

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 760**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/10** (2006.01)

**A61K 39/42** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2015 PCT/EP2015/050717**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15107126**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2015 E 15700471 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3094644**

54 Título: **Neutralización de anticuerpos monoclonales humanos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B**

30 Prioridad:

**16.01.2014 EP 14151437**

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

**11.03.2020**

73 Titular/es:

**MONDELLI, MARIO UMBERTO FRANCESCO  
(100.0%)  
Via L. Vitali 1  
20122 Milan, IT**

72 Inventor/es:

**MONDELLI, MARIO UMBERTO FRANCESCO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 747 760 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

Neutralización de anticuerpos monoclonales humanos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B

**Campo de la invención**

5 La invención pertenece al campo del tratamiento médico y la prevención. La invención proporciona un anticuerpo monoclonal que es capaz de neutralizar la infección por hepatitis B y prevenir, tratar o mejorar las enfermedades asociadas al VHB.

**Antecedentes de la invención**

10 El virus de la hepatitis B (VHB) es uno de los agentes infecciosos más comunes del mundo provocando millones de infecciones cada año [1] Entre 500,000 y 700,000 personas mueren cada año por cirrosis crónica relacionada con infección, carcinoma hepatocelular (CHC) o por hepatitis B fulminante [1,2]. La transmisión se produce por exposición percutánea y mucosa a fluidos corporales infecciosos. Por lo tanto, la ruta de transmisión más común es la transmisión sexual. Sin embargo, la infección por transfusiones de sangre y productos sanguíneos no se ha eliminado por completo y las inyecciones contaminadas durante los procedimientos médicos, el intercambio de agujas, jeringas y parafernalia entre los usuarios de drogas intravenosas todavía representa un problema importante de salud pública. La transmisión vertical es común, especialmente en Asia y los países en desarrollo que no han implementado la vacuna contra la hepatitis B. Además, el VHB representa un riesgo para los trabajadores de la salud expuestos a lesiones accidentales por pinchazo de aguja.

20 Vacuna contra la hepatitis B es una vacuna desarrollada para la prevención de la infección por virus de la hepatitis B. La vacuna contiene una de las proteínas de la envoltura viral, el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). Puede producirse de forma recombinante en células de levadura, en las que se ha insertado el código genético para HBsAg. La vacunación con el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) brinda protección contra la infección por el VHB y previene complicaciones como la cirrosis hepática y el CHC. El control y la eventual eliminación de la infección por el VHB son posibles con el uso apropiado de las vacunas contra la hepatitis B, y esto reducirá significativamente la carga de la enfermedad y los costes asociados.

25 Aunque la prevención de la infección por VHB se puede conseguir eficazmente por la vacunación hay ciertas situaciones que requieren un enfoque profiláctico diferente. El trasplante de hígado para la enfermedad hepática relacionada con el VHB en etapa terminal es uno de esos ejemplos. La inmunoglobulina contra la hepatitis B (HBIG) ha cumplido una función central en la profilaxis contra la hepatitis B recurrente en pacientes sometidos a trasplante de hígado.

30 Antes de la utilización rutinaria de HBIG como inmunoprofilaxis, la recurrencia de VHB en el aloinjerto de hígado se produjo en hasta un 80%, y con poca frecuencia se asoció con una variante fibrosante colestásica agresiva que provocó disfunción del injerto progresiva y mortalidad significativa. La disponibilidad posterior de fármacos antivirales seguros y efectivos condujo a beneficios de supervivencia adicionales al mejorar la eficacia profiláctica y prevenir la progresión de la enfermedad en aquellos con recurrencia [3]

35 El HBIG es un anticuerpo policlonal contra el antígeno de superficie del VHB (HBsAg) derivado del plasma humano agrupado. Aunque su mecanismo de acción aún no se comprende completamente, se cree que HBIG actúa en la circulación al prevenir la infección de los hepatocitos, unirse y neutralizar los viriones circulantes que expresan HBsAg y tal vez inducir la lisis de las células infectadas [4]. Dentro del hígado, la HBIG también puede prevenir la infección de célula a célula, así como reducir la secreción de HBsAg y virión tras la endocitosis en los hepatocitos [5].

40 Para proporcionar una protección máxima contra la reinfección del injerto de hígado, HBIG debe darse con frecuencia (típicamente al día) durante la semana después del trasplante. El ensayo europeo multicéntrico fundamental demostró que la administración a largo plazo de HBIG intravenosa (IV) redujo las tasas de recurrencia de hepatitis B del 75% al 36% y se asoció con una mejor supervivencia del injerto y del paciente [6]. Los ensayos posteriores, que utilizaron programas variables para la administración de HBIG, confirmaron la eficacia de HBIG como monoterapia contra la infección recurrente por VHB [7].

50 La profilaxis de HBIG es costosa. Los HBIG se administran comúnmente por vía intravenosa a dosis altas, diariamente durante la primera semana y mensualmente a partir de entonces, lo que hace que los costes actuales del tratamiento de pacientes trasplantados por cirrosis relacionada con el VHB sean prohibitivos, incluso para los países desarrollados. La reducción de la dosis se ha propuesto para la reducción de costes, ya sea en base a una dosis fija o en base a una respuesta para mantener los anti-HB circulantes a un nivel protector. Sin embargo, las dosis de HBIG son variables y deben individualizarse entre los pacientes. También se ha propuesto abandonar la profilaxis de HBIG en favor del uso de medicamentos antivirales solos, sin embargo, este es un tema muy controvertido [3].

El coste del tratamiento y la prevención HBIG no son las únicas limitaciones a su uso. Las limitaciones adicionales incluyen lo siguiente: i) el suministro es limitado y depende de que los donantes humanos vacunados exhiban anti-HB protectores de alto título, ii) la purificación lleva mucho tiempo y debe someterse a largos procedimientos de inactivación del virus; iii) el título de anti-HB es una eficacia de neutralización del virus variable y efectiva, en gran parte desconocida, que se basa exclusivamente en títulos de suero anti-HB protectores arbitrariamente; iv) la inmunoglobulina policlonal incluye varias especificidades de anticuerpos y puede seleccionar mutantes de VHB resistentes a los fármacos antivirales disponibles actualmente; v) Las preparaciones de HBIG se combinan actualmente con medicamentos antivirales para asegurar una protección completa, lo que aumenta los costes.

5

En conclusión, existe una necesidad médica no satisfecha de un reactivo sostenible a la normalización de la inmunoprofilaxis de reinfección por el VHB en el trasplante de hígado. Dicho reactivo estandarizado también podría usarse beneficiosamente en otros entornos, como en el tratamiento agudo de pinchazos accidentales y en la prevención de la transmisión vertical perinatal del VHB. La administración de anticuerpos anti-HB generalmente se realiza como una medida profiláctica mientras se espera el desarrollo completo de la inmunidad adaptativa inducida por la vacuna contra el VHB.

10

15

Se han propuesto los anticuerpos monoclonales y desarrollado a fin de abordar esta necesidad. La mayoría de los anticuerpos monoclonales contra el VHB son de origen murino. Dichos anticuerpos murinos tienen la desventaja inherente de que provocan una reacción inmunitaria en un receptor humano cuando se usan en una composición terapéutica o profiláctica.

También se han descrito Los anticuerpos monoclonales humanos capaces de neutralizar la infección por VHB.

20

El documento WO 2011/045079 describe el aislamiento y la caracterización de 2D028, un anticuerpo monoclonal específico para la proteína de envoltura de VHB pre-S1 grande. El anticuerpo reacciona con un epítopo ligeramente en dirección descendente del extremo N-terminal de pre-S1 (aminoácidos 21-47). Se indica en el párrafo [00105] del documento WO 2011/045079 que la infección por VHB era esencialmente indetectable a 10 microgramos por mililitro del anticuerpo.

25

Otro conjunto de anticuerpos monoclonales denomina VHB-17 y VHB-19 se describe en Eren et al., Hepatology, 32 (2000), 588-596. Estos anticuerpos tenían una actividad específica de 514 UI/mg y 2,900 UI/mg respectivamente, como se describe en la página 590, parte inferior de la columna izquierda de Eren et al., Hepatology 32 (2000), 588-596.

30

Sin embargo, otra serie de anticuerpos monoclonales humanos se ha descrito en Tajiri et al., Antiviral Research 87 (2010) 40-49. Estos anticuerpos no parecían proporcionar protección completa contra la infección por el VHB, incluso no a las concentraciones más altas probadas. La Figura 4 en Tajiri et al., Antiviral Research 87 (2010) 40-49 muestra que todavía hay actividad residual después de la neutralización del VHB con cada uno de los anticuerpos probados.

35

Anticuerpo monoclonal humano HB-C7A se ha descrito en Shin et al, Antiviral Research 75 (2007); 113-120. Este anticuerpo fue capaz de prevenir completamente la infección por VHB en dos chimpancés después de mezclar 100 CID50 de VHB y 100 microgramos de HB-C7A. Se dice que el anticuerpo tiene un título de 2600 unidades por mg de anticuerpo.

A pesar de este progreso en la técnica, hay un deseo de anticuerpos monoclonales humanos más potentes con el fin de curar o prevenir la infección por VHB en los seres humanos de manera más eficiente y efectiva.

40

#### **Sumario de la invención**

El objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal con una potente actividad neutralizadora de HBsAg y/o un título más alto que los anticuerpos de la técnica anterior.

45

Este objetivo se consigue proporcionando un anticuerpo monoclonal humano ADRI-2F3 específicamente reactivo con el antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg). Este anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada humana y una cadena ligera, cada una de las cuales comprende una región variable y una constante. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera comprenden cada una 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR) que juntas constituyen el sitio de unión específico para el antígeno HBsAg.

La invención se refiere al anticuerpo monoclonal y sus usos como se define en las reivindicaciones.

50

La invención también se refiere al primer y segundo uso médico del anticuerpo, en particular en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de la infección por hepatitis B.

Se divulga un ácido nucleico que codifica las cadenas pesadas y ligeras variables del anticuerpo según la invención. Estos ácidos nucleicos pueden usarse ventajosamente en la producción de anticuerpos recombinantes con las mismas características de unión comparables o mejoradas que el anticuerpo monoclonal humano ADRI-2F3.

**Descripción detallada de la invención**

5 Tres clones de células B humanas se generan a partir de PBMC de un paciente (PK) convaleciente de hepatitis B aguda y un donante vacunado sano (ADR). Los clones designados PK-3D1 y PK-10C7 secretaban IgG1 $\kappa$  y mostraban una unión de título baja a HBsAg y actividad neutralizadora nula o limitada. Se descubrió que estos clones reconocen un epítipo lineal como lo demuestra su reactividad con el antígeno HBsAg en una transferencia Western con la proteína de envoltura viral S principal de 24 kD.

Sorprendentemente, un clon, obtenido del ADR del donante sano vacunado, reconoció un epítipo conformacional, como se evidencia por la ausencia de reactividad en la transferencia Western.

10 Este clon, designado ADRI-2F3, secretada IgG1 $\lambda$  (IgG1 lambda) y mostraron unión a HBsAg en un ELISA HBsAg de alto título. Para nuestra sorpresa, el anticuerpo exhibió una actividad neutralizante muy potente. Se descubrió que menos de 2,7 nanogramos del anticuerpo era capaz de neutralizar 100 millones ( $10^8$ ) de partículas de VHB.

Human mAb ADRI-2F3 reconoce un epítipo conformacional en HBsAg, y que es probable que el epítipo reside en el primer dominio de bucle extracelular de la proteína principal de S (llamado de otra manera la común determinante "a") como más del 70% de los anticuerpos circulantes en personas vacunadas lo hacen.

15 Se encontró que la capacidad de neutralización de ADRI-2F3 es muy alta. Mientras que los anticuerpos de la técnica anterior (documento WO 2011/045079) fueron efectivos para neutralizar el VHB a concentraciones entre 18 y 88 nanogramos por mililitro (documento WO 2011/045079, página 37, tabla 2), el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención fue capaz de neutralizar VHB eficiente a 2,7 nanogramos por mililitro.

20 La potencia extrema del anticuerpo ADRI-2F3 de acuerdo con la invención fue corroborado además por la determinación de su título protector en un kit de titulación anti-HB estándar (Abbott Architect anti-HBs). Se descubrió que el mAb ADRI-2F3 tenía un título protector de más de 43,000 UI/mg de anticuerpo. En comparación, los anticuerpos VHB-17 y VHB-19 de la técnica anterior (Eren et al., Hepatology 32 (2000), 588-596) tenían títulos de 514 UI/mg y 2,900 UI/mg de anticuerpo en este mismo ensayo. El anticuerpo de la técnica anterior HB-C7A tenía un título protector de 2600 UI/mg de anticuerpo en este ensayo (Antivir. Res. (2007) 75: 113-120 y Antivir. Res. (2008) 79: 188-191) En comparación, el título de protección convencional de anti-HB en personas vacunadas se establece arbitrariamente en 10-12 UI/ml [18].

25 Títulos protectores de anticuerpos de VHB se expresan en unidades internacionales (UI) que permite la estandarización en diferentes ensayos. En 1977, se estableció una Preparación de referencia internacional para la inmunoglobulina anti-HB (W1042). El plasma utilizado en la preparación de este estándar se obtuvo de individuos que habían sido infectados naturalmente con el virus de la hepatitis B [15, 16].

Debido a que sólo 250 viales se prepararon a partir del plasma original, una Segunda Norma Internacional de la OMS para el antígeno de superficie B anti-hepatitis se preparó posteriormente de un grueso de 5% (p/v) de inmunoglobulina hepatitis concentración de proteína B que había sido formulado para una concentración objetivo de 100 UI/ml de acuerdo con la primera preparación de referencia IS [17].

35 El anticuerpo humano ADRI-2F3 se caracterizó por determinación de la secuencia de nucleótidos de sus regiones variables (tabla 1) y las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en la misma (tabla 2). Por lo tanto, la invención se refiere a un anticuerpo o parte del mismo como se define en las reivindicaciones.

40 Como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos de cadena sencilla, regiones de unión a antígeno de fragmentos, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos monoclonales, anticuerpos de dominio único, y similares.

45 El término "o parte del mismo" o "o fragmento del mismo" en el contexto de un anticuerpo u otra molécula de unión específica significa que se refiere a la parte del anticuerpo o molécula de unión específica que forma el sitio de unión específico de la anticuerpo o molécula de unión específica y puede interpretarse como la parte de un anticuerpo o molécula de unión específica que todavía es capaz de reaccionar con el mismo epítipo que el anticuerpo completo o la molécula de unión específica.

50 El término "unión específica de antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg)" se usa aquí para indicar que el anticuerpo debe ser reactivo con HBsAg y no, o sólo en una medida limitada con un antígeno no relacionado. El término HBsAg es conocido en la técnica y se refiere a una proteína de superficie de VHB. HBsAg está codificado por un Gene S, que consiste en un marco de lectura abierto largo, pero contiene tres codones de "inicio" (ATG) en el marco que dividen el gen en tres secciones, pre-S1, pre-S2 y S. Debido a la Se producen codones de inicio múltiple, polipéptidos de tres tamaños diferentes llamados grande, medio y pequeño (pre S1 + pre-S2 + S, pre-S2 + S o S) (Beck et al., World J. Gastroenterol. (2007) 13; 48-64. Debido a que el donante del que se derivó el anticuerpo era un individuo vacunado y las vacunas disponibles actualmente comercialmente están hechas de proteína S, solo se puede inferir que la especificidad era exclusivamente para la proteína S, no antes S1 o pre-S2.

Como se usa en el presente documento, el término “regiones determinantes de complementariedad (CDR)” se refiere a regiones dentro de los anticuerpos (también conocidos como inmunoglobulinas), receptores de células B y receptores de células T, donde estas proteínas complementan la forma de un antígeno. Por lo tanto, las CDR determinan la avidez de la proteína (aproximadamente, la fuerza de unión) y la especificidad para antígenos específicos. Las CDR son la parte más variable de la molécula y contribuyen a la diversidad de estas moléculas, permitiendo que el anticuerpo y el receptor de células T reconozcan un vasto repertorio de antígenos.

En la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de un receptor de antígeno hay tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3), dispuestos de forma no consecutiva. Dado que los receptores de antígeno están compuestos típicamente por dos dominios variables (en dos cadenas de polipéptidos diferentes, cadena pesada y ligera), hay seis CDR para cada receptor de antígeno que pueden entrar en contacto colectivamente con el antígeno. Una sola molécula de anticuerpo tiene dos receptores de antígeno en su mayoría idénticos y, por lo tanto, contiene dos pares de seis CDR, en total doce CDR. Se pueden encontrar sesenta CDR en una molécula de IgM pentamérica.

Dentro del dominio variable, CDR1 y CDR2 se encuentran en la región variable (V) de una cadena de polipéptido, y CDR3 incluye algunos de V, todas las regiones de diversidad (D, cadenas pesadas solamente) y de unión (J). CDR3 es la más variable.

Puesto que la mayor variación de la secuencia asociada con inmunoglobulinas y receptores de células T se encuentran en los CDR, estas regiones también se denominan como regiones hipervariables. Entre estos, CDR3 muestra la mayor variabilidad ya que está codificada por una recombinación de VJ en el caso de una región de cadena ligera y VDJ en el caso de regiones de cadena pesada.

La invención se refiere a un anticuerpo que comprende la totalidad de las regiones de cadena pesada y ligera variable del anticuerpo ADRI-2F3. Por lo tanto, la invención también se refiere a un anticuerpo como se describió anteriormente que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4. En una realización preferida adicional, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano.

En una realización alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo recombinante.

La producción de anticuerpos monoclonales recombinantes se conoce bien en la técnica e implica tecnologías, denominados como clonación de repertorio o de presentación en fago/presentación en levadura. La ingeniería de anticuerpos recombinantes implica el uso de virus o levaduras para crear anticuerpos, en lugar de ratones. Estas técnicas se basan en la clonación rápida de segmentos de genes de inmunoglobulina para crear bibliotecas de anticuerpos con secuencias de aminoácidos ligeramente diferentes a partir de las cuales se pueden seleccionar anticuerpos con especificidades deseadas (Siegel et al., Transfusion clinique et biologique: (2002) Journal de la Société française de transfusion sanguinea 9: 15-22).

Las bibliotecas de anticuerpos de fagos son una variante de las bibliotecas de antígeno fago primera inventados por George Pieczenik (Pieczenik, MRC Laboratory of Molecular Biology (LMB) 2009). Estas técnicas se pueden utilizar para mejorar la especificidad con la que los anticuerpos reconocen los antígenos, su estabilidad en diversas condiciones ambientales, su eficacia terapéutica y su detectabilidad en aplicaciones de diagnóstico (Schmitz et al., (2000). “Phage display: a molecular tool for the generation of antibodies-a review”. Placenta 21 (Suppl A): S106-S112). Las cámaras de fermentación se han utilizado para producir estos anticuerpos a gran escala.

Los anticuerpos como se presentan en este documento pueden ventajosamente ser utilizados para tratar, prevenir o mejorar una infección por el VHB o una enfermedad provocada por el mismo. En un aspecto, la invención se refiere así a un anticuerpo como se describió anteriormente para uso como medicamento, más en particular para uso en el tratamiento o prevención de infección por hepatitis B. El anticuerpo de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para ese propósito ya que neutraliza el virus de la hepatitis B de manera muy eficiente y efectiva.

Como se utiliza aquí, el término “prevención” hace a un proceso imposible por una disposición avanzada. La profilaxis es el proceso de protección contra el desarrollo de una enfermedad específica mediante una acción o tratamiento que afecta la patogénesis.

Debido a su potencia extrema, el anticuerpo puede administrarse en cantidades muy bajas, contribuyendo así a un tratamiento rentable. En general, el anticuerpo puede administrarse preferiblemente a un mamífero para mantener un nivel en suero de entre 12 y 5000 UI por ml de suero. El nivel mínimo es preferiblemente de 12 UI por ml, ya que el título protector convencional de anti-HB en personas vacunadas se establece arbitrariamente en 12 UI/ml. En algunos casos, el nivel mínimo puede ser mayor, como 15, 20, 25, 50, 100 o incluso 200 UI por mililitro de suero o superior. No existe un límite superior para el nivel de anticuerpos, sin embargo, para fines prácticos, se puede establecer un nivel superior en 5000 UI/ml de suero. Los niveles de entre 100 y 500 UI, más preferiblemente entre 150 y 300 UI, tales como aproximadamente 200 UI, se definen arbitrariamente como deseables para evitar la reinfección del injerto hepático. Un límite superior también puede expresarse como 10 mg de anticuerpo por kg de peso corporal del sujeto vacunado por dosis.

En otras palabras, se da a conocer un procedimiento para prevenir o tratar la infección por VHB o una enfermedad provocada de ese modo en un mamífero, que comprende la etapa de administrar al mamífero un anticuerpo humano

comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo a la SEQ ID NO: 2 y una región variable de la cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 en una cantidad efectiva.

- 5 Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento se pueden usar ventajosamente para producir otros anticuerpos tales como anticuerpos recombinantes u otras moléculas de unión eficaces en el tratamiento de la infección por VHB. También pueden usarse como herramientas de investigación, por ejemplo, para crear bibliotecas para la investigación de anticuerpos y reactivos de unión aún más mejorados.

### Leyenda de las figuras

10 Figura 1: curva de titulación del anticuerpo monoclonal de unión a HBsAg en un ELISA. Diamantes: ADRI-2F3, Cuadrados: PK-3D1, Triángulos PK-10C7.

Figura 2: Transferencia Western que muestra la reactividad de los anticuerpos ADRI-2F3 (carriles 1 y 2), PK-10C7 (carril 3) y PK-3D1 (carril 4). Carril 5; suero de control positivo, carril 6; control negativo. MW indica un marcador de peso molecular. Tenga en cuenta que en los carriles 3, 4 y 5 se reconoce una banda de 24 kDa, que indica la unión al polipéptido HBsAg.

15 Figura 3: Actividad neutralizante de tres anticuerpos monoclonales humanos PK-3D1, PK-10C7 y ADRI-2F3 en comparación con el anticuerpo monoclonal de ratón MA18/7. Se muestra aquí que una dilución de 1:10.000 del sobrenadante de anticuerpo monoclonal ADRI-2F3 neutraliza completamente la actividad del VHB, mientras que la EC50 se alcanza a una dilución de 1:100.000.

20 Figura 4: reactividad del anticuerpo recombinante ADRI-2F3 frente a ADRI-2F3 monoclonal humano. La curva de titulación muestra que el anticuerpo recombinante es aproximadamente 10 veces más reactivo que el anticuerpo monoclonal humano original.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Aislamiento de clones de células B específicas de HBsAg.

25 Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron de un donante sano vacunados (ADR) y de una persona convaleciente de hepatitis B aguda (PK). Ambos sujetos mostraron altos títulos séricos de anti-HBsAg. Las PBMC se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad estándar y las células B se purificaron negativamente utilizando un kit de aislamiento de células B (kit de aislamiento de células B II, código No. 130-042-201 MACS-Miltenyi Biotec). Las células B ( $10^6$ /ml, pureza >95%) fueron incubadas con sobrenadante no diluido de la estirpe celular de mono tití B95-8 productiva de EBV durante 24 h a 37 grados Celsius, lavadas e incubadas en medios completos consistentes en RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (código SH30071.03 HyClone), 2,5 µg/ml CpG-2006 (Microsynt) y 10 ng/ml IL-2 (código No. 202-IL R&D Systems) como se describe [8], con la modificación de que se omitió el enriquecimiento de las células B de memoria CD27+. Aproximadamente  $3 \times 10^3$  células B en medio completo se sembraron en cada pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos en presencia de células alimentadoras irradiadas y se incubaron durante 5 días, después de lo cual se añadió IL-6 a una concentración final de 20 ng/ml. Después del evidente crecimiento visual de las células linfoblastoides, los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA para detectar la presencia de anticuerpos anti-envoltura del VHB utilizando una preparación de HBsAg recombinante. Los cultivos que exhibían una densidad óptica de 492 nm >1 se clonaron y subclonaron mediante dilución limitante en medio completo + IL-6 para obtener clones estables de células B específicas de Ag. Un procedimiento general para la clonación de células B mediante dilución limitante se encuentra en las referencias 9-12.

35 Después de la excrecencia visual evidente de células linfoblastoides, los sobrenadantes se ensayaron mediante ELISA para detectar la presencia de anticuerpos de envoltura sobre anti-VHB utilizando una preparación de HBsAg recombinante. Los cultivos que exhibían una densidad óptica de 492 nm >1 se clonaron y subclonaron mediante dilución limitante en medio completo + 20 ng/ml de IL-6 en presencia de células alimentadoras irradiadas para obtener clones estables de células B específicas de Ag.

45 Se derivaron tres clones de células B humanas (ADRI-2F3, PK-10C7 y PK-3D1) de los dos sujetos ADR y PK.

#### Ejemplo 2: Determinación de la especificidad del clon de células B

50 La especificidad de los clones de células B ADRI-2F3, PK-10C7 y PK-3D1 se determinó probando los sobrenadantes mediante ELISA estándar utilizando una preparación de HBsAg recombinante que contiene proteínas pre-S1, pre-S2 y S. ADRI-2F3 monoclonal secretaba IgG1λ, mientras que PK-10C7 y PK-3D1 secretaban IgG1κ. Los tres mAbs mostraron una fuerte unión a HBsAg en ELISA (Fig. 1). La unión de PK-10C7 y PK-3D1 fue comparable, mostraron una unión clara a una dilución de 1/625. El MAb ADRI-2F3 mostró una unión claramente detectable a HBsAg a una dilución de 1/15625.

La unión al determinante común "a" en el polipéptido S se determinó mediante un ELISA de competición utilizando un mAb murino Hyb-824 (Cosmo Bio Co., LTD. Código No. 2ZHB11 Cosmo Bio Co. LTD.) Específico para la misma región. Brevemente, las placas de microtitulación se revistieron con HBsAg a una concentración de 1 mg de tampón de bicarbonato 0,05 M (pH 9,6) por ml a 4°C durante la noche. Después de la saturación con PBS 0,1 M que contiene albúmina de suero bovino al 2% (BSA). El anticuerpo monoclonal murino Hyb-824 se diluyó a una concentración de 200 ng/pocillo y se incubó a concentraciones crecientes (0 ng/w - 400 ng/w) de anticuerpos monoclonales humanos ADRI-2F3, PK3D1 y PK10C7 durante 1 ha 37°C. Las placas se lavaron con PBS + Tween 20 al 0,05%, luego se agregaron 100 ml de HRP-AffiniPure-IgG antimouse (H+L) de cabra diluida (código 115-035-062 Jackson-ImmunoResearch) en BSA-PBS al 2% y se incubaron durante 1 ha 37°C. Después de lavar nuevamente con PBS + Tween20 al 0,05%, se añadieron 100 ml de solución OPD (código S2045 DAKO) y se midió la DO a 492 nm. Humab anti-HCV CM3-B6 y anti-HBV preS1 MA18/7 se usaron como control negativo, mientras que Hyb824 solo se usó como control positivo.

El análisis de transferencia de Western utilizando HBsAg desnaturalizado recombinante como antígeno mostró que PK-10C7 y PK-3D1 reconocen un epítipo insensible de desnaturalización secuencial, situado dentro de una banda correspondiente al peso molecular esperado (24 kDa) de la proteína de envoltura principal S [14], mientras que ADRI-2F3 no se unió a ninguna banda de proteínas, lo que indica que reconoció un epítipo conformacional sensible a la desnaturalización (Fig. 2).

### Ejemplo 3: ensayo de neutralización del VHB y actividad neutralizadora de mAb.

Un ensayo de neutralización se realizó como se ha descrito previamente [13]. Brevemente, se inocularon cultivos primarios de hepatocitos de *Tupaia belangeri* con VHB de suero humano purificado en una proporción de 100 genoma de VHB/hepatocito. Para determinar si la absorción del VHB por los hepatocitos primarios de *Tupaia* podría prevenirse mediante mAbs anti-HB humanos, el VHB se preincubó con tres mAbs humanos diferentes ADRI-2F3, PK-10C7, PK-3D1, a diluciones que varían de 1:10 a 1:10<sup>6</sup>.

La capacidad de neutralización de los mAbs anti-HB humanos se comparó directamente con el anticuerpo MA18/7 específico de preS1 que previamente mostró una actividad neutralizante significativa en el ensayo de infección in vitro de hepatocitos de *Tupaia* [13]. La lectura de la infección por VHB exitosa de estos cultivos fue HBsAg recién producida en un punto temporal entre 11 y 15 días después de la infección. La neutralización se consideró efectiva si no se detectaba producción de proteína viral en el sobrenadante del cultivo [13].

Se encontró que ADRI-2F3 sobrenadante mostró actividad de neutralización fuerte y eficaz hasta una dilución 1:10,000. Como la concentración específica de IgG1 en el sobrenadante fue de 27 microgramos por ml (ug/ml), se puede calcular que el anticuerpo monoclonal ADRI-2F3 neutralizó eficientemente el VHB a concentraciones de al menos 2,7 nanogramos/ml (ng/ml, Fig. 3).

Puesto que la producción del virión HB por los hepatocitos *Tupaia* infectados fue de 10<sup>8</sup>/ml también se puede derivar de que no más de 2,7 ng/ml fueron suficientes para neutralizar 10<sup>8</sup> partículas de VHB.

El sobrenadante de PK mAb mostró comportamientos contrastantes. Por lo tanto, PK-10C7 no neutralizó la infección de los hepatocitos de *Tupaia* en absoluto, mientras que PK-3D1 mostró actividad neutralizante hasta una dilución de 1:10<sup>2</sup> (aproximadamente 200 ng/ml). Esta actividad neutralizante aún demostró ser mejor que el mAb murino MA18/7 anti-pre-S1 estándar utilizado como estándar de neutralización positiva (1:10, correspondiente a una concentración de 100 µg/ml) (Fig. 3).

### 40 Ejemplo 4: secuenciación de dominios variables mAb ADRI-2F3

La secuencia del anticuerpo monoclonal ADRI-2F3 se determinó mediante 5' amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE). El ARN total se extrajo de cultivos de clones de células B viables tratados con tampón que contiene Trizol. Las secuencias de codificación para los dominios variables pesado y ligero se determinaron mediante procedimientos estándar.

45 La secuenciación (en sentido y en dirección antisentido) de n=20 VH y n=20 VL clones de ADNc de la reacción RACE 5' sobre ARN aislado del clon de células B humanas ADRI-2F3 produjo secuencias claras tanto para VH como para los dominios VL (n=38 y 36 secuencias idénticas, respectivamente).

El ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos de las cadenas variables ligera (VL) y las cadenas pesadas variables (VH) se muestran en la Tabla 1.

50

ES 2 747 760 T3

Tabla 1: secuencias de aminoácidos de variables cadenas pesada y ligera de anticuerpo ADRI-2F3

<b>Clon ADRI2F3</b>	<b>Secuencias de ácidos nucleicos</b>	<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Secuencia de aminoácidos</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
<b>Cadena pesada</b>	gaggtgcagg tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc tctgtgcag cctctggatt caggtttagc agctatgcc tgagttgggt ccgccaggct ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta ctggtgaaaa cacatactac gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtac gtgcaaatga acagcctgag agccgaagac acggccgtat attactgtgc gaaagatgcg atcttgggca gtggccaccc ctggtacttc catgtctggg gccgtggcac cctggtcact gtctcctca	<b>1</b>	EVQVLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFRFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSG ISGTGENTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY VQMNSLRAED TAVYYCAKDA ILGSGHPWYF HVWGRGTLVT VSS	<b>2</b>
<b>Cadena ligera</b>	tcctatgtgc tgactcagcc tcctcggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatg	<b>3</b>	SYVLTQPPSV SVAPGQTARM TCGGNNIGSE SVHWFQQKPG QAPVLLVYDD SDRPSGIPER	<b>4</b>

(Continuación)

Clon ADRI2F3	Secuencia de ácidos nucleicos	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
	acctgtgggg gaaacaacat tggagtgaa agtgtgcaact ggttccagca gaagccaggc caggcccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagtagggc cgaagccggg gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtagta gtgatcatgc tgtgttcgga ggaggcacc agctgaccgt cctc		FSGSNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHAVFG GGTQLTVL	

- 5 La alineación de la línea germinal dentro del marco IMGT permitió la identificación de regiones determinantes de complementariedad (CDR) que determinan la especificidad para la unión del anticuerpo al HBsAg. En la tabla 2 se proporcionan detalles de la posición y secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3.

Tabla 2: identificación de CDR del anticuerpo ADRI-2F3

CDR	Cadena	Posición en marco IMGT 1	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
CDR1	Ligera	27 - 38	NIGSES	5
CDR2	Ligera	56 - 65	DDS	6
CDR3	Ligera	105 - 117	QVWDSSSDH	7
CDR1	Pesada	27 - 38	GFRFSSYAM	8
CDR2	Pesada	56 - 65	ISGTGENT	9
CDR3	Pesada	105 - 117	AKDAILGSGHPWYFHV	10

**Ejemplo 5 Clonación y producción eucariota de ADRI-2F3 recombinante hlgG1 lambda.**

- 10 Las secuencias de dominio ligeras y pesadas variables obtenidas como se describió anteriormente, fueron clonados en vectores de expresión eucariota pMQR-hlgG1 y lambda pMQR-GAN (ModiQuest Research). Se produjeron anticuerpos recombinantes en células Hek293 transfectadas transitoriamente (ModiQuest Research). El anticuerpo recombinante derivado del anticuerpo monoclonal ADRI-2F3 se designó como ADRI-2F3-130925NS. El anticuerpo recombinante ADRI-2F3-130925NS fue verificado para contener las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo monoclonal humano ADRI-2F3.
- 15

**Ejemplo 6 Reactividad del anticuerpo recombinante.**

La reactividad de los anticuerpos recombinantes contra HBsAg se determinó en un ELISA, utilizando un sobrenadante del clon de células B original ADRI-2F3\_ para comparación. Con este fin, HBsAg se revistió en

tampón de carbonato en una placa ELISA a 4°C, o/n. Después del bloqueo, se permitió que las diluciones en serie de las preparaciones de anticuerpos se unieran a temperatura ambiente por duplicado. Se lavaron las placas y se visualizó Ab utilizando IgG-HRP de cabra antihumano y TMB (se leyó la extinción a 450 nm).

5 Anticuerpo recombinante ADRI-2F3-130925NS y el anticuerpo monoclonal humano ADRI-2F3 se ensayaron para determinar la reactividad hacia HBsAg y medio completo se utilizó como control negativo.

Anticuerpo recombinante ADRI-2F3-130925NS mostró una especificidad idéntica a la del anticuerpo monoclonal original de ADRI-2F3. El ADRI-2F3-130925NS recombinante demostró ser reactivo frente a HBsAg, mientras que incluso se descubrió que el ADRI-2F3-130925NS recombinante mostraba una reactividad de aproximadamente una escala log10 por encima de la reactividad del clon de células B de origen humano. Esto se muestra en la Figura 4.

10 Este experimento demuestra concluyentemente que un anticuerpo recombinante con la misma especificidad se puede producir a partir del anticuerpo monoclonal humano ADRI-2F3 en el que el anticuerpo recombinante comprende las cadenas variables pesada y ligera de anticuerpo ADRI-2F3. De este modo, se demostró que el anticuerpo monoclonal humano podía clonarse, producirse in vitro y retener su actividad hacia su antígeno objetivo (HBsAg).

## 15 Referencias

1. Lavanchy D. Worldwide epidemiology of VHB infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol* 2005;34:S1-S3.
2. World Health Organization. Available from <www.who.int>.
3. Fox AN, Terrault NA. The option of HBIG-free prophylaxis against recurrent VHB. *J Hepatol* 2012;56:1189-1197.
4. Shouval D, Samuel D. Hepatitis B immune globulin to prevent hepatitis B virus graft reinfection following liver transplantation: a concise review. *Hepatology* 2000;32:1189-1195.
5. Schilling R, Ijaz S, Davidoff M, et al. Endocytosis of hepatitis B immune globulin into hepatocytes inhibits the secretion of hepatitis B virus surface antigen and virions. *J Virol* 2003;77:8882-8892.
6. Samuel D, Muller R, Alexander G, Fassati L, Ducot B, Benhamou JP, et al. Liver transplantation in European patients with the hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1993;329:1842-1847.
7. Terrault NA, Zhou S, McCorry RW, et al. Incidence and clinical consequences of surface and polymerase gene mutations in liver transplant recipients on hepatitis B immunoglobulin. *Hepatology* 1998;28:555-561.
8. Traggiai E, Becker S, Subbarao K, et al. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med*. 2004;10:871-5.
9. Cerino A, Mondelli MU. Identification of an immunodominant B-cell epitope on the hepatitis C virus non structural region defined by human monoclonal antibodies. *J Immunol* 1991;147:2692-6.
10. Cerino A, Boender P, Rosa C, La Monica N, Habets W, Mondelli MU. A human monoclonal antibody specific for the N-terminus of hepatitis C virus nucleocapsid protein. *J Immunol* 1993;151:7005-15.
11. Mondelli MU, Cerino A, Boender P, Oudshoorn P, Middeldorp J, Fipaldini C, La Monica N, Habets W. Significance of the immune response to a major, conformational B cell epitope on the hepatitis C virus NS3 region defined by a human monoclonal antibody. *J Virol* 1994;68:4829-36.
12. Mondelli MU, Cerino A. Production of anti-HCV by human B cell clones and their characterization. In: Lau JYN, Ed., "Hepatitis C Protocols", *Methods in Molecular Medicine*, The Humana Press Inc., Totowa U.S.A., 1998, p. 451-61.
13. Glebe D, Aliakbari M, Krass P, Knoop EV, Valerius KP, Gerlich WH. Pre-S1 Antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. *J Virol* 2003;77:9511-21.
14. Ueda K, Tsurimoto T, Matsubara K. Three envelope proteins of hepatitis B virus: large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles. *J Virol*. 1991;65: 3521-3529.
15. Barker, L. F., D. Lorenz, S. C. Rastogi, J. S. Finlayson, and E. B. Seligmann. 1977. Study of a proposed international reference preparation for antihepatitis B immunoglobulin. WHO Expert Committee on Biological Standardization technical report series. WHO Expert Committee on Biological Standardisation 29th Report BS 77.1164. Geneva, Switzerland, World Health Organization, 1977.
16. World Health Organization: Anti-hepatitis B immunoglobulin. WHO Tech Rep Ser 1978; 626:18.

17. Ferguson, M., M. W. Yu, A. Heath. Calibration of the second International Standard for hepatitis B immunoglobulin in an international collaborative study. Vox Sang 2010;99:77-84.

5 18. Mast, E. E., C. M. Weinbaum, A. E. Fiore, M. J. Alter, B. P. Bell, L. Finelli, L. E. Rodewald, J. M. Douglas, Jr., R. S. Janssen, and J. W. Ward. 2006. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part II: immunization of adults. MMWR Recomm. Rep. 55(RR-16):1-33.

**Listado de secuencias**

<110> Mondelli, Mario

10 <120> Neutralización de anticuerpos monoclonales humanos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

<130> 277 WO

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

15 <211> 369

<212> ADN

<213> homo sapiens

<400> 1

```

gaggtgcagg tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caggtttagc agctatgcca tgagttgggt ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggtta ctggtgaaaa cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtac      240
gtgcaaatga acagcctgag agccgaagac acggccgtat attactgtgc gaaagatgcg      300
atcttgggca gtggccaccc ctggtacttc catgtctggg gccgtggcac cctgggtcact      360
gtctcctca
    
```

20 <210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

ES 2 747 760 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Thr Gly Glu Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Ala Ile Leu Gly Ser Gly His Pro Trp Tyr Phe His Val  
 100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 3

<211> 324

<212> ADN

5 <213> homo sapiens

<400> 3

tcctatgtgc tgactcagcc tccctcgggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatg 60

acctgtgggg gaaacaacat tggaagtga agtgtgcact ggttcagca gaagccaggc 120

caggcccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagtagggt cgaagccggg 240

gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtagta gtgatcatgc tgtgttcgga 300

ggaggcacc agctgaccgt cctc 324

<210> 4

<211> 108

ES 2 747 760 T3

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

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

Thr Ala Arg Met Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Glu Ser Val  
20 25 30

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

Asp Asp Ser Asp 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 Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu  
100 105

5 <210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

Asn Ile Gly Ser Glu Ser  
1 5

10

<210> 6

<211> 3

<212> PRT

<213> homo sapiens

15 <400> 6

Asp Asp Ser  
1

<210> 7

ES 2 747 760 T3

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 7

5 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

10 <400> 8

Gly Phe Arg Phe Ser Ser Tyr Ala Met  
1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

15 <213> homo sapiens

<400> 9

Ile Ser Gly Thr Gly Glu Asn Thr  
1 5

<210> 10

<211> 16

20 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 10

Ala Lys Asp Ala Ile Leu Gly Ser Gly His Pro Trp Tyr Phe His Val  
1 5 10 15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo o parte del mismo capaz de unirse específicamente al determinante "a" del polipéptido S del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y que tiene actividad neutralizante del virus de la hepatitis B (VHB), en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende un fuerte dominio variable de cadena (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4; y en el que el anticuerpo o parte del mismo comprende más de 43,000 UI/mg con respecto a la Preparación de Referencia Internacional para inmunoglobulina anti-HBs.
2. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que es un anticuerpo humano.
3. Anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante.
- 10 4. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en el tratamiento, prevención o profilaxis de la infección por hepatitis B.
5. Anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo se administra a un mamífero en una cantidad suficiente para mantener un nivel mínimo de 12 UI/ml de suero.

Figura 1

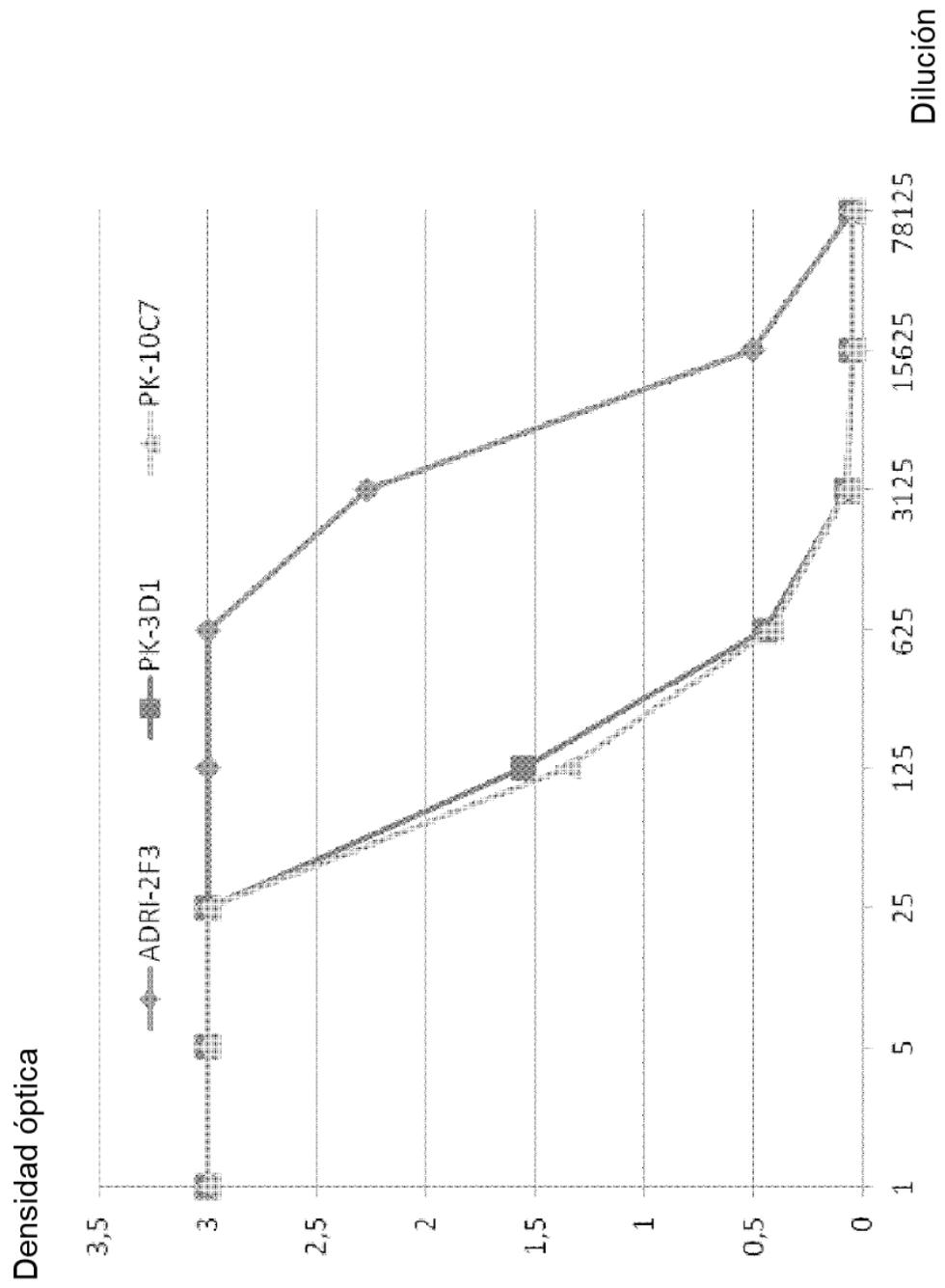


Figura 2

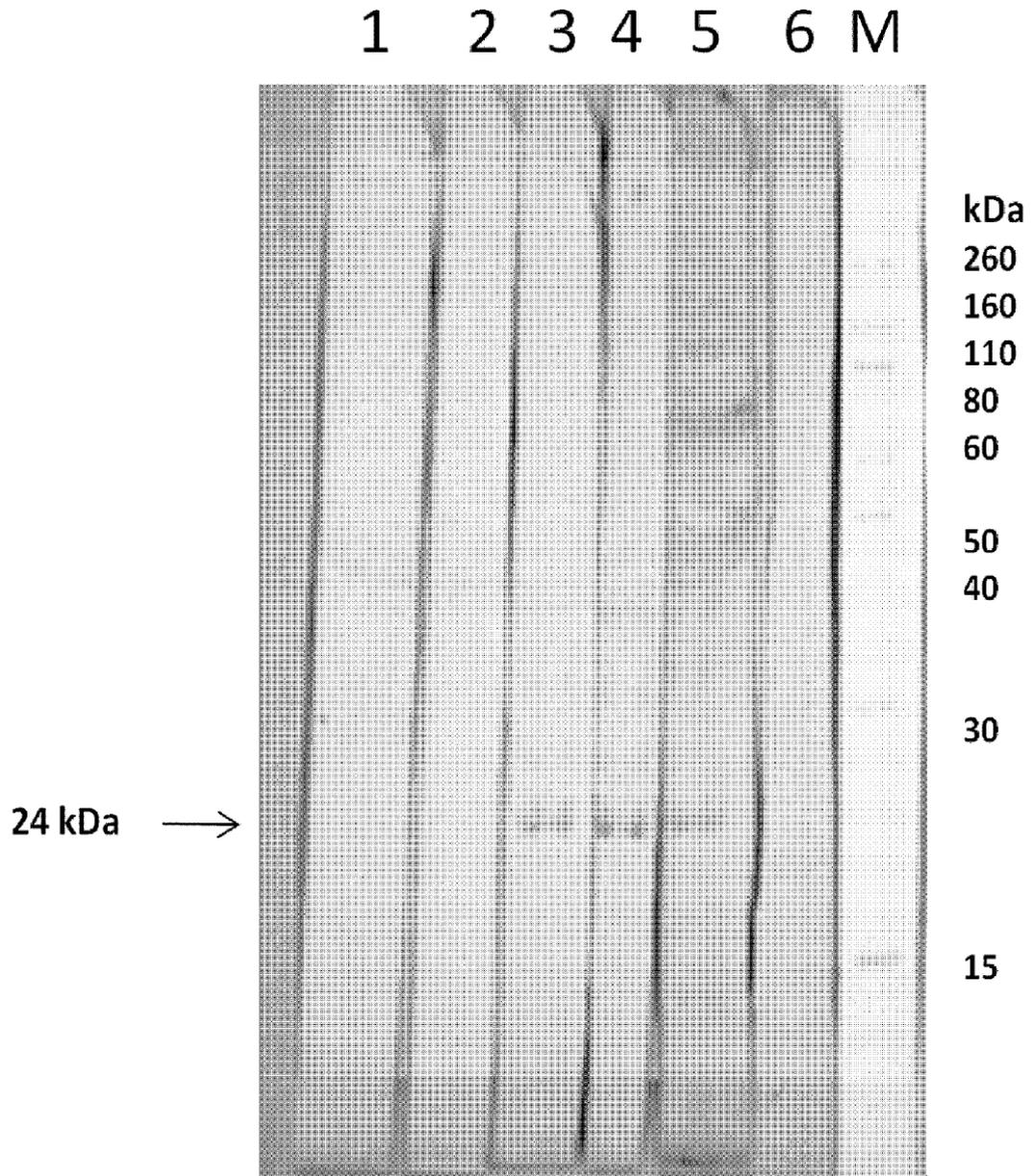


Figura 3

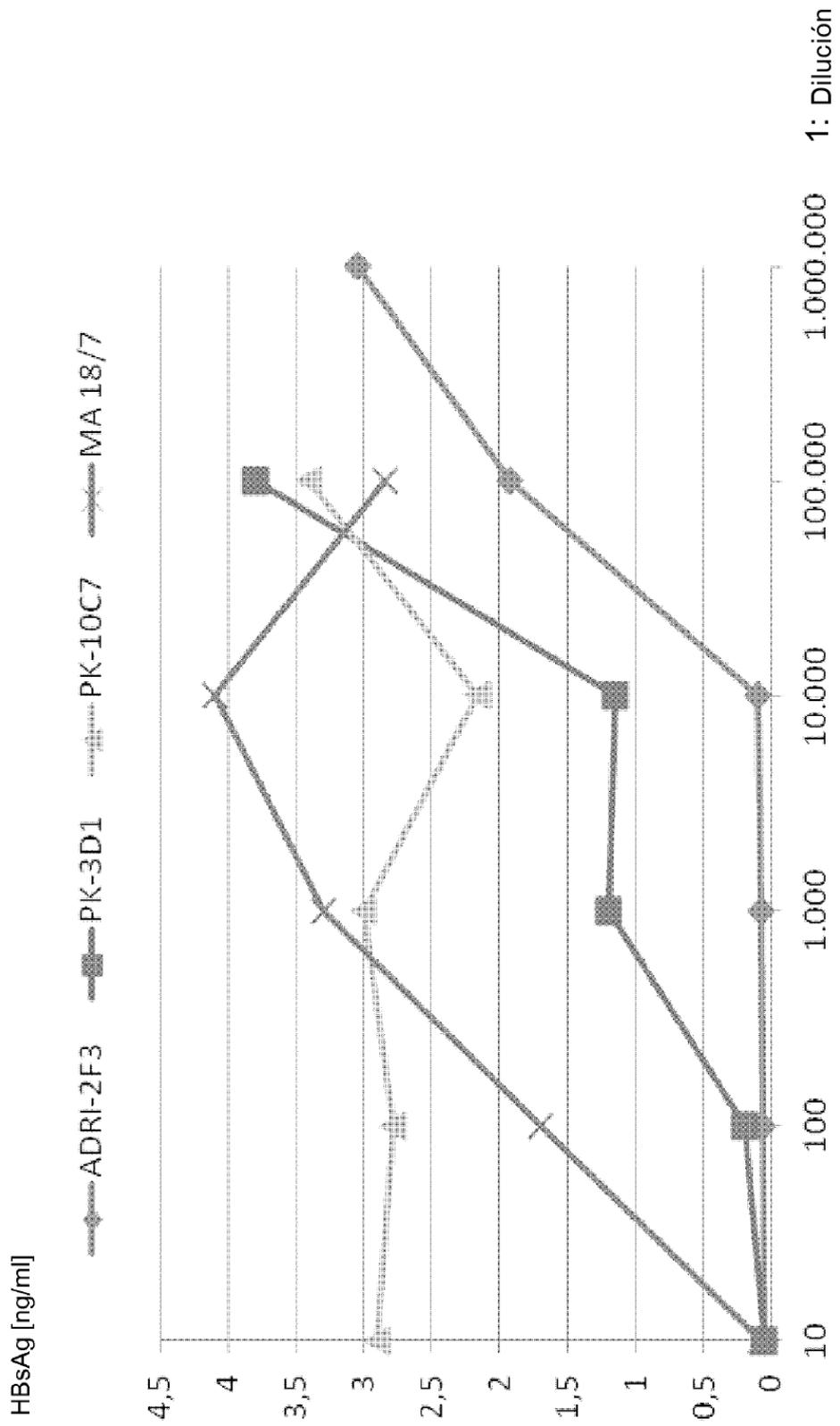


Figura 4

