H3 (1,5mg) + 2G4 (1,5mg)	+2	NP[d]	6/6
Cóctel de 4G7 (2 mg) + 1H3 (1,5mg) + 2G4 (1,5mg)	+3	11,176 ± 3,09 (*n* = 3)	4/6
PBS	+2	6,58 ± 0,59 (*n* = 6)	3/6

[a] Se trataron cobayas institucionalmente con los MAb con la dosis que se muestra en la tabla en los días indicados antes o después de la exposición con 1000 LD50 del virus del Ébola adaptado para cobayas.
[b] Datos de todos los animales que murieron (el número de animales se muestra entre paréntesis).
[c] Tasa de supervivencia el día 28 después de la exposición.
[d] NP: no procede.

Tabla 7 Epítopos unidos por McAb ZEbov GP

Nombre del mAb	GP de Ébola con epítopo	Secuencia de epítopos	Posición del epítopo
1H3(IgG2a/κ):	sGP[a]	SNTTGKLIWKVNPEI	267-280aa
2G4(IgG2b/κ):	GP2[a]	REAIVNAQPKCNPNL	502-516aa
4G7(IgG2a/κ}:	GP2[a]	REAIVNAQPKCNPNL	502-516aa
5D2 (IgG2a/κ):	GP1[b,c,d]	DPGTNTTTEDHKIMA	329-343aa
5E6 (IgG2a/λ):	GP1[b,c,d]	ATQVEQHHRRTDNDS	401-415aa
7C9(IgG2a,κ):	GP1[b,c]	se desconoce	se desconoce
7G4(IgG1, κ):	GP1[b,c]	se desconoce	se desconoce
10C8(IgG2a,κ):	GP1[b,c]	se desconoce	se desconoce

a: determinado usando el virus de la estomatitis vesicular recombinante (VSV) que contiene el gen ZEbov GP para identificar los cambios de aminoácidos en las variantes antigénicas que escapan a la neutralización de anticuerpos;
b: determinado por la reactividad mediante inmunoelectrotransferencia con Ébola Zaire 1976 o VLP,
c: determinado por ELISA usando proteína GP1 recombinante;
d: determinado por ELISA utilizando una colección de péptidos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende anticuerpos monoclonales que se unen a la glucoproteína del virus del Ébola, comprendiendo dichos anticuerpos:

(a) una región variable de cadena ligera codificada por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4 y una región variable de cadena pesada codificada por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3; y/o
(b) una región variable de cadena ligera codificada por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6 y una región variable de cadena pesada codificada por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que dichos anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera codificada por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4 y una región variable de cadena pesada codificada por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3.

3. La composición de la reivindicación 1, en la que dichos anticuerpos comprenden una región variable de cadena ligera codificada por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6 y una región variable de cadena pesada codificada por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5.

4. La composición de la reivindicación 1, en la que dichos anticuerpos comprenden: (a) una región variable de cadena ligera codificada por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4 y una región variable de cadena pesada codificada por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3; y (b) una región variable de cadena ligera codificada por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6 y una región variable de cadena pesada codificada por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5.

5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en un procedimiento para proporcionar inmunidad pasiva a individuos con sospecha o en riesgo de desarrollar fiebre hemorrágica.

6. Un procedimiento de diagnóstico que comprende detectar la presencia de un antígeno del virus del Ébola dentro de una muestra con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

7. Un procedimiento para preparar la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende la etapa de proporcionar un anticuerpo quimérico:

proporcionando: (a) un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio de la región constante de una cadena ligera humana unida genéticamente a la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4 y un dominio de la región constante de una cadena pesada humana unida genéticamente a una molécula de ácido nucleico codificada por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3; y/o (b) un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio de la región constante de una cadena ligera humana unida genéticamente a la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6 y un dominio de la región constante de una cadena pesada humana unida genéticamente a una molécula de ácido nucleico codificada por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5;
expresar el vector de expresión en un huésped adecuado; y
recuperar el anticuerpo quimérico de dicho huésped.

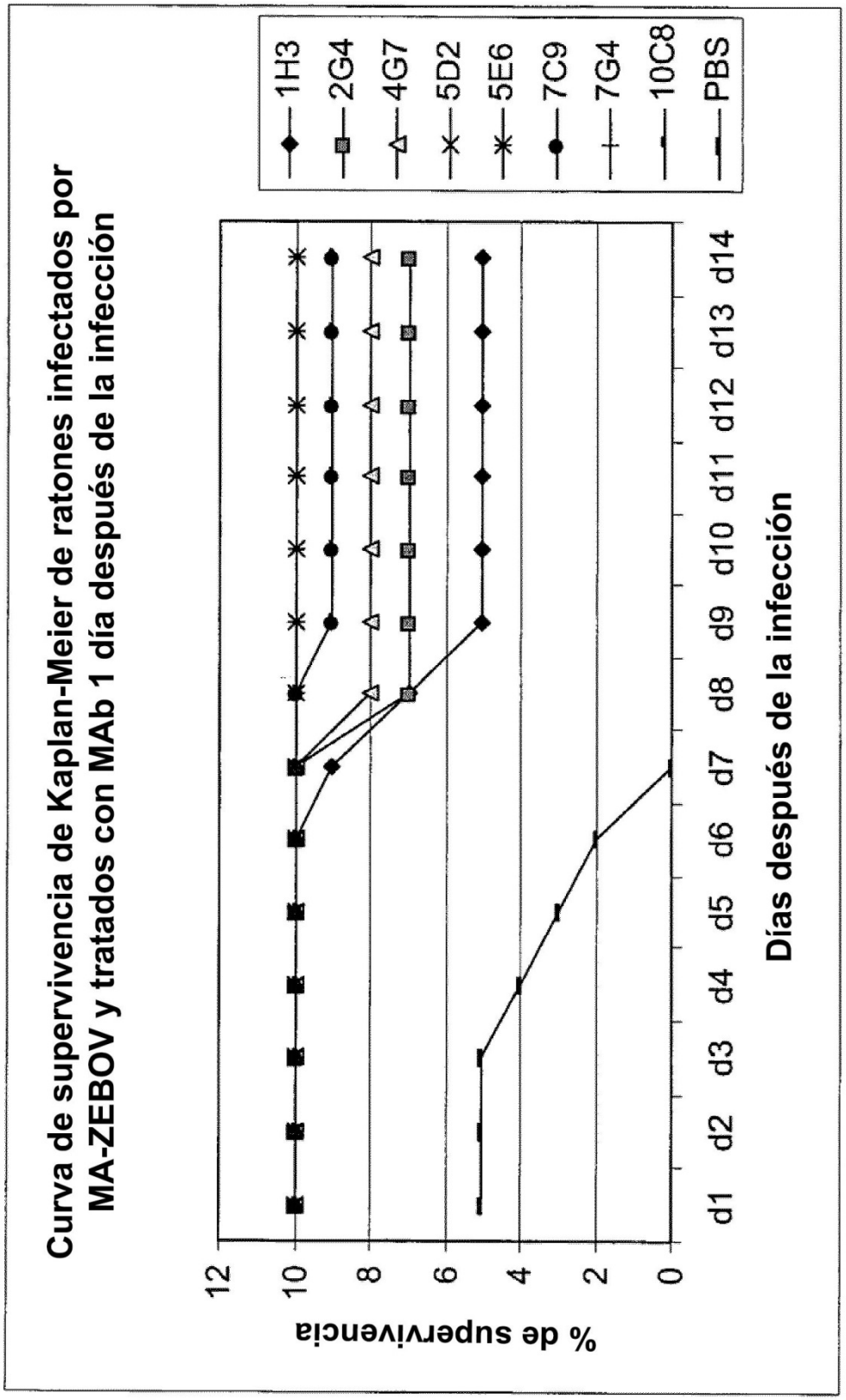
Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones infectados por MA-ZEBOV y tratados con MAb 1 día después de la infección
% de supervivencia
0
2
4
6
8
10
12
d1 d2 d3 d4 d5 d6 d7 d8 d9 d10 d11 d12 d13 d14
Días después de la infección
1H3
2G4
4G7
5D2
5E6
7C9
7G4
10C8
PBS

Fig. 1

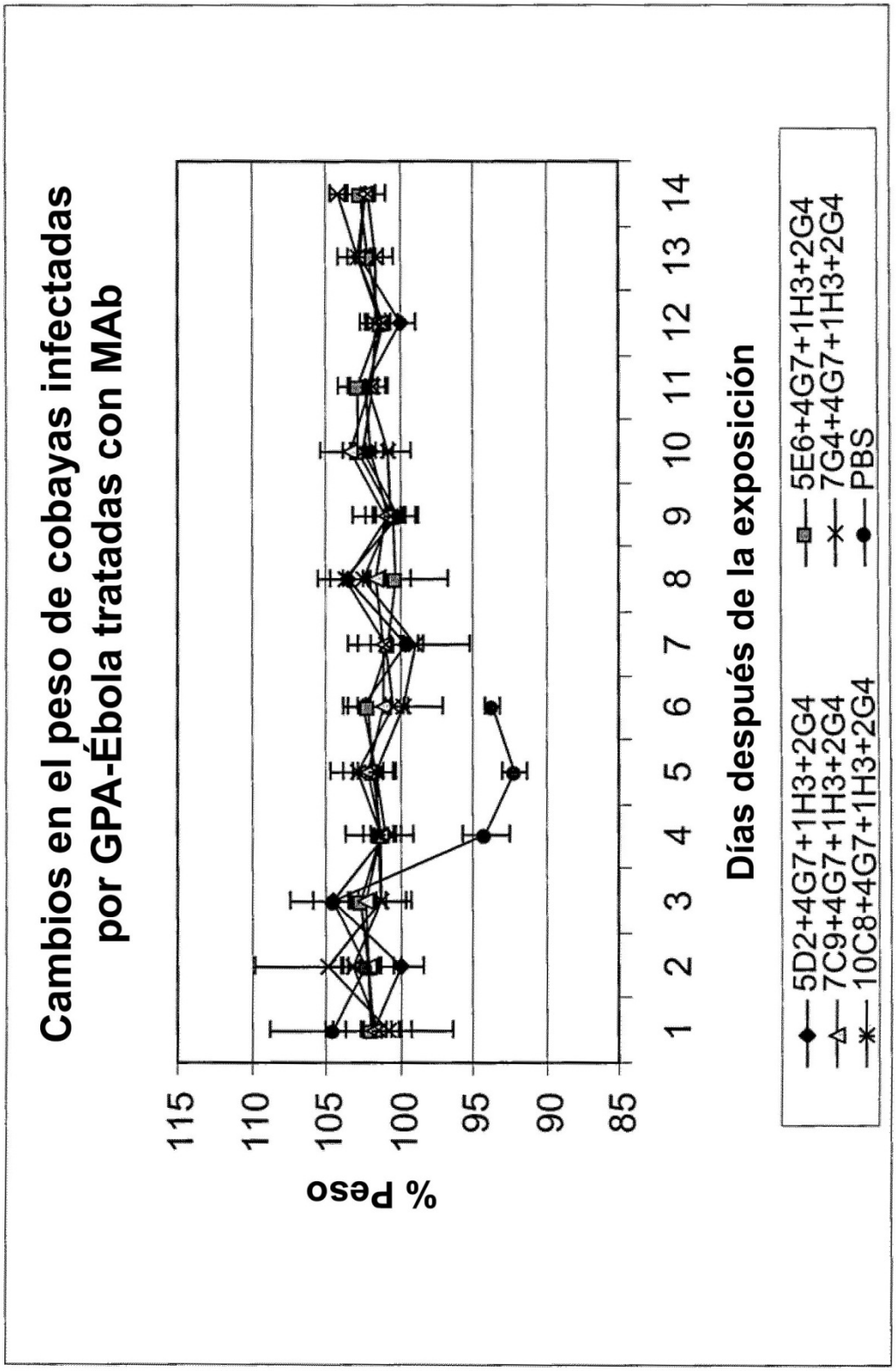
Cambios en el peso de cobayas infectadas por GPA-Ébola tratadas con MAb
% Peso
115
110
105
100
95
90
85
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Días después de la exposición
5D2+4G7+1H3+2G4
7C9+4G7+1H3+2G4
10C8+4G7+1H3+2G4
5E6+4G7+1H3+2G4
7G4+4G7+1H3+2G4
PBS

Fig. 2

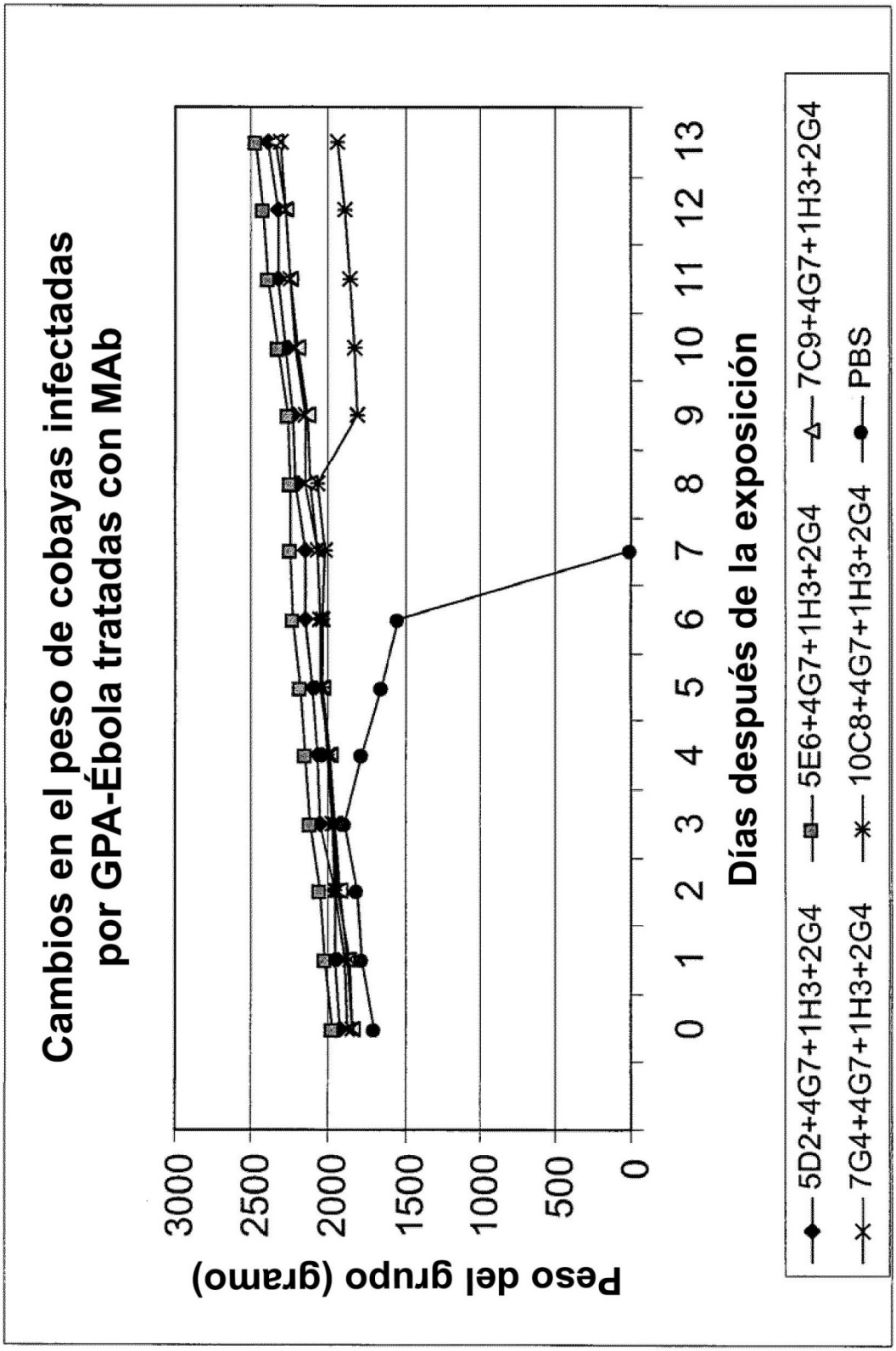
Cambios en el peso de cobayas infectadas por GPA-Ébola tratadas con MAb
Peso del grupo (gramo)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
Días después de la exposición
5D2+4G7+1H3+2G4
5E6+4G7+1H3+2G4
7C9+4G7+1H3+2G4
7G4+4G7+1H3+2G4
10C8+4G7+1H3+2G4
PBS

Fig. 3

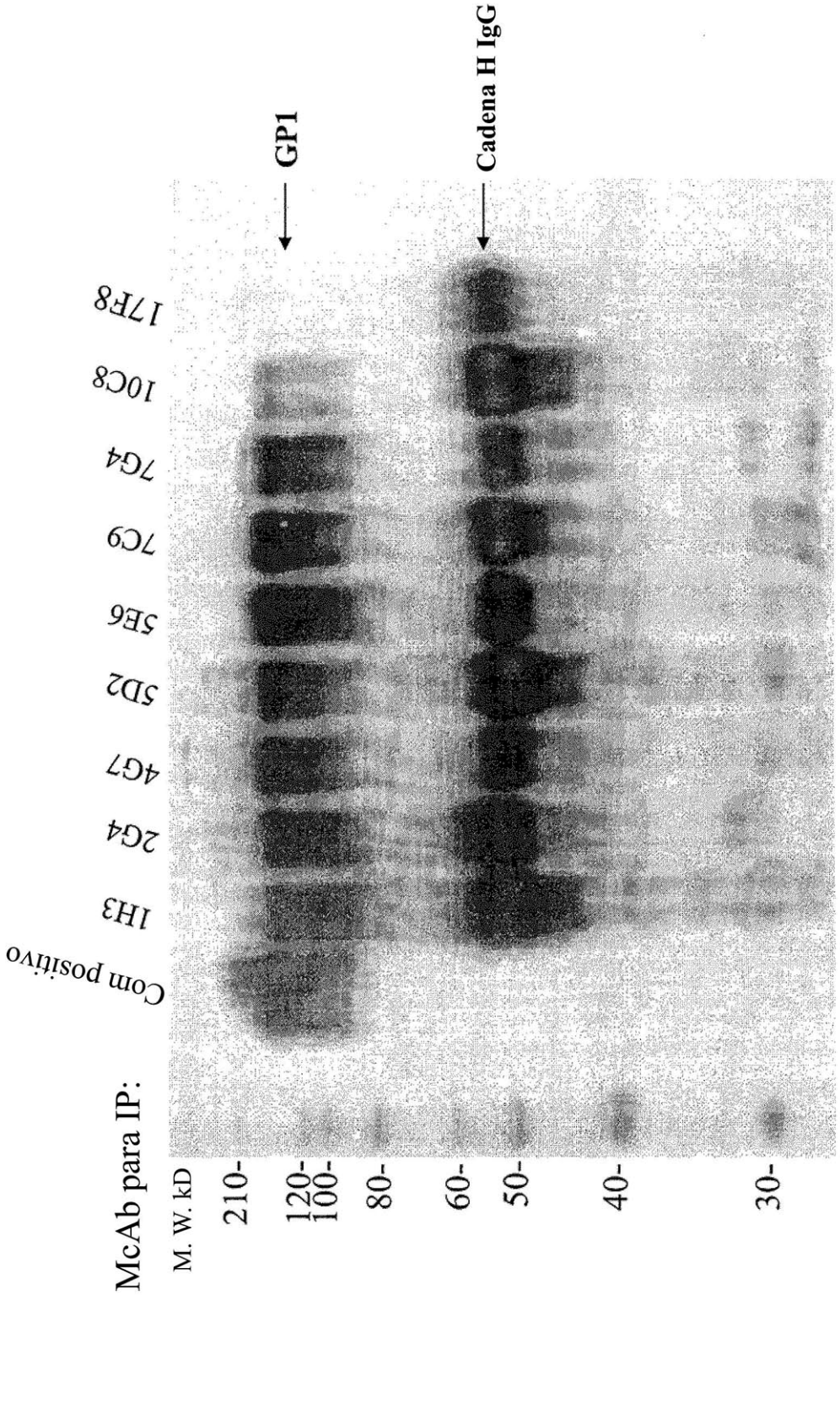
GP1
Cadena H IgG
McAb para IP:
M. W. kD
210-
120-
100-
80-
60-
50-
40-
30-
Com positivo
1H3
2G4
4G7
5D2
5E6
7C9
7G4
10C8
17F8

Fig. 4