



### OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

**ESPAÑA** 



11) Número de publicación: 2 785 349

(51) Int. CI.:

C07K 16/16 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61P 39/02 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01) C12N 5/16 (2006.01) C12Q 1/02 C07K 14/415 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

(12)

# TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 31.01.2012 E 16180361 (4) (97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 27.03.2019 EP 3150632
  - (54) Título: Anticuerpos anti-ricina y sus usos
  - (30) Prioridad:

10.06.2011 US 201161495544 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 06.10.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

#### **DESCRIPCIÓN**

Anticuerpos anti-ricina y sus usos

#### 5 Campo de la invención

15

20

60

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-ricina y sus usos. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos anti-ricina y fragmentos de estos, así como también a sus usos en la terapia o la profilaxis.

#### 10 Antecedentes de la invención

La ricina es una glicoproteína de 60-65 kDa derivada de los frijoles de la planta de ricino (Montanaro y otros, 1973). Es una toxina relativamente simple que comprende una proteína enzimática-A (RTA) de toxina de ricina y una proteína de lectina-B de toxina de ricina (RTB) unidas mediante un enlace disulfuro. La RTB es responsable de la unión a residuos de azúcar específicos en la superficie de la célula diana y permite la internalización de la ricina por endocitosis, mientras que la RTA inactiva enzimáticamente el ribosoma para inhibir de manera irreversible la síntesis de proteínas. Una sola molécula de RTA dentro de la célula puede inhibir completamente la síntesis de proteínas, lo que resulta en la muerte celular. La ricina es una de las toxinas más potentes conocidas para los seres humanos, con una LD<sub>50</sub> de 1-20 mg/kg de peso corporal cuando se ingiere y 1-20 µg/kg cuando se inhala o se inyecta (Audi y otros, 2005); esto es 400 veces más tóxico que el veneno de cobra, 1000 veces más tóxico que el cianuro y 4000 veces más tóxico que el arsénico. La ricina se incluye en la lista de amenazas de Categoría B de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Atlanta, EE.UU.) y se considera un alto riesgo terrorista para los civiles. Desafortunadamente, actualmente no existe una terapia o vacuna disponible contra la ricina.

- El desarrollo de productos terapéuticos contra la ricina ha demostrado ser difícil de alcanzar. Se han desarrollado inhibidores químicos dirigidos a la ricina, pero estos se limitan por las altas cantidades necesarias para los efectos a corto plazo y su propia toxicidad (Burnett y otros, 2005; Miller y otros, 2002). El desarrollo de vacunas contra la ricina está en curso, pero hasta la fecha tales vacunas solamente han protegido parcialmente a los ratones contra la ricina (Smallshaw y otros, 2007). De los diferentes enfoques para las contramedidas médicas, el desarrollo de anticuerpos anti-ricina parece ser el más promisorio. Se ha trabajado mucho en el desarrollo de anticuerpos, tanto policionales como monocionales, como productos terapéuticos contra la toxina. Estos anticuerpos se dirigieron contra la cadena A tóxica (lo que bloquea su acción destructiva para el ribosoma) o contra la cadena B de lectina (lo que evita que se una a la célula y penetre en ella). (Neal y otros, 2010; Foxwell BMJ y otros, 1985)
- En el Reino Unido se desarrolló un F(ab)<sub>2</sub> anti-ricina de oveja para investigación y desarrollo, así como también para el uso potencial ante una emergencia. Sin embargo, se necesitan grandes cantidades, aproximadamente 50-100 μg de anticuerpos policlonales (AcP) (Neal y otros, 2010) o 5-100 μg de AcM (Hewetson y otros, 1993; Foxwell y otros, 1985), ya sea para proteger o tratar a un ratón de la intoxicación con ricina dentro de una pequeña ventana de tiempo, lo que proporciona limitaciones significativas para la supervivencia. Por ejemplo, para proteger los ratones ante un reto con 5×LD<sub>50</sub> de ricina tienen que administrarse dentro de 24 horas 5 μg de anticuerpos suministrados por vía intraperitoneal (i.p.) (Neal y otros, 2010), mientras que, después de un reto con 10×LD<sub>50</sub> de ricina tienen que administrarse 100 μg de AcM por ratón dentro de 30 minutos (Guo y otros, 2006).
- N. J. MANTIS y otros, ("Immunoglobulin A Antibodies against Ricin A and B Subunits Protect Epithelial Cells from Ricin Intoxication", INFECTION AND IMMUNITY vol. 74, núm. 6, 1 de junio de 2006, páginas 3455-3462) describen que los anticuerpos anti-ricina 33G2, 35H6 son activos contra la subunidad lectina de ricina (RTB) y que los anticuerpos 23D7 y 25A4 son activos contra la subunidad enzimática de la toxina (RTA). Los cuatro anticuerpos neutralizaron la ricina en un ensayo de citotoxicidad de células Vero.
- MCGUINNESS CAROLYN R y otros, ("Characterization of a novel high-affinity monoclonal immunoglobulin G antibody against the ricin B subunit", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 74. núm. 6, 1 de junio de 2006, páginas 3463-3470) describe dos anticuerpos anti-ricina, uno contra RTA, es decir, R70 y uno contra RTB, específicamente, 24811 y su uso sinérgico para neutralizar la ricina in vitro, lo que sugiere que dichos anticuerpos podrían servir como herramientas inmunoterapéuticas in vivo.

JULIE PRIGENT y otros, ("Neutralising antibodies against ricin toxin", PLOS ONE, PUBLIC LIBARY OF SCIENCE, US, vol. 6, núm. 5, 1 de mayo de 2011, páginas 1-10) describe tres anticuerpos anti-ricina. Dos de estos tres anticuerpos antiricina son anticuerpos anti-RTB, específicamente, RB34 y RB37 y uno es un anticuerpo anti-RTA, es decir, RA36. Los anticuerpos anti-RTB protegen a los ratones más eficientemente que el anticuerpo anti-RTA.

- T. L. Furukawa-Stoffer y otros, ("A novel biological-based assay for the screening of neutralizing antibodies to ricin", Hybridoma, 1 de diciembre de 1999, página 505) describe tres anticuerpos anti-ricina, es decir, HRF4, HHRD7 y HHRD9 y sus usos para proteger ratones.
- Finalmente, Jianxing DAI y otros, ("Identification of a Novel Functional Domain of Ricin Responsible for Its Potent Toxicity", J. Biol. Chem., vol. 286, núm. 14, 8 de abril de 2011, páginas 12166-12171) describe los anticuerpos anti-ricina IgG1 6C2 y 6C3, dichos anticuerpos se usaron con una intoxicación de ricina de 50 μg/kg, i.p. y una administración de AcM de 0,25 mg/kg i.p.

Se informó previamente que los ratones podían inmunizarse mediante el uso de dosis crecientes de ricina, se recolectaban sus bazos, y se creaba un hibridoma mediante la fusión de los linfocitos con células de mieloma (Furukawa-Stoffer y otros, 1999). Después, se usó un método de intoxicación para seleccionar los clones que sobrevivieron en medio de cultivo con ricina porque estos secretaban cantidades suficientes de AcM neutralizantes anti-ricina. Los anticuerpos de estos clones tenían una alta actividad neutralizante contra la ricina, como se evaluó por su unión a la toxina en un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) y por experimentos de neutralización de la ricina. El HRF4 se identificó como el meior AcM.

Si bien HRF4 mostró una actividad promisoria en estudios anteriores, persiste la necesidad en la técnica de disponer de 10 moléculas altamente efectivas para la neutralización de la actividad de la ricina. Tales moléculas serían ventajosas en el desarrollo de la terapia de contramedidas médicas.

Resumen de la invención

15 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-ricina y sus usos. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos anti-ricina y fragmentos de estos, así como también a sus usos en la terapia o la profilaxis.

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

20 la secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) L1 de secuencia KASQDINNYLR (SEQ ID NO:2); la secuencia de la CDR L2 de secuencia RANRLVD (SEQ ID NO:6); y

la secuencia de la CDR L3 de secuencia LQYDEFPYT (SEQ ID NO:10), y

una cadena pesada variable que comprende

la secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) H1 de secuencia EYIIN (SEQ ID NO:14);

la secuencia de la CDR H2 de secuencia WFYPGSGDIKYNEKFKD (SEQ ID NO:18), y 25

la secuencia de la CDR H3 de secuencia NGRWDDDYFDY (SEQ ID NO:22),

en donde el anticuerpo o fragmento de este reconoce específicamente y se une a la ricina.

El anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este como se describe puede comprender: la secuencia de la cadena ligera variable:

> DIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINNYLRWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFS GSGSGQDYSLTISSLEYEDMGFYSCLQYDEFPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:27)

y la secuencia de la cadena pesada variable:

EVQLQESGTGLVKPGASVKLSCKASGYTFTEYIINWVKQRSGQGLEWIGWFYPGSGDIKYNE KFKDKATLTADKSSSTVYMELSRLTSEDSAVYFCARNGRWDDDYFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:28).

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

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

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

- 55 La presente descripción proporciona, además, un método para prevenir los efectos deletéreos causados por la exposición a la ricina o para tratar la exposición a la ricina, que comprende administrar uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, o la composición de la presente invención a un sujeto que lo necesite. El sujeto que lo necesite puede ser un mamífero, tal como un ratón o un humano.
- 60 En el método como se describió anteriormente, el uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, o la composición que los comprende pueden administrarse al sujeto varias horas después de la exposición a la toxina ricina para tratar la exposición a la ricina. Alternativamente, o adicionalmente, el uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, o composición de este, puede administrarse al sujeto varias semanas antes de la exposición a la toxina de ricina para proteger al sujeto contra la exposición a la ricina.

Adicionalmente, una combinación de anticuerpos, o fragmentos de estos, de la presente invención puede proporcionar un efecto sinérgico sobre la actividad neutralizante de la ricina en los métodos como recién se describió. Uno de los anticuerpos o fragmentos de estos puede ser el AcM D9 o un fragmento de este; el segundo anticuerpo o fragmento de este puede ser el AcM B10 o un fragmento de este.

3

30

35

40

45

50

Además, la presente descripción abarca un método para conferir inmunidad contra la ricina que comprende administrar uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, o una composición de la presente invención a un sujeto que lo necesite.

Adicionalmente, la presente descripción proporciona un método para identificar hibridomas que secretan anticuerpos antiricina efectivos, que comprende:

- a) proporcionar células de hibridoma preparadas a partir de linfocitos que se obtienen de ratones inmunizados contra ricina:
- b) exponer las células a altas cantidades de ricina; e
- c) identificar las células que sobreviven a la exposición de la etapa b).

En el método que recién se describió, los ratones a partir de los cuales se obtienen los esplenocitos pueden haberse inmunizado mediante el uso de múltiples dosis letales de ricina. En el método anterior, la alta cantidad de ricina usada en la etapa b) puede estar en el intervalo de 1 a 10 ng/mL o 1 a 5 ng/mL.

15 Se desarrollaron cuatro clones de hibridoma que secretaban altos títulos de anticuerpos IgG anti-ricina. Estos AcM tienen un gran potencial para desarrollarse como agentes terapéuticos basados en anticuerpos o vacunas basadas en genes de anticuerpos contra la ricina. Se encontró que los cuatro AcM tienen una alta potencia para la neutralización de la ricina tanto en un ensayo de neutralización in vitro como en un ensayo de incubación conjunta anticuerpo/ricina in vivo que 20 indica la fuerte inhibición de la muerte celular mediada por ricina. El anticuerpo monoclonal D9, que se encontró ser excepcionalmente activo en el ensayo con ratones, se evaluó posteriormente para la terapia posterior a la exposición y la profilaxis previa a la exposición contra la ricina in vivo. Este protegió a los ratones no solo durante horas, sino además varias semanas (al menos 6 semanas) antes del reto con la toxina (5×LD<sub>50</sub> de ricina), y rescató a los ratones hasta 6 horas después de la intoxicación (5×LD<sub>50</sub> de ricina); adicionalmente, cantidades bajas (0,5 µg) fueron terapéuticas contra 25 cantidades altas de toxina (1 µg de ricina). El anticuerpo D9, además, mostró efectos sinérgicos con otros AcM anti-ricina, según se determinó por el ensayo de neutralización in vitro. Una dosis de 5 µg de anticuerpo en un ratón es equivalente a 1,4 mg en un humano. Estos resultados indican que las cantidades en miligramos del anticuerpo monoclonal específico anti-ricina en volúmenes muy pequeños (0,1 mL) pueden ser suficientes para proteger a los primeros respondedores o tratar las víctimas expuestas a la ricina.

Los aspectos y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes a la vista de la siguiente descripción. La descripción detallada y los ejemplos, si bien indican modalidades preferidas de la invención, se proporcionan solamente a modo de ilustración.

35 Breve descripción de las figuras

5

10

30

Estas y otras características de la invención se describirán ahora a manera de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas, en donde:

- La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra la inmunorreactividad de los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Se realizaron experimentos de ELISA con anticuerpos individuales en dosis variables. Todos los AcM (A9, B10, D3 y D9) se unen a la ricina de una manera dependiente de la dosis. El HRF4 se usó como un control positivo. La absorbancia se leyó a 615 nm.
- 45 La Figura 2 es una transferencia Western del anticuerpo monoclonal B10 contra la ricina para determinar la especificidad general del anticuerpo. Carril 1 ricina en condiciones reductoras (2,2 μg/carril); Carril 2 ricina (1,1 μg/carril); Carril 3 cadena A de ricina (0,4 μg/carril); Carril 4 cadena B de ricina (0,4 μg/carril); M marcadores de peso molecular.
- La Figura 3 es un gráfico que representa la vida media de D9 en suero de ratón. D9 a la dosis de 5 μg se administró por vía i.p. en ratones. Los ratones se sacrificaron en diferentes puntos de tiempo para calcular la concentración plasmática de D9 mediante el uso de un inmunoensayo. El D9 restante en el suero se expresa como porcentajes graficado contra el tiempo en días, en la figura.
- La Figura 4 es un gráfico de barras que representa el efecto de combinar los AcM de la presente invención. Los anticuerpos se mezclaron en una relación de 1:1 (concentración total 313 ng/mL) y se analizaron *in vitro* mediante el uso del colorante Azul de Alamar. Se observó un efecto sinérgico cuando el AcM D9 se combinó con otros anticuerpos de la presente invención.
- La Figura 5 representa la humanización del D9 Fv de ratón mediante injerto de CDR. Los residuos se enumeraron de acuerdo con Kabat. Los CDR se marcaron con cuadros sin sombrear. Los residuos clave de FR se marcaron con \*. Dos residuos clave de FR en D9 VH, que se mantienen en hD9 VH se marcaron con cuadros sombreados. VH D9 (SEQ ID NO:32); VH 1-18 (SEQ ID NO:37); VH JH6 (SEQ ID NO:38); VH hD9 (SEQ ID NO:41); VL D9 (aa 1-107 de SEQ ID NO:31); VL 012 (SEQ ID NO:39); VL Jk4 (SEQ ID NO:40) y VL hD9 (SEQ ID NO:42).
- 65 La Figura 6 representa un diagrama esquemático de la disposición del gen hD9.

La Figura 7 corresponde al análisis mediante SDS-PAGE de hD9 purificado. Las muestras se resolvieron mediante SDS-PAGE. El carril 1 es un marcador de peso molecular; los carriles 2 y 4 son lgG1 y hD9 de control humana en condiciones no reductoras; los carriles 3 y 5 son lgG1 y hD9 de control humana en condiciones reductoras.

#### Descripción detallada de la invención

5

65

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-ricina y sus usos. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos anti-ricina y fragmentos de estos, así como también a sus usos en la terapia o la profilaxis.

La presente invención se dirige a anticuerpos anti-ricina y a fragmentos de estos. La presente invención, además, cubre los métodos para obtener e identificar anticuerpos específicos y eficaces contra ricina. La presente invención, además, incluye los métodos para usar los anticuerpos anti-ricina de la invención en la terapia y la profilaxis anti-ricina.

- 10 La presente invención proporciona un anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este específico para ricina, que comprende
  - una cadena ligera variable que comprende
  - la secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) L1 de secuencia KASQDINNYLR (SEQ ID NO:2); la secuencia de la CDR L2 de secuencia RANRLVD (SEQ ID NO:6); y
- 15 la secuencia de la CDR L3 de secuencia LQYDEFPYT (SEQ ID NO:10), y
  - una cadena pesada variable que comprende
  - la secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) H1 de secuencia EYIIN (SEQ ID NO:14);
  - la secuencia de la CDR H2 de secuencia WFYPGSGDIKYNEKFKD (SEQ ID NO:18); y
  - la secuencia de la CDR H3 de secuencia NGRWDDDYFDY (SEQ ID NO:22).

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

- 30 Las regiones variables de la cadena ligera y pesada son responsables de unirse al antígeno diana y, por lo tanto, pueden mostrar una diversidad de secuencias significativa entre los anticuerpos. Las regiones constantes muestran una menor diversidad de secuencia, y son responsables de la unión de un número de proteínas naturales para inducir eventos bioquímicos importantes. La región variable de un anticuerpo contiene los determinantes de unión al antígeno de la molécula, y así determina la especificidad de un anticuerpo por su antígeno diana. La mayoría de la variabilidad de la secuencia ocurre en seis regiones hipervariables, tres por cada una de las cadenas pesada y ligera variables; las regiones 35 hipervariables se combinan para formar el sitio de unión al antígeno y contribuyen a la unión y al reconocimiento de un determinante antigénico. La especificidad y afinidad de un anticuerpo por su antígeno se determina por la estructura de las regiones hipervariables, así como también por su tamaño, forma y química de la superficie que presentan al antígeno. Existen diversos esquemas para la identificación de las regiones de hipervariabilidad, los dos más comunes son los de Kabat y los de Chothia y Lesk. Kabat y otros (1991) definen las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) 40 con base en la variabilidad de la secuencia en las regiones de unión al antígeno de los dominios VH y VL. Chothia y Lesk (1987) definen los "bucles hipervariables" (H o L) con base en la localización de las regiones del bucle estructural en los dominios VH v VL; la numeración de los bucles hipervariables se define como H1: 26-32 o 34; H2: 52-56; v H3: 95-102 (equivalente a CDR3 de la numeración de Kabat) para los dominios VH/VHH (Chothia y Lesk, 1987). Como estos esquemas individuales definen las CDR y regiones de bucle hipervariable que están adyacentes o se superponen, los 45 expertos en la técnica de anticuerpos a menudo usan los términos "CDR" y "bucle hipervariable" indistintamente, y en la presente descripción pueden usarse así. Los aminoácidos de las CDR en las regiones VH y VL se definen en la presente descripción de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (Kabat y otros 1991).
- La región fuera de las CDR se refiere como la región marco (FR). La FR proporciona integridad estructural al dominio variable y asegura la retención del plegamiento de la inmunoglobulina. Esta estructura característica de los anticuerpos proporciona una armazón estable sobre la cual el sistema inmunitario puede explorar una diversidad sustancial de unión a antígenos para obtener la especificidad para una amplia serie de antígenos (Padlan y otros, 1994). La FR del dominio variable generalmente muestra menos variabilidad de secuencia que las regiones hipervariables.

Un "fragmento de anticuerpo" como se refiere en la presente descripción puede incluir cualquier fragmento de anticuerpo de unión a antígeno adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede incluir, pero de ninguna manera se limita a Fv (una molécula que comprende la V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>), Fv de cadena única (scFV; una molécula que comprende la V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> conectada mediante un enlazador peptídico), Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, anticuerpo de dominio único (sdAb; moléculas que comprenden un dominio variable único y 3 CDR), y presentaciones multivalentes de estos. El fragmento de anticuerpo de la presente invención puede obtenerse mediante la manipulación de un anticuerpo de origen natural (tal como, pero sin limitarse a la digestión enzimática), o puede obtenerse mediante el uso de métodos recombinantes.

Por "específico a la ricina", se entiende que el anticuerpo o fragmento de este de la presente invención reconoce y se une específicamente a la ricina. La ricina es una glicoproteína de 60-65 kDa derivada de los frijoles de la planta de ricino (Montanaro y otros, 1973). Es una toxina relativamente simple que comprende una proteína enzimática-A (RTA) de toxina de ricina y una proteína de lectina-B de toxina de ricina (RTB) unidas mediante un enlace disulfuro. La RTB es responsable de la unión a residuos de azúcar específicos en la superficie de la célula diana y permite la internalización de la ricina por

endocitosis, mientras que la RTA inactiva enzimáticamente el ribosoma para inhibir de manera irreversible la síntesis de proteínas. La toxina de la ricina es una de las toxinas más potentes conocidas para los seres humanos.

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

> DIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINNYLRWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFS GSGSGQDYSLTISSLEYEDMGFYSCLQYDEFPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:27)

y la secuencia de la cadena pesada variable

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

EVQLQESGTGLVKPGASVKLSCKASGYTFTEYIINWVKQRSGQGLEWIGWFYPGSGDIKYNE KFKDKATLTADKSSSTVYMELSRLTSEDSAVYFCARNGRWDDDYFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:28).

Una secuencia sustancialmente idéntica puede comprender una o más mutaciones conservativas de aminoácidos. Es conocido en la técnica que una o más mutaciones conservativas de aminoácidos en una secuencia de referencia pueden producir un péptido mutante sin cambios sustanciales en las propiedades fisiológicas, químicas, o funcionales en comparación con la secuencia de referencia; en tal caso, las secuencias de referencia y mutante se considerarían polipéptidos "sustancialmente idénticos". La mutación conservativa de aminoácidos puede incluir la adición, eliminación, o sustitución de un aminoácido; en un ejemplo no limitante, la mutación conservativa de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos conservativa. Una sustitución de aminoácidos conservativa se define en la presente descripción como la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido con propiedades químicas similares (por ejemplo, tamaño, carga, o polaridad).

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

La identidad de secuencia se usa para evaluar la similitud de dos secuencias; se determina mediante el cálculo del por ciento de residuos que son iguales cuando las dos secuencias están alineadas para una correspondencia máxima entre las posiciones de los residuos. Cualquier método conocido puede usarse para calcular la identidad de secuencia; por ejemplo, el programa informático está disponible para calcular la identidad de secuencia. Sin querer ser limitante, la identidad de secuencia puede calcularse mediante un programa informático tal como el servicio NCBI BLAST2 mantenido por el Instituto Suizo de Bioinformática (y que se encuentra en el sitio http://ca.expasy.org/tools/blast/), BLAST-P, Blast-N, o FASTA-N, o cualquier otro programa informático apropiado que sea conocido en la técnica.

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

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

El anticuerpo, o fragmento de este, de la presente invención abarca, además, constructos quiméricos y humanizados basados en las secuencias de la cadena ligera variable o la CDR de los anticuerpos de la presente invención. Mediante el término "quimérico", se entiende que las regiones ligeras variables de los anticuerpos de la presente invención, como se describió anteriormente, se injertan en las regiones constantes (que pueden incluir C<sub>L</sub>, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, y C<sub>H3</sub>) de una fuente diferente. En un ejemplo específico, no limitante, un constructo quimérico puede comprender las regiones ligeras variables de la presente invención y las regiones constantes humanas. Los métodos para preparar tales constructos quiméricos son bien conocidos por los expertos en la técnica (Sun LK, 1987). Mediante el término "humanizado", se entiende que la CDR

descrita anteriormente puede injertarse en las regiones marco de fragmentos de anticuerpos humanos (Fv, scFv, Fab, sdAb). Los constructos humanizados pueden prepararse mediante el uso de cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, pero no limitado a humanización, injertos de CDR, y modificación superficial. La humanización de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende reemplazar un aminoácido en la secuencia con su contraparte humana, como se encuentra en la secuencia consenso humana, sin pérdida de la capacidad o especificidad de unión al antígeno; este enfoque disminuye la inmunogenicidad del anticuerpo o fragmento de este cuando se introduce en sujetos humanos. En el proceso de injerto de CDR, una o más de una de las CDR definidas en la presente descripción pueden fusionarse o injertarse en una región variable humana (V<sub>H</sub>, o V<sub>L</sub>), o en otras regiones marco de fragmentos de anticuerpos humanos (Fv, scFv, Fab). En tal caso, se conserva la conformación de dicho uno o más de un bucle hipervariable, y además, se conserva la afinidad y especificidad del sdAb por su diana (es decir, ricina). El injerto de CDR es conocido en la técnica y se describe en al menos los siguientes: patente de Estados Unidos núm. 6180370, patente de Estados Unidos núm. 5693761, patente de Estados Unidos núm. 6054297, patente de Estados Unidos núm. 5859205, y patente Europea núm. 626390. La modificación superficial, referida además en la técnica como "remodelado de regiones variables", implica la humanización de las posiciones expuestas al solvente del anticuerpo o fragmento; por lo tanto, los residuos no humanizados enterrados, que pueden ser importantes para la conformación de CDR, se conservan mientras se minimiza el potencial de reacción inmunológica contra las regiones expuestas al solvente. La modificación superficial es conocida en la técnica y se describe en al menos los siguientes: patente de Estados Unidos núm. 5869619, patente de Estados Unidos núm. 5766886, patente de Estados Unidos núm. 5821123, y patente Europea núm. 519596. Los expertos en la técnica estarían ampliamente familiarizados con los métodos para preparar tales fragmentos de anticuerpos humanizados.

10

15

20

25

30

35

40

45

55

60

El anticuerpo o fragmento de este de la presente invención, además, puede comprender secuencias adicionales para ayudar en la expresión, detección, o purificación de un anticuerpo recombinante o fragmento de este. Por ejemplo, y sin querer ser limitante, el anticuerpo o fragmento de este puede comprender una secuencia de direccionamiento o señal (por ejemplo, pero no limitado a ompA), una etiqueta de detección (por ejemplo, pero no limitado a c-Myc, EQKLISEEDL, SEQ ID NO:33), una etiqueta de purificación (por ejemplo, pero no limitado a una etiqueta de purificación de histidina, HHHHH, SEQ ID NO:34), o cualquier combinación de estos.

El anticuerpo, o fragmento de este, de la presente invención puede estar, además, en una presentación multivalente. La multimerización puede lograrse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, y sin querer ser limitante de ninguna manera, la multimerización puede lograrse mediante el uso de moléculas de autoensamblaje (Zhang y otros, 2004; Merritt & Hol, 1995), por ejemplo, como se describió en el documento WO2003/046560. El método descrito produce pentacuerpos mediante la expresión de una proteína de fusión que comprende el anticuerpo, o fragmento de este, de la presente invención y el dominio de pentamerización de la subunidad B de una familia de toxinas AB<sub>5</sub> (Nielson y otros, 2000); el dominio de pentamerización se ensambla en un pentámero, a través del cual se forma una presentación multivalente del anticuerpo o fragmento de este. Cada subunidad del pentámero puede ser la misma o diferente. Adicionalmente, el dominio de pentamerización puede unirse al anticuerpo, o fragmento de anticuerpo mediante el uso de un enlazador; tal enlazador debe tener una longitud suficiente y una composición apropiada para proporcionar una unión flexible de las dos moléculas, pero no debe obstaculizar las propiedades del anticuerpo de unión al antígeno. En un ejemplo no limitante, el enlazador puede ser el enlazador GPGGGSGGGG (SEQ ID NO:35).

La presente invención, además, abarca otras formas de presentación multivalente. Por ejemplo, y sin querer ser limitantes, el anticuerpo, o fragmento de este, puede presentarse como un dímero, un trímero, o cualquier otro oligómero adecuado. Esto puede lograrse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, la conexión de enlace directo (Nielsen y otros, 2000), la interacción c-jun/Fos (de Kruif y otros, 1996), interacción "Perilla en los agujeros" (Ridgway y otros, 1996).

La presente invención abarca, además, secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas como se describe en la presente descripción. La secuencia de ácido nucleico puede ser optimizada por codones. La presente invención abarca, además, los vectores que comprenden los ácidos nucleicos como se describió apropiadamente.

La presente invención comprende adicionalmente células de hibridoma que expresan los anticuerpos de la presente invención. En un ejemplo específico, no limitante, la presente invención proporciona células de hibridoma B10, que expresan el anticuerpo B10.

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

La composición puede estar en cualquier forma adecuada; por ejemplo, la composición puede proporcionarse en forma de suspensión, en forma de polvo (por ejemplo, liofilizada), en forma de cápsula o tableta. Por ejemplo, y sin querer ser limitantes, cuando la composición se proporciona en forma de suspensión, el vehículo puede comprender agua, solución salina, un tampón adecuado o aditivos para mejorar la solubilidad y/o la estabilidad; la reconstitución para producir la suspensión se efectúa en un tampón a un pH adecuado para asegurar la viabilidad de las bacterias. En un ejemplo

específico, no limitante, el vehículo aceptable farmacéuticamente puede ser solución salina. Los polvos secos, además, pueden incluir aditivos para mejorar la estabilidad y/o vehículos para aumentar la masa/volumen; por ejemplo, y sin querer ser limitante, la composición de polvo seco puede comprender sacarosa o trehalosa.

Estaría dentro de la competencia de un experto en la técnica preparar composiciones adecuadas que comprenden los 5 presentes compuestos.

Aún en otra alternativa más, el uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, descrito en la presente descripción puede suministrarse mediante el uso de un enfoque de terapia génica. Por ejemplo, y sin querer ser limitante de ninguna manera, el uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, puede codificarse como un vector de ADN dentro de virus defectuosos (tal como, por ejemplo, pero sin limitarse a adenovirus) para el suministro dentro de las células de un sujeto(s). Los métodos para suministrar vacunas o productos terapéuticos de esta manera son bien conocidos en la técnica (Fang J, y otros, 2005).

15 La presente invención proporciona, además, un método para prevenir los efectos deletéreos causados por la exposición a la ricina o para tratar la exposición a la ricina que comprende la administración de uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, o una composición de este como se describe en la presente descripción a un sujeto que lo necesite. El sujeto que lo necesite puede ser cualquier especie de mamífero que sea susceptible a los efectos de la ricina; por ejemplo, y sin querer ser limitante de ninguna manera, el mamífero puede ser un ratón o un humano.

Cuando se usa el uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, para el tratamiento de la exposición a la ricina, el uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, puede administrarse al sujeto hasta varias horas después de la exposición a la toxina de la ricina para rescatar al sujeto de la muerte. Por ejemplo, el uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, puede administrarse 0, 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, u 8 horas después de la exposición a la ricina, o en cualquier momento entre ellas. En ejemplos específicos, no limitantes, un único anticuerpo, o fragmento de este, como se describió en la presente descripción puede administrarse al sujeto entre 0 y 4 horas después de la exposición a la ricina, mientras que una combinación sinérgica de anticuerpos o fragmentos de este puede administrarse entre 0 y 8 horas después de la exposición a la ricina.

30 Cuando se usa el uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, para prevenir los efectos deletéreos causados por la exposición a la ricina (es decir, la profilaxis), el uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, puede administrarse al sujeto hasta varias semanas antes de la exposición a la toxina ricina. Por ejemplo, el uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, puede administrarse 0, 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, o 9,0 semanas antes de la exposición a la ricina, o en cualquier momento entre ellas para proteger al sujeto contra la exposición 35 a la ricina. En un ejemplo específico, no limitante, un anticuerpo único, o fragmento de este, o una combinación sinérgica de anticuerpos, o fragmentos de este, como se describió en la presente descripción puede administrarse al sujeto entre 0 y 9 semanas antes de la exposición a la ricina.

Como se describió anteriormente, más de un anticuerpo, o fragmento de este, de la presente invención puede combinarse para proporcionar un efecto sinérgico con respecto a la actividad neutralizante de la ricina. Por ejemplo, y sin guerer ser limitante de ninguna manera, el AcM D9 puede combinarse con cualquier uno o más de AcM A9, B10, y/o D3 para proporcionar una actividad mejorada contra la ricina. En un ejemplo específico, el AcM D9 y B10 pueden combinarse para la administración. Adicionalmente, el AcM D9 puede administrarse en combinación con cualquier anticuerpo de la técnica anterior para proporcionar un efecto sinérgico similar; por ejemplo, y sin querer ser limitante de ninguna manera, el AcM 45 D9 puede combinarse con el AcM HRF4.

Aún otro aspecto de la presente invención proporciona un método para conferir inmunidad contra la ricina que comprende administrar uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, como se describe en la presente descripción, o una composición de este. El uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, o composición que lo comprende pueden administrarse por cualquier vía adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, y sin querer ser limitantes, el uno o más de un anticuerpo, o fragmento de este, o la composición que los comprende pueden administrarse por vía subcutánea, intramuscular, oral, o por inhalación.

La presente descripción proporciona un método para identificar hibridomas que secretan anticuerpos anti-ricina efectivos, que comprende:

- a) proporcionar células de hibridoma preparadas a partir de linfocitos que se obtienen de ratones inmunizados contra ricina;
- b) exponer las células a altas cantidades de ricina; e
- identificar las células que sobreviven a la exposición de la etapa b).

En el método como se describió anteriormente, los ratones a partir de los cuales se obtienen los linfocitos pueden haberse inmunizado mediante el uso de dosis crecientes de ricina paso a paso; el aumento de las dosis paso a paso puede extenderse en el intervalo letal. Esto es contrario a los métodos comúnmente usados en la técnica, donde se usan cantidades subletales de ricina, toxoide de ricina o ricina desglicosilada en adyuvante. Las células de hibridoma pueden prepararse a partir de la fusión de linfocitos, que se obtienen de los bazos tomados de ratones inmunizados y de una línea celular de mieloma; esto puede lograrse mediante el uso de cualquier método adecuado conocido en la técnica.

Las células de hibridoma después se exponen a altas cantidades de ricina. Las células de hibridoma pueden aislarse mediante dilución en recipientes individuales (tal como, pero sin limitarse a los pocillos de una placa de microtitulación

8

20

10

25

40

50

55

60

estéril) que contienen medio de cultivo celular estéril. La alta cantidad de ricina usada en la etapa b) del método descrito anteriormente puede ser cualquier concentración final de ricina adecuada; por ejemplo, y sin querer ser limitante de ninguna manera, la concentración final de ricina puede estar en el intervalo de 1 a 5 ng/mL; por ejemplo, la concentración de ricina puede ser 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, o 5 ng/mL, o cualquier concentración en el intervalo como se definió anteriormente. En un ejemplo específico, no limitante, la concentración de ricina puede ser de 5 ng/mL. Esta cantidad de ricina representa un aumento de 25 veces en la ricina por encima de lo que se ha usado en la técnica anterior (Furukawa-Stoffer y otros, 1999); sin desear estar sujeto a la teoría, esto puede proporcionar una selección más rigurosa del hibridoma secretor de anticuerpos y permitir la selección de anticuerpos neutralizantes altamente potentes.

- El método descrito anteriormente puede comprender, además, una etapa para confirmar que el hibridoma de la etapa c) sobrevivió a la exposición de la ricina al evaluar la secreción de anticuerpos anti-ricina efectivos. Esta etapa puede realizarse mediante los métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos secretados por el hibridoma pueden ser altamente efectivos para neutralizar la ricina.
- El método como se describió anteriormente puede incluir, además, una etapa de caracterización del anticuerpo secretado por el hibridoma. La caracterización puede incluir la identificación del isotipo del anticuerpo, la afinidad de unión del anticuerpo y/o la especificidad por la ricina (mediante el uso, por ejemplo, pero sin limitarse a ensayos de ELISA o de resonancia de plasmón de superficie), la actividad del anticuerpo *in vitro* (por ejemplo, pero sin limitarse a la neutralización de la ricina en un cultivo de células Vero) o *in vivo* (por ejemplo, pero sin limitarse a la neutralización de la ricina en un modelo de ratón).
- En la presente descripción se desarrollaron y se describieron cuatro clones de hibridomas que secretan altos títulos de anticuerpos IgG anti-ricina. Estos AcM tienen un gran potencial para desarrollarse como agentes terapéuticos basados en anticuerpos o vacunas basadas en genes de anticuerpos contra la ricina. Se encontró que los cuatro AcM tienen una alta potencia para la neutralización de la ricina tanto en un ensayo de neutralización in vitro como en un ensayo de 25 incubación conjunta anticuerpo/ricina in vivo que indica la fuerte inhibición de la muerte celular mediada por ricina. El anticuerpo monoclonal D9, que se encontró ser excepcionalmente activo en el ensayo con ratones, se evaluó posteriormente para la terapia posterior a la exposición y la profilaxis previa a la exposición contra la ricina in vivo. Este protegió a los ratones no solo durante horas, sino además varias semanas (al menos 6 semanas) antes del reto con la toxina (5×LD<sub>50</sub> de ricina), y rescató a los ratones hasta 6 horas después de la intoxicación (5×LD<sub>50</sub> de ricina); 30 adicionalmente, cantidades bajas (0,5 µg) fueron terapéuticas contra cantidades altas de toxina (1 µg de ricina). El anticuerpo D9, además, mostró efectos sinérgicos con otros AcM anti-ricina, según se determinó por el ensayo de neutralización in vitro. Una dosis de 5 µg de anticuerpo en un ratón es equivalente a 1,4 mg en un humano, que está en el intervalo de dosis letal. Estos resultados indican que las cantidades en miligramos del anticuerpo monoclonal específico anti-ricina en volúmenes muy pequeños (0,1 mL) pueden ser suficientes para proteger a los primeros respondedores o 35 tratar las víctimas expuestas a la ricina.
- Las consideraciones éticas impiden los estudios de eficacia anti-ricina en humanos; por lo tanto, la evaluación de los anticuerpos, o fragmentos de estos, o composiciones de la presente invención debe realizarse en modelos animales. La FDA ha ideado una política, la Norma de los Animales (http://www.fda.gov/cber/rules/humeffic.htm; ver además Federal Register: Mayo 31, 2002 (Volumen 67, Número 105, páginas 37988-37998)), que permite la aprobación de productos terapéuticos o vacunas basadas en estudios de eficacia realizados exclusivamente con modelos animales. La Norma de los Animales requiere que cualquiera de tales modelos animales debe imitar la enfermedad humana, y que el tratamiento terapéutico o la protección provocada por la vacuna en los animales deben predecir la eficacia en los humanos. Basado en los resultados en los modelos animales presentados en la presente descripción y en la Norma de los Animales de la FDA, los anticuerpos o fragmentos de estos, o las composiciones de la presente invención constituyen excelentes candidatos como una vacuna contra la ricina para los animales y los humanos.
- La presente invención se ilustrará además en los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos son solamente para propósitos ilustrativos, y no deben usarse para limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera
  - Ejemplo 1: Preparación de la reserva de trabajo de ricina
- Debido a que la ricina es una posible arma biológica para los terroristas, es muy difícil obtenerla de fuentes comerciales. Se obtuvieron frijoles de ricino y se prepararon reservas de trabajo de ricina. Los detalles sobre la fuente de las semillas de ricino y la preparación de la reserva de trabajo de ricina no pueden divulgarse debido a problemas de seguridad.
- La ricina se preparó a partir de semillas de frijoles de ricino en Defence Research and Development Canada-Suffield.

  Además, se determinó la toxicidad de la reserva de trabajo de ricina. Se determinó una LD50 de ricina para ratones mediante la inyección i.p. de una dilución en serie de ricina en ratones. Los ratones se observaron durante 7 días. La cantidad de ricina para 1×LD50 suministrada mediante la vía i.p. para un ratón hembra Balb/c de 20-25 gramos fue 0,215 μg; 5×LD50 fue 1,075 μg, o aproximadamente 1 μg. Para 5×LD50 de ricina suministrada mediante la vía i.p. los ratones murieron dentro de 1-2 días.
  - Ejemplo 2: Creación y selección de hibridoma

Se usaron ratones para obtener un hibridoma de anticuerpos. Los ratones se mantuvieron en un área segura de BSL-2, cuidados bajo las orientaciones del Consejo Canadiense de Cuidado de Animales (CCAC), y se evaluaron para puntos finales alternativos.

Se inyectaron grupos de 5 ratones hembras BALB/c por vía i.p. con cantidades crecientes de ricina (0,2, 1,0, 5 y 25×LD<sub>50</sub>) del Ejemplo 1 en 0,1 mL de solución salina 0,9 % estéril por ratón. En dependencia de su recuperación (aumento de peso, una carencia de síntomas de la enfermedad), las inyecciones de las cantidades crecientes de ricina fueron de 2-3 semanas de diferencia. Dos semanas después de la dosis final, se sangraron los ratones mediante un corte en la vena de la cola con un bisturí mientras el ratón estaba en una cámara de restricción; la sangre se recolectó en un tubo de microcentrífuga estéril y se dejó coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, la muestra se centrifugó a 2300 × g durante 5 minutos y se recolectó el suero; en casos requeridos, el suero se almacenó a -20°C hasta que se necesitara.

Se realizó el ELISA para determinar los títulos de los anticuerpos IgG anti-ricina. Las placas para ELISA de noventa y seis pocillos (Nunc Maxisorp, Canadian Life Technologies, Burlington, ON) se recubrieron con 100 μL por pocillo de ricina 5 μg/mL en tampón carbonato bicarbonato, pH 9,6, después se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Después de bloquear con BSA diluido, las placas se incubaron con 100 μL de diluciones de suero durante 2 horas a temperatura ambiente. Se detectaron anticuerpos anti-ricina mediante incubación con IgG anti-ratón HRP generada en cabra diluida 1:3000 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) seguida de la adición de un sustrato de tetrametilbencidina peroxidasa (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gathersburg, MD). La absorbancia se midió a 615 nm mediante un lector automático de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Los dos ratones con los títulos más altos se sacrificaron tres días después del último refuerzo para recolectar linfocitos. Estos ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical, después el abdomen se frotó con etanol al 70 % y se abrió con tijeras y pinzas estériles. Los bazos de los ratones inmunizados se disecaron asépticamente y se trituraron suavemente con portaobjetos de vidrio esmerilado, esterilizados en autoclave, en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Invitrogen) y luego se filtraron a través de una malla metálica para preparar esplenocitos. Los hibridomas se produjeron mediante la fusión de los esplenocitos con células de mieloma Sp 2/0 (ATCC número de acceso CRL-1581, ATCC, Rockville, MD) mediante el uso de un kit Clonacell™-HY (StemCell Technologies, Vancouver, BC), siguiendo las instrucciones del fabricante y haciendo crecer estos en medio semisólido con 2,5 ng/mL de ricina (10x dosis letal del cultivo de células de hibridoma). Después de 2 semanas, se recolectaron los clones de hibridoma individuales del medio semisólido, se transfirieron a placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y después se cultivaron durante 1 semana en Medio E Clonacell con 5 ng/mL de ricina (20x dosis letal del cultivo de células de hibridoma) para una selección adicional.

De los clones supervivientes, se eliminó el sobrenadante y se evaluó mediante ELISA (como se describió anteriormente) para detectar anticuerpos anti-ricina. Los anticuerpos se caracterizaron adicionalmente mediante el uso de un kit IsoStrip de Roche Diagnostics (Laval, QC) siguiendo las instrucciones del fabricante. Solamente se usaron posteriormente los clones que expresan anticuerpos IgG. Veinticinco clones sobrevivieron a esta alta concentración de toxina y, a partir de estos, se identificó mediante ELISA un panel de 4 clones de hibridoma (A9, B10, D3, D9) con alta reactividad específica para la ricina.

Ejemplo 3: Purificación y caracterización de anticuerpos

15

20

25

30

40

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

Los clones de hibridoma A9, B10, D3 y D9 se cultivaron por separado en DMEM suplementado con FBS al 10 %. Los anticuerpos monoclonales (AcM) se purificaron a partir de los sobrenadantes del cultivo celular mediante la purificación Melon Gel (Kit de purificación de IgG monoclonal Melon Gel, Pierce, Rockford, IL) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El sobrenadante se dializó durante dos intercambios de 1 hora en Tampón de Purificación de IgG Melon Gel a pH 7,0 y se cargó en una columna que contiene la resina Melon Gel. Después de 5 minutos de incubación con mezclado de extremo a extremo, la IgG purificada se recolectó en la fracción de flujo continuo. Todas las muestras purificadas de IgG se dividieron en alícuotas y se almacenaron a menos 20 °C. La pureza del AcM fue del 85-90 %, según se evaluó por SDS-PAGE (datos no mostrados).

Además, se caracterizó el isotipo de los AcM purificados mediante el uso de un kit IsoStrip™ de ratón. Todos los AcM mostraron el mismo subtipo de cadena pesada, gamma 1, y el mismo tipo de cadena ligera, kappa. La inmunorreactividad de estos AcM a la ricina se investigó mediante ELISA. Todos los AcM se unieron a la ricina (Figura 1) de una manera dependiente de la dosis. El HRF4 (Furukawa-Stoffer, T.L.,1999) se usó como control positivo, que muestra una alta actividad. Particularmente interesante es la actividad promedio mostrada por el anticuerpo D9.

Se determinaron cuatro secuencias variables de anticuerpos neutralizantes contra la ricina mediante el uso de PCR con cebadores degenerados específicos para anticuerpos de ratón (Amersham Pharmacia). Brevemente, se aisló el ARN total de las líneas celulares de hibridoma (Qiagen RNeasy Plus Mini) y se transcribió de manera inversa con Superscript II RNase H¹ (Invitrogen) y un cebador oligo dT (12-18 mer) para producir ADNc. Se usó Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) para amplificar los genes ScFv, V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> con cebadores degenerados (Amersham Pharmacia Biotech) para PCR (Eppendorf Mastercyler de gradiente). Se detectaron distintas bandas de aproximadamente 340 pb para V<sub>H</sub> y aproximadamente 325 pb para V<sub>L</sub> en un gel de agarosa al 1,5 % después del PCR y las bandas se purificaron (Qiagen Gel Extraction) y se clonaron en el vector de clonación Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen) para la secuenciación (Beckman Coulter CEQ 8000 Genetic Analyzer).

Las secuencias de aminoácidos para los dominios variables de AcM A9, B10, D3, y D9 se muestran más abajo, con las regiones CDR subrayadas.

A9 cadena ligera variable

5

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITC<u>KASQDIKQYIA</u>WYQYKPGKGPRLLIH<u>YTSTLQP</u>GIPSRFSG SGSGRDYSFSISNLDPEDIATYYC<u>LQYDHLYT</u>FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:25)

A9 cadena pesada variable

10 KVQLQESGAELMKPGASVKISCKATGYTFS<u>SYWIQ</u>WIKQRPGHGLEWIG<u>EILPGTGNTNYS</u>

<u>EKFKG</u>KATFTTDTSSNTAYMHFSSLTSEDSAVYYCSR<u>CEGEGYFQAWFAY</u>WGQGTTVTVSS

(SEQ ID NO:26)

15 B10 cadena ligera variable

DIVLTQSPSSMYASLGERVTITC<u>KASQDINNYLR</u>WFQQKPGKSPKTLIY<u>RANRLVD</u>GVPSRFS GSGSGQDYSLTISSLEYEDMGFYSC<u>LQYDEFPYT</u>FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:27)

20 B10 cadena pesada variable

EVQLQESGTGLVKPGASVKLSCKASGYTFT<u>EYIIN</u>WVKQRSGQGLEWIG<u>WFYPGSGDIKYNE</u>
<u>KFKD</u>KATLTADKSSSTVYMELSRLTSEDSAVYFCAR<u>NGRWDDDYFDY</u>WGQGTTVTVSS
(SEQ ID NO:28)

D3 cadena ligera variable

DIQMTQSPSSLSAFVGGKVTITC<u>KASQDIKKYIG</u>WYQQKPGKGPRLLIH<u>YTSTLQP</u>GIPSRFSG SGSGRDYSFSISNLEPEDIATYYCLQYDSLYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:29)

D3 cadena pesada variable

KVKLQESGAELMKPGASVKISCKSTGYTFS<u>NYWIE</u>WIKQRPGHGLEWIG<u>EILPGSGSINYDEK</u> <u>FKG</u>KATFTADTSSDTVYMFLSGLTSEDSAVYYCAR<u>QANRGFDSAWFAY</u>WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:30)

D9 cadena ligera variable

DIELTQSHKFMSTSVGDRVSITC<u>KASQDVTAAVA</u>WYQQKPGQSPKLLIH<u>SASYRYT</u>GVPDRFTGSGSGSDFTFTISSVQAEDLAVYYC<u>QQYYNTPLT</u>FGAGTKLELKR (SEQ ID NO:31)

D9 cadena pesada variable

QVQLQESGPELVKPGASMKISCKASGYSFT<u>EHIIN</u>WVKQTHRENLEWIG<u>LINPNSGGTNYN</u>

<u>QKFKD</u>KATLTVDTASNTAYMELLSLTSEDSAVYYCAR<u>LRYDAAY</u>WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:32)

Para determinar la especificidad general de los anticuerpos, las inmunotransferencias se realizaron de la siguiente manera. Ricina, la cadena A de ricina y la cadena B de ricina se separaron mediante SDS-PAGE 10 % en un equipo X-Cell Sure Lock Mini-Cell (Invitrogen). Las proteínas separadas se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF (Millipore Corp. Bedford, Ma) mediante el uso del sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories) con tampón MOPS (MOPS 50 mM, Tris-base 50 mM, SDS 0,1 %, EDTA 1 mM, pH 7,7, y metanol 10 %). Las membranas se bloquearon con el tampón Superblock (Fisher Scientific Company, Canadá), seguido de lavados 3x durante 5 minutos cada uno con PBS que contiene tween-20 0,05 % (PBST). Después las membranas se incubaron con anticuerpos anti-ricina, dilución 1:1000 en tampón Superblock durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBST, las membranas se incubaron con anticuerpos anti-ratón conjugado IgG-HRP generado en conejo (Jackson ImmunoResearch Laboratories) dilución 1:3000 en tampón Superblock a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de 3 lavados con PBST. La unión específica se detectó con el kit ECL (Amersham Biosciences) y se tomó una imagen mediante el uso del sistema VersaDoc™ 5000 (Bio-Rad Laboratories).

En el proceso SDS-PAGE anterior, la ricina se disoció en la cadena B de mayor peso molecular y la cadena A de menor peso molecular. Todos los AcM (A9, B10, D3 y D9) se unen específicamente a la cadena B. En la Figura 2 se muestran los resultados para B10, representativos de otros anticuerpos. Como se muestra, B10 se une a la ricina completa (carril 2) y cadena B (carril 4) pero no a la cadena A (carril 3). Todo el AcM presente se unió a la cadena B, bloqueó su capacidad para unirse a las membranas celulares, y así evitó que la cadena A tóxica penetrara y destruyera a la célula. Esto contrasta con los anticuerpos existentes, donde la mayoría de los candidatos terapéuticos son anticuerpos monoclonales con

actividad de unión contra la cadena A tóxica. Este es un curso lógico, ya que un experto en la técnica buscaría un anticuerpo que pudiera neutralizar la parte tóxica de la ricina para una terapia eficaz.

#### Ejemplo 4: Ensayo de neutralización In vitro

Un ensayo de neutralización *in vitro* que implica la incubación conjunta del anticuerpo y la toxina seguida por la administración al cultivo celular, se usó para evaluar la actividad de la IgG del Ejemplo 3.

La cantidad de anticuerpo se determinó mediante un kit de ensayo de IgG de ratón Easy-Titer (Easy-Titer Mouse IgG Assay Kit, Pierce, Rockford, IL) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En una placa de microtitulación, se adicionaron a cada pocillo 20 µL de perlas sensibilizadas con anti-IgG seguido de 20 µL de la IgG en investigación, a continuación, se mezclaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, la placa se bloqueó con 100 µL de Tampón de Bloqueo durante 5 minutos con la mezcla y se leyó a una absorbancia de 405 nm mediante un lector automático de microplacas (Molecular Devices). Las concentraciones de los anticuerpos fueron 4,8 mg/mL para A9, 0,68 mg/mL para B10, 1,96 mg/mL para D3 y 1,15 mg/mL para D9.

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

Las células Vero se mantuvieron en DMEM con FBS al 10 % (suero bovino fetal) en frascos de cultivo Falcon de 75 cm $^2$  con CO $_2$  5% a 37 °C, con cambios de medio cada 2-3 días. Cuando las células tenían una confluencia del 60-80 %, se usó tripsina para desprender las células, y la concentración de las células se estimó mediante recuento con un hemocitómetro. Las células se diluyeron a 2×10 $^5$  células/mL y 50  $\mu$ L de la suspensión celular se adicionó a cada pocillo en la placa de microtitulación anterior después de 2 horas de incubación de la ricina y el anticuerpo. La placa se incubó con CO $_2$  5 % a 37 °C durante 2 días.

Después de la incubación, se añadieron 20  $\mu$ L de Azul de Alamar (TREK Diagnostic System, Ohio) a cada pocillo y la placa se incubó con CO<sub>2</sub> 5 % a 37 °C durante 5-6 horas. La placa se leyó en un lector de placa (Molecular Devices), a absorbancias de 570 nm y 600 nm, las lecturas se normalizaron mediante la sustracción de la lectura de absorbancia de los pocillos que no tenían células, y el punto de datos fue el promedio de  $A_{570nm} \div A_{600nm}$  de pocillos por triplicado. Como conocería un experto en la técnica, el colorante Amalar se difunde dentro de las células muertas y proporciona una alta absorbancia a 600 nm; si las células son viables, secretarán el colorante y oxidarán el Azul de Alamar, lo que dará una lectura disminuida a 600 nm y una lectura aumentada a 570 nm. Cuando se divide la  $A_{570nm}$  por la  $A_{600nm}$ , los números más grandes indican una mayor viabilidad de las células. Se representó una curva estándar mediante el uso de las lecturas para los pocillos en ausencia de ricina (100 % de viabilidad), altas cantidades de ricina y sin anticuerpos (0 % de supervivencia) y cantidades variables de ricina.

Se usó la curva estándar para evaluar la viabilidad de las células en los pocillos de prueba (ricina incubada conjuntamente con AcM). Los resultados de viabilidad inferiores al 100 % (por ejemplo, 49 %) indican que las células en los pocillos de prueba (ricina + AcM) eran viables pero dejaron de crecer, lo que resulta en lecturas bajas en comparación con las células de control que continuaron creciendo. Los resultados se muestran en la Tabla 1, donde aparece que el AcM B10 se desempeñó mejor en neutralizar la ricina en este ensayo *in vitro*.

Tabla 1. Número relativo de células que sobreviven a 75 ng de ricina/mL incubadas conjuntamente con AcM.

Concentración del AcM	Células v			células) cor ricina + AcM	n administración
(ng/mL)	A9	HRF4			
5000	65	77	60	106	46
1700	79	68	40	49	24
560	51	49	33	24	20
190	24	49	21	19	13
62	7	22	14	14	9
21	9	10	9	15	7
6.9	8	6	7	6	5
2.3	8	7	4	8	7

Ejemplo 5: Ensayo de neutralización in vivo

12

50

5

10

15

20

25

30

35

40

45

55

60

Un ensayo de neutralización *in vivo* que implica la administración del anticuerpo con ricina a ratones se usó para evaluar la actividad de la IgG del Ejemplo 3.

Brevemente, se incubaron diferentes cantidades de anticuerpo (de 0,4 a 10 μg/ratón) conjuntamente con 5×LD<sub>50</sub> de ricina (1 hora, 37 °C, con un mezclado por inversión suave cada 15 minutos); después la mezcla se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) en ratones hembras BALB/c. Se usaron dos patrones de referencia de anticuerpos como controles: anticuerpo policlonal anti-ricina IgG de cabra y AcM HRF4 de ratón. Los resultados son como se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Supervivencia de ratones a los que se les administró 5×LD<sub>50</sub> de ricina incubada conjuntamente con diversas cantidades de anticuerpos. Se proporciona el número de ratones viables en cada día después de la administración.

Anticuerpo	Cantidad (µg)	Día 1 (número)	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 11
Control	0	3	0	-	-	-	-	-	-
Anticuerpo de Cabra	20	3	3	3	3	3	3	3	3
Purificado	4	3	1	0	-	1	-	-	-
	0,8	3	0	-	-	-	-	-	-
HRF4	10	3	3	2	2	1	0	-	-
	2	3	0	-	-	1	-	-	-
	0,5	5	1	0	-	1	-	-	-
	0,4	2	0	-	-	1	-	-	-
A9	10	3	3	3	3	3	3	3	3
	2	3	3	3	3	3	3	3	3
	0,5	5	1	0	-	-	-	-	-
	0,4	3	1	0	-	1	-	-	-
B10	10	3	3	3	3	3	3	3	3
	2	3	3	3	3	3	3	3	3
	0,5	5	5	4	0	1	-	-	-
	0,4	3	1	0	-	1	-	-	-
D3	10	3	3	3	3	3	3	3	3
	2	3	3	3	3	1	1	1	1
	0,5	5	5	3	0	-	-	-	-
	0,4	3	3	0	-	-	-	-	-
	10	3	3	3	3	3	3	3	3
D9	2	3	3	3	3	3	3	3	3
Da	0,5	5	5	5	5	5	5	5	5
	0,4	3	3	3	1	0	ı	ı	-

En los ensayos *in vitro*, el AcM HRF4 fue el mejor AcM de unión en los estudios de ELISA (Ejemplo 3) y B10 fue el mejor anticuerpo neutralizante en el ensayo de cultivo celular (Ejemplo 4). Sin embargo, en ambos ensayos *in vitro* el AcM D9 aparecía no excepcional. Solamente en la presente evaluación en el modelo de ratón *in vivo* D9 demostró tener un mérito excepcional como una contramedida médica contra la ricina. Por lo tanto, los resultados del análisis *in vitro* no son necesariamente indicativos de la eficacia *in vivo* de los AcM anti-ricina. Sorprendentemente, 0,5 μg del anticuerpo D9 fue efectivo para proteger ratones de 5×LD<sub>50</sub> (1 μg de ricina). En este nivel de eficacia, el AcM D9 supera la actividad de todos los otros anticuerpos informados hasta la fecha.

Vale la pena señalar que todos los anticuerpos de la presente invención superaron al anterior anticuerpo monoclonal estándar de referencia, HRF4, así como también a los anticuerpos policlonales anti-ricina de cabra.

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

Las publicaciones existentes sugieren que la ricina penetra a una célula de mamífero después de solo 30 minutos, y que no puede hacerse mucho para rescatar a una víctima o animal más allá de este tiempo. Además, la literatura actual sugiere que los anticuerpos anti-ricina pueden administrarse de horas a unos pocos días antes de la intoxicación con

ricina para proteger a los ratones. En este Eiemplo, se evaluó la supervivencia de los ratones a los que se administraron los anticuerpos del Ejemplo 3 en diversos puntos de tiempo, antes o después de la exposición a la ricina.

Administración de anticuerpos después de la exposición a la ricina: Los ratones se evaluaron mediante el uso del ensayo de neutralización in vivo como se describió en el Ejemplo 5, excepto que se administraron 5 µg de los anticuerpos (A9, B10, D3, D9, HRF4 (control positivo)) 1, 2, 4, o 6 horas después de la exposición a la ricina, o se administró solución salina 1 hora después de la exposición a la ricina (control negativo). Cada grupo experimental comprende 4 ratones. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

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

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

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

Administración de los anticuerpos antes de la exposición a la ricina: Debido a la superioridad del anticuerpo D9 y para disminuir la cantidad de animales requeridos para la experimentación, esta parte de la prueba se realizó mediante el uso solamente del AcM D9. Los ratones se evaluaron mediante el uso del ensayo de neutralización in vivo como se describió en el Ejemplo 5, excepto que se administraron 5 µg del AcM D9 1, 7, 14, 28, o 42 días antes de la exposición a la ricina, o no se administró ningún anticuerpo antes de la exposición a la ricina (control negativo). Cada grupo experimental comprende 4 ratones. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

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

14

55

10

15

20

25

30

35

40

45

50

60

	ı	
	:	1
	1	_

10

45

50

55

60

	Punto de tiempo	Supervivencia
Control negativo		0 *
D9	1 día	4 (100%)
	7 días	4 (100%)
	14 días	4 (100%)
	28 días	4 (100%)
	42 días	4 (100%)
* todos murieron o tuvieron qu	e sacrificarse después de 1 día	•

- La Tabla 4 muestra que, aparte de una pérdida de peso temporal menor (datos no mostrados), no se observaron muertes cuando se administró el anticuerpo D9 1, 7, 14, 28, o 42 días antes de que se administrara a los ratones 5×LD<sub>50</sub> de ricina. Con base en los resultados anteriores, puede formularse la hipótesis de que los AcM A9, B10 y D3 serían similares, aunque solo un poco menos efectivo.
- Dado que hay algo de aclaramiento o recambio con el tiempo, se abordó la cuestión de la cantidad de tiempo necesaria para que los 5 µg de anticuerpo administrado alcancen niveles por debajo de la cantidad protectora de 0.5 µg de anticuerpo (determinado en el Ejemplo 5) dentro del ratón. Para conservar el uso de ratones, se realizó una extrapolación mediante la evaluación de la cantidad de anticuerpo D9 en sangre de ratón a lo largo de diferentes puntos de tiempo. A cada uno de los ratones se les administraron 5 µg de anticuerpo D9, y cada semana se sangró un grupo de ratones a través de la vena de la cola (ver Ejemplo 2), se recolectaron los sueros y la cantidad de anticuerpo D9 en los sueros se evaluó mediante la cuantificación por ELISA (ver Ejemplo 2). Los resultados se muestran en la Figura 3, donde la vida media del anticuerpo anti-ricina D9 se estimó en 18,5 días en los ratones. A partir de estos datos, puede extrapolarse que después de 6 semanas la cantidad de D9 por ratón sería de aproximadamente 1 µg, por encima del mínimo de 0,5 µg. Esta gran ventana de protección es comprensible dado que D9 es un anticuerpo de ratón circulante dentro de los ratones. Un anticuerpo monoclonal anti-ricina humanizado basado en los anticuerpos de la presente invención, circulante en un humano, puede tener una vida media similarmente larga.
- Es difícil comparar la eficacia de diferentes anticuerpos anti-ricina reportados previamente en la literatura mediante el uso de diferentes condiciones experimentales, tales como diferentes rutas de administración de anticuerpos, diferentes modelos animales, etcétera. Sin embargo, dos informes parecen tener condiciones de experimentos similares a los Ejemplos actuales. Un informe mostró que el anticuerpo anti-ricina CD12 o R70, a la dosis de 5, 10, 20, o 40 μg/ratón podría proteger a los ratones contra el reto de 5×LD<sub>50</sub> de ricina cuando se administra el anticuerpo 24 horas antes del reto con ricina (Neal LM, y otros, 2010). El segundo informe mostró que 100 μg/ratón del anticuerpo anti-ricina 4C13 podría rescatar los ratones 30 minutos después del reto con ricina (10×LD<sub>50</sub>; Guo J, y otros, 2006). En contraste, los presentes Ejemplos muestran que la administración de 5 μg/ratón de anticuerpo D9 puede proteger a los ratones durante al menos 6 semanas antes del desafío con ricina (5×LD50) o puede rescatar a los ratones 6 horas después del reto con ricina (5×LD50).

### Ejemplo 7: Efecto sinérgico del AcM D9

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

Los ratones se evaluaron mediante el uso del ensayo de neutralización *in vitro* como se describió en el Ejemplo 4, excepto que se usaron mezclas de los anticuerpos en una relación 1:1 (A9, B10, D3, D9, HRF4), a una concentración total de 313 ng/mL. Además, se usó el anticuerpo solo, a una concentración de 156 ng/mL. Los resultados se muestran en la Figura 4.

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

Para evaluar el efecto sinérgico *in vivo*, se evaluó el efecto de administrar la combinación de D9 y B10 en diversos puntos de tiempo después de la exposición a la ricina. Esto se realizó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6, excepto que 0,5 μg del AcM D9 y 0,5 μg del AcM B10, o 5 μg del AcM D9 y 5 μg de AcM B10. Se observó sinergismo adicional cuando 0,5 μg de AcM D9 y 0,5 μg de AcM B10, o 5 μg de AcM D9 y 5 μg de AcM B10, o solución salina se administraron a los ratones 8 horas después de la intoxicación por ricina (n = 4, en cada grupo). Los resultados se muestran en la Tabla

65 En el Ejemplo 6, el mejor candidato, el AcM D9, no difiere de los controles de solución salina cuando se administra 8 horas después de la intoxicación por ricina (Tabla 3); si la combinación de D9 y B10 tuviera algún efecto sinérgico adicional, este se vería en este punto de tiempo. Los presentes resultados (Tabla 5) mostraron que la combinación de anticuerpos previno la muerte o extendió el tiempo hasta la muerte. Específicamente, 1 de 4 ratones sobrevivió cuando se administraron con 0,5 μg de cada uno de D9 y de B10, mientras que la vida se prolongó unos pocos días para los ratones

administrados con 5 µg de cada uno de D9 y de B10. El tiempo extendido hasta la muerte es alentador, ya que puede abrir una ventana de oportunidad para que las víctimas reciban atención de apoyo y una mayor supervivencia después de la exposición a la ricina.

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

	Núme	ro de rat	tones su	pervivie	ntes de	un grup	o de 4
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Ricina + solución salina	4	0	-	-	-	-	-
0,5µg de AcM D9 + 0,5µg de AcM B10	4	2	1	1	1	1	1
5μg de AcM D9 + 5μg de AcM B10	4	4	3	2	0	-	-

Ejemplo 8: Constructo quimérico de anticuerpos anti-ricina

5

10

15

25

30

35

40

45

50

55

60

65

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

Brevemente, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera para B10 y D9 se injertaron en la región constante de la cadena pesada gamma 1 humana y la región constante de la cadena ligera kappa 1, respectivamente, para ensamblar todos los genes de anticuerpos quiméricos, lo que resulta en B10 y D9 quiméricos.

La secuencia de ADN del anticuerpo quimérico (2 kb) se sintetizó de la siguiente manera. Una secuencia líder de cadena ligera estaba aguas arriba de la cadena ligera, seguida de un enlazador de autoescisión del virus 2A de la fiebre aftosa que codifica para APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 36) antes de la cadena pesada. La secuencia de ADN completa flanqueada por *Kpn I y Hind IIIs*e sintetizó mediante GenScript Corporation (Scotch Plaines, NJ) y se clonó en el vector pUC57, que resultó en pUC57-B10 o D9 quimérico. Se construyó un vector de adenovirus recombinante que expresa B10 quimérico o D9 quimérico mediante el uso del sistema AdEasy (Qbiogene, Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, el fragmento *Kpn I-Hind III* de pUC57- B10 quimérico o pUC57- D9 quimérico se ligó a un vector pShuttle-CMV digerido con *Kpn I-Hind III*. El constructo pShuttle resultante se transformó conjuntamente con el vector pAdEasy-1 en células BJ5183 de *E. coli* para producir un constructo genómico de adenovirus recombinante para la expresión de la proteína hu1A4A1IgG1. El constructo de adenovirus recombinante, pAd- B10 quimérico o D9 se linearizó con *Pac I* y se transfectó en las células HEK 293 (ATCC) cultivadas en el medio de Dulbecco modificado de Eagle suplementado con suero fetal bobino (FBS) 5 % para amplificación y después el adenovirus amplificado se purificó mediante un método cromatográfico.

Para expresar B10 quimérico o D9 quimérico, se infectaron células HEK 293 con el adenovirus recombinante pAdquimérico B10 o pAd-quimérico D9 a una multiplicidad de infección de 1. Las células infectadas se cultivaron durante una semana y se recolectó el sobrenadante del cultivo. El B10 quimérico o D9 quimérico expresados se purificaron mediante el uso de gel de agarosa de proteína L de Pierce Biotechnology (Rockford, IL). Brevemente, el sobrenadante del cultivo se dializó contra solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma-Aldrich) durante 12 horas, después se concentró mediante el uso de PEG (Sigma-Aldrich) a menos de 50 mL. La muestra concentrada se incubó con 2 mL de gel de agarosa de proteína L a 4 °C durante 1 hora. La mezcla de gel y sobrenadante se cargó después en una columna vacía, que posteriormente se lavó con tampón de unión. El B10 quimérico o D9 quimérico unidos se eluyeron con tampón de elución. El Ac eluido fue desalado posteriormente mediante el uso de una columna Excellulose (Pierce Biotechnology), después se concentró mediante Centricon YM-30 (Millipore Corp., Bedford, MA).

Las modalidades y los ejemplos descritos en la presente descripción son ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención como se reivindica. Los inventores pretenden que las variaciones de las modalidades anteriores, que incluyen alternativas, modificaciones y equivalentes, estén abarcadas por las reivindicaciones. Además, la combinación de las características discutidas podría no ser necesaria para la solución inventiva.

Ejemplo 9: Humanización de los anticuerpos

Modelación molecular y análisis estructural del Fv de D9

Se desarrollaron diferentes enfoques para humanizar los anticuerpos murinos para disminuir la antigenicidad de los anticuerpos murinos en los humanos. A pesar del desarrollo de tecnologías de visualización molecular y de animales transgénicos para la generación de anticuerpos completamente humanos, el injerto de CDR para transferir todas las CDR de anticuerpos murinos a las FR de anticuerpos humanos permanece como una estrategia atractiva y comprobada para superar las deficiencias terapéuticas de los anticuerpos murinos.

Los anticuerpos injertados con CDR tienden a perder la afinidad de unión parental. La clave para que en los anticuerpos injertados con la CDR persista la afinidad de unión parental reside en la preservación de la conformación de la CDR murina en el anticuerpo humanizado para la unión al antígeno. La conformación de la CDR depende principalmente de

las estructuras canónicas de la CDR determinadas por unos pocos residuos canónicos conservados localizados en las CDR y en las FR. Además, algunos residuos claves en las FR reajustan la conformación de las CDR. Ellos incluyen los residuos de la zona vernier, que forman una capa subyacente a las CDR y los residuos de empaquetamiento entre cadenas, que aparean las CDR de VH y VL. Para determinar esos residuos clave de FR, el modelo molecular de la región variable de D9 se estableció a través de PIGS (http://www.biocomputing.it/pigs), un servidor web para el modelado automático de dominios variables de inmunoglobulina basado en las VH (2NR6) de anticuerpos más homólogas que comparte 86 % de identidad y VL (1MLB), que comparte 70 % de identidad con las VH y VL correspondientes de D9 en la base de datos de estructura de inmunoglobulinas conocidas. La estructura tres D de D9 se visualizó después mediante el uso de un programa de visualización molecular (Deepview), los residuos de la zona vernier localizados a 5Á de las CDR y los residuos de empaquetamiento entre cadenas localizados a 5Á de la interface VH-VL se identificaron como se muestra en la Figura 5.

#### Humanización del AcM D9

10

25

30

35

40

50

55

60

Hay dos fuentes de secuencias de anticuerpos humanos: madura y germinales. La última tiene dos ventajas sobre la primera como FR donantes para el injerto de CDR murino. La primera es menos inmunogénica, a diferencia de las secuencias maduras que portan mutaciones somáticas para la maduración de la afinidad generada por procesos aleatorios, lo que resulta en una posible inmunogenicidad. La otra es más flexible, lo que resulta en una mayor compatibilidad entre las CDR murinas y las FR humanas. Por lo tanto, las secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana se usan cada vez más como fuente de donantes FR.

Para seleccionar el anticuerpo humano de línea germinal VH, JH y VL, y los candidatos JL como donantes FR para la humanización D9, se determinaron primero las estructuras canónicas de las CDR de D9 con base en la identificación de residuos únicos tanto en las CDR como en las FR, y después se formó una lista corta de VH y VL candidatos de anticuerpos humanos de línea germinal. Estos tenían estructuras canónicas iguales o estrechamente relacionadas con D9 para garantizar que la FR del anticuerpo humano sea compatible con las estructuras canónicas de la CDR de ratón. A continuación, dentro de la lista corta de VH y VL de anticuerpos humanos de línea germinal, aquellos con las CDR de homología más alta y residuos clave en FR 1-3 se seleccionaron como donantes de FR 1-3. Se eligieron JH y JL humanos con base en la homología más alta con CDR3 y los residuos clave en FR 4. En consecuencia, el gen VH humano 1-18, el gen JH 6 se seleccionaron como donantes de FR para la humanización del dominio VH de D9; el gen Vk humano 012 y el gen Jk 4 se seleccionaron como donantes de FR para la humanización del dominio VL de D9 como se muestra en la Figura 5. El setenta y cinco % de los residuos claves de FR de D9 eran iguales a los anticuerpos donantes humanos. Otro 22 % era diferente entre el D9 de donantes murino y humano, pero estas eran sustituciones conservativas en los mismos grupos de aminoácidos, tal como S => T (polar, no aromático con grupos hidroxilo en R), K => R o E => Q o Q => K (polar, hidrófilo), I => M o A => V o L => M (no polar, hidrófobo), H => Y (polar, aromático), V => T (β-C que contienen ramificaciones), S => A (pequeños), D => S (polar). El 3 % restante (2 residuos) no fueron conservados, estos eran VH44 (N ratón versus G humano) y VH82a (L ratón versus R humano). Lo más importante es que VH44-N era un residuo inusual de empaquetamiento entre cadenas. Solamente 0,3 % de VH tiene N en la posición 44, que indica que proviene de una mutación somática, que podría mejorar la unión del anticuerpo. VH82a-L tiene un residuo de la zona de vernier. Ventajosamente, el modelado molecular reveló que ambos no eran accesibles al solvente, lo que indica que no están ubicados en la superficie de Fv y podrían no provocar una respuesta inmunitaria en humanos. Por lo tanto, cuando las CDR de D9 se injertaron en las FR del anticuerpo humano donante, VH44-N y VH82a-L se mantuvieron en el D9 humanizado (hD9).

## 45 Expresión y purificación de hD9

La VH de hD9 se injertó posteriormente en las CH de la cadena pesada gamma 1 humana para formar una cadena pesada completa, mientras la VL se injertó en la cadena ligera CL kappa 1 humana para formar una cadena ligera humanizada completa (Figura 6). Además, en un vector de adenovirus se introdujo una secuencia de autoprocesamiento 2A derivada del virus de la fiebre aftosa entre las secuencias de ADN de las cadenas pesada y ligera para expresar un anticuerpo de longitud completa desde un único marco de lectura abierto dirigido por un promotor único. Para lograr que el hD9 expresado se secretara al medio de cultivo, se adicionó una secuencia líder aguas arriba de VH y VL, respectivamente. La secuencia de ADN completa, que incluye la secuencia líder 012 de la cadena ligera kappa del anticuerpo humano, la cadena ligera humanizada (VL + CL), el enlazador 2A, la secuencia líder de la cadena pesada 1-18, y la cadena pesada humanizada (VH + CH1 + CH2 + CH3), aproximadamente 2 kb se sintetizó como se muestra en la Figura 6 y después se clonó en un vector de adenovirus para la expresión.

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

### 65 Caracterización de la afinidad de hD9

Para evaluar la afinidad de unión de hD9, se usó un biosensor de resonancia de plasmón de superficie (SPR). La ricina se capturó en un chip biosensor, se pasaron varias concentraciones de hD9 o D9 a través de la celda de flujo, y se registró la cinética de unión. Las constantes de velocidad cinética  $k_{on}$  y  $k_{off}$  se calcularon a partir de la velocidad ascendente de

las unidades de resonancia durante la asociación y de la velocidad descendente durante la disociación. La KD de hD9 o D9 para ricina se determinó a partir de la relación de  $k_{off}/k_{on}$ . Como se muestra en la Tabla 6, hD9 tenía una alta afinidad por la ricina con KD de 1,63 nM, incluso más alta que D9 (2,56 nM), lo que indica que la humanización de D9 es exitosa.

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

<u>Anticuerpo</u>	Kon (M-1S-1)	<u>K<sub>off</sub> (S<sup>-1</sup>)</u>	<u>KD (nM)</u>
hD9	4,19×10 <sup>5</sup>	6,8×10 <sup>-4</sup>	1,63
D9	1,835×10⁵	4,7×10 <sup>-4</sup>	2,56

#### Evaluación de la eficacia de hD9

Para evaluar la eficacia de hD9 *in vivo*, se administró ricina a la dosis de 5×LD50 a los ratones por la vía i.p. El hD9 a la dosis de 5 μg se administró por la vía i.p. a las 2, 4, 6 horas después del reto con ricina. El hD9 pudo rescatar los ratones hasta 6 horas después del reto, lo que permitió una supervivencia del 50 % (Tabla 7), comparable a D9, que mostró un 100 % de protección hasta 6 horas después del reto. Este D9 humanizado tiene un uso potencial para fines profilácticos o terapéuticos contra la intoxicación por ricina.

Tabla 7. Supervivencia de los ratones a los que se administró hD9 en diferentes puntos de tiempo después de recibir 5×LD50 de ricina. Se proporciona el número de ratones viables en cada día después de la administración del anticuerpo.

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

#### Referencias

5

10

20

25

30

35

45

50

55

65

Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J.Ricin poisoning: a comprehensive review. JAMA. 2005 Nov 9;294(18):2342-51.

Burnett JC, Henchal EA, Schmaljohn AL, Bavari S. The evolving field of biodefence: therapeutic developments and diagnostics. Nat Rev Drug Discov. 2005 Apr;4(4):281-97.

40 Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J Mol Biol. 1987;196(4):901-17

de Kruif, J. & Logtenberg, T. Leucine zipper dimerized bivalent and bispecific scFv antibodies from a semi-synthetic antibody phage display library. J Biol Chem 271, 7630-7634 (1996).

Eisenberg, D.; E. Schwarz; M. Komaromy & R. Wall (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. J Mol Biol, 179, 125-142

Fang J, Qian JJ, Yi S, Harding TC, Tu GH, VanRoey M, Jooss K.Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide.Nat Biotechnol. 2005 May;23(5):584-90.

Foxwell BM, Detre SI, Donovan TA, Thorpe PE. The use of anti-ricin antibodies to protect mice intoxicated with ricin. Toxicology. 1985 Jan;34(1):79-88.

Furukawa-Stoffer, T.L., Mah, D.C.W., Cherwonogrodzky, J.W., Weselake, R.J. 1999. A novel biological-based assay for the screening of neutralizing antibodies to ricin. Hybridoma 18:505-511.

Guo J, Shen B, Sun Y, Yu M, Hu M. A novel neutralizing monoclonal antibody against both ricin toxin A and ricin toxin B, and application of a rapid sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. Hybridoma. 2006 Aug;25(4):225-9

Hewetson JF, Rivera VR, Creasia DA, Lemley PV, Rippy MK, Poli MA. Protection of mice from inhaled ricin by vaccination with ricin or by passive treatment with heterologous antibody. Vaccine. 1993;11(7):743-6.

Kabat EA, Wu TT. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. J Immunol. 1991;147:1709-19.

Lin JY, Liu SY. Studies on the antitumor lectins isolated from the seeds of Ricinus communis (castor bean). Toxicon. 1986;24(8):757-65.

Merritt, E.A. & Hol, W.G. AB5 toxins. Current opinion in structural biology 5, 165-171 (1995).

Miller DJ, Ravikumar K, Shen H, Suh JK, Kerwin SM, Robertus JD.Structure-based design and characterization of novel platforms for ricin and shiga toxin inhibition. J Med Chem. 2002 Jan 3:45(1):90-8.

5

- Montanaro L, Sperti S, Stirpe F.Inhibition by ricin of protein synthesis in vitro. Ribosomes as the target of the toxin. Biochem J. 1973 Nov;136(3):677-83.
- Neal LM, O'Hara J, Brey RN 3rd, Mantis NJ. A monoclonal immunoglobulin G antibody directed against an immunodominant linear epitope on the ricin A chain confers systemic and mucosal immunity to ricin. Infect Immun. 2010 Jan;78(1):552-61. Epub 2009 Oct 26.
  - Nielsen, U.B., Adams, G.P., Weiner, L.M. & Marks, J.D. Targeting of bivalent anti-ErbB2 diabody antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity. Cancer Research 60, 6434-6440 (2000).

15

- Padlan, E.A. Anatomy of the antibody molecule. Molecular immunology 31, 169-217 (1994).
- Ridgway, J.B., Presta, L.G. & Carter, P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng 9, 617-621 (1996).

20

- Smallshaw JE, Richardson JA, Vitetta ES. RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, protects mice against ricin delivered by gavage or aerosol. Vaccine. 2007 Oct 16;25(42):7459-69. Epub 2007 Aug 30.
- Sun LK, Curtis P, Rakowicz-Szulczynska E, Ghrayeb J, Chang N, Morrison SL, Koprowski H. Chimeric antibody with human constant regions and mouse variable regions directed against carcinoma-associated antigen 17-1A. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jan;84(1):214-8.
  - Zhang, J. y otros, Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents. J Mol Biol 335, 49-56 (2004).

30

Publicación International del PCT núm. WO2003/046560, patente de Estados Unidos núm. 6180370, patente de Estados Unidos núm. 5693761, patente de Estados Unidos núm. 5693761, patente de Estados Unidos núm. 5859205, patente de Estados Unidos núm. 5869619, patente de Estados Unidos núm. 5766886, patente de Estados Unidos núm. 5821123, patente Europea núm. 519596y patente Europea núm. 626390.

35

Listado de secuencias

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

40

- <120> Anticuerpos anti-ricina y sus usos
- <130> 50689-98
- 45 <150> US 61/495,544
  - <151> 2011-06-10
  - <160> 42
- 50 <170> PatentIn versión 3.5
  - <210> 1
  - <211> 11
  - <212> PRT
- 55 <213> Mus musculus
  - <400> 1

60

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

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

- 65 <213> Mus musculus
  - <400> 2

		Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Arc 1 5 10
5	<210> 3 <211> 11 <212> PRT <213> Mus musculus	
10	<400> 3	Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Lys Tyr Ile Gly 1 5 10
15	<210> 4 <211> 11 <212> PRT <213> Mus musculus	
20	<400> 4	Lys Ala Ser Gln Asp Val Thr Ala Ala Val Ala
25	<210> 5 <211> 7 <212> PRT <213> Mus musculus	1 5 10
	<400> 5	
30		Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro 1 5
35	<210> 6 <211> 7 <212> PRT <213> Mus musculus	
	<400> 6	
40		Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp 1 5
45	<210> 7 <211> 7 <212> PRT <213> Mus musculus	
	<400> 7	
50		Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro 1 5
	<210> 8 <211> 7 <212> PRT <213> Mus musculus	
55	<400> 8	
		Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 1 5
60	<210> 9 <211> 8 <212> PRT <213> Mus musculus	
65	<400> 9	
		Leu Gln Tyr Asp His Leu Tyr Thr 1 5

```
<210> 10
     <211> 9
     <212> PRT
     <213> Mus musculus
 5
     <400> 10
                                  Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr
10
     <210> 11
     <211>8
     <212> PRT
     <213> Mus musculus
     <400> 11
15
                                     Leu Gln Tyr Asp Ser Leu Tyr Thr
                                                      5
20
     <210> 12
     <211> 9
     <212> PRT
     <213> Mus musculus
25
     <400> 12
                                   Gln Gln Tyr Tyr Asn Thr Pro Leu Thr
                                   1 5.
     <210> 13
30
     <211> 5
     <212> PRT
     <213> Mus musculus
     <400> 13
35
                                          Ser Tyr Trp Ile Gln
     <210> 14
     <211> 5
40
     <212> PRT
     <213> Mus musculus
     <400> 14
45
                                          Glu Tyr Ile Ile Asn
     <210> 15
50
     <211> 5
     <212> PRT
     <213> Mus musculus
     <400> 15
55
                                           Asn Tyr Trp Ile Glu
                                           1 5
60
     <210> 16
     <211> 5
     <212> PRT
     <213> Mus musculus
65
     <400> 16
                                             Glu His Ile Ile Asn
```

```
<210> 17
     <211> 17
      <212> PRT
      <213> Mus musculus
 5
      <400> 17
                      Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Asn Thr Asn Tyr Ser Glu Lys Phe Lys
                                       5
                                                            10
                      1
                                                                                 15
10
                      Gly
      <210> 18
15
      <211> 17
      <212> PRT
      <213> Mus musculus
      <400> 18
20
                      Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
                     Asp
25
      <210> 19
      <211> 17
      <212> PRT
      <213> Mus musculus
30
      <400> 19
                     Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asp Glu Lys Phe Lys
                                                          10
35
                     Gly
      <210> 20
40
      <211> 17
      <212> PRT
      <213> Mus musculus
      <400> 20
                    Leu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
45
                    Asp
50
      <210> 21
      <211> 13
      <212> PRT
     <213> Mus musculus
55
      <400> 21
                            Cys Glu Gly Glu Gly Tyr Phe Gln Ala Trp Phe Ala Tyr
     <210> 22
60
      <211> 11
      <212> PRT
      <213> Mus musculus
65
      <400> 22
                                 Asn Gly Arg Trp Asp Asp Asp Tyr Phe Asp Tyr
```

5	<210> 23 <211> 13 <212> PRT <213> Mus muscul <400> 23	lus															
10	<210> 24 <211> 7 <212> PRT <213> Mus muscul	lue	G: 1	lņ A	la As	sn Ai	rg Gi 5	ly Ph	ne As	sp Se	er Al	la Ti		ne Al	la Ty	/r	
15	<400> 24	lus				-		m		71-	. 7.1						
						Leu 1	Arç	Tyr	Asp	5 5	a Ala	a Tyi	r				
20	<210> 25 <211> 107 <212> PRT <213> Mus muscul	lus								. <b>J</b>							
25	<400> 25																
30		1				5	•				10					Leu 15	
		Gly	Lys	Val	Thr 20	lle	Thr	Cys	гуs	25	Ser	GIn	Asp	TTE	1ys 30	Gln	Tyr
35		Ile	Ala	Trp 35	Tyr	Gln	Tyr	Lys	Pro 40	Gly	Lys	Gly	Pro	Arg 45	Leu	Leu	Ile
40		His	Tyr 50	Thr	Ser	Thr	Leu	Gln 55	Pro	Gly	Ile	Pro	Ser 60	Arg	Phe	Ser	Gly
45		Ser 65	Gly	Ser	Gly <sub>.</sub>	Arg	Asp 70	Tyr	Ser	Phe	Ser	Ile 75	Ser	Asn	Leu	Asp	Pro 80
		Glu	Asp	Ile	Ala	Thr 85	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln 90	Tyr	Asp	His	Leu	Tyr 95	Thr
50		Phe	Gly	Gly	Gly 100	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile 105	Lys	Arg					
55	<210> 26 <211> 122 <212> PRT <213> Mus muscul	lus															
	<400> 26																

		, Ly:	s Va	l Glr	Leu	Gln 5	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu 10	Leu	Met	Lys	Pro	Gly 15	Ala
5		Sei	va.	l Lys	Ile 20	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr 25	Gly.	Tyr	Thr	Phe	Ser 30	Ser	Туг
10		Trį	o Il	e Glr 35	ı Trp	Ile	Lys	Gln	Arg 40	Pro	Gly	His	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Ile
		Gl	y Gl 50	u Ile	e Leu	Pro	Gly	Thr 55	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr 60	Ser	Glu	Lys	Phe
15		Lу. 65		у Гуз	s Ala	Thr	Phe	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser 75	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr 80
20		Me	t Hi	s Phe	e Ser	Ser 85	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp 90	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys
25		Se	r Ar	g Cys	s Glu 100	-	Glu	Gly	Tyr	Phe 105		Ala	Trp	Phe	Aļa 110	_	Trp
		G1	y Gl	n Gly		Thr	Val	Thr	Val 120		Ser						
30																	
35	<210> 27 <211> 108 <212> PRT <213> Mus musco <400> 27	ulus															
40		Asp I	le V	/al I	eu T 5		ln.Se	er Pi	ro Se	er Se		et T	yr A	ľa S	er Le 1		ly
45		Glu A	Arg '		hr I	le Ti	ar Cy	ys L	ys A. 2		er G	ln A	sp I	le A		sn T	yr
45		Leu A	-	Trp E 35	he G	ln G	ln Ly	ys P: 40		ly L	ys S	er P.		ys T	hr Le	eŭ I	le
50		Tyr A	Arg i	Ala A	sn A	rg L	eu Va ,5!		sp G	ly Va	al P.	ro S 6		rg P	he S	er G	ly
55		Ser ( 65	Gly:	Ser G	ly G	ln A		yr Se	er L	eu Ti	hr I. 7		er S	er L	eu G		yr O
60	·	Glu	Asp	Met		85	Tyr S	Ser (	Cys 1		Sln 1 90	?yr <i>l</i>	Asp (	Glu 1		Pro 1	<b>l</b> yr'
65				Thr	Phe	Gly		Gly	Thr	Lys	Leu	Glu 105	Ile	Lys	Arg		
	<210> 28 <211> 120 <212> PRT																

## <213> Mus musculus

# <400> 28

5		. G		Val	Gln	Leu	Gln 5	Glu	Ser	Gly	Thr	Gly 10	Ļeu	Val	Lys	Pro	Gly 15	Ala
10		s	er	Val	Lys	Leu 20	Ser	Суѕ	Lys	Ala	Ser 25	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr 30	Glu	Tyr
		ı	le	Ile	Asn 35	Trp	Val	Lys	Gln	Arg 40	Ser	Gly	Gln	Gly	Leu 45	Glu	Trp	İle
15		G	ly	Trp 50	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ser 55	Gly	Asp	Ile	Lys	Tyr 60	Asn	Glu	Lys	Phe
20			ys 5	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu 70	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser 75	Ser	Ser	Thr	Val	Tyr 80
25		M	let	Glu	Leu	Ser	Arg 85	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp 90	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe 95	Cys
		.A	la	Arg	Asn	Gly 100	Arg	Trp	Asp	Asp	Asp 105	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp 110	Gly	Gln
30		G	ly	Thr	Thr 115	Val	Thr	Val	Ser	Ser 120		,e						
35	<210> 29 <211> 107																	
	<212> PRT <213> Mus muscu	ılus																
40		Asp	Il	e Gl	n Me		ır Gl	n Se	r Pr	o Se			u Se	er Al	la P)			Ly
40 45	<213> Mus muscu	Asp 1				5 r Il				o Se 's Al 25	10 a Se					ls ys Ly	5	
	<213> Mus muscu	Asp 1 Gly	Ly	s Va	1 Th 20	5 r I1	e Th	r Cy	ys Ly	s Al	10 a Se	r Gl	n As	sp Il	le L	19 ys Ly )	o Ys Ty	/r
45	<213> Mus muscu	Asp 1 Gly Il	Ly e G	s Va Sly T	1 Th 20 Prp T	5 r Il	e Th	r Cy Gln I	Lys Ly	s Al 25 Pro G	10 a Se	r Gl	n As	3p [] Pro <i>[</i>	le Ly 30 Arg	19 ys Ly ) Leu I	ys Ty Leu 1	r Ile
45	<213> Mus muscu	Asp 1 Gly Ile	Ly e G	s Va Gly T	1 Th 20	5 Gyr (	e Th	r Cy Sln I	s Ly Lys I 2 Gln I	s Al 25 Pro G	10 a Se aly I	r Gl ys C	n As	er i	le Ly 30 Arg 15	ys Ly ) Leu I	5 ys Ty Leu !	yr Ile Gly
45 50 55	<213> Mus muscu	Asp 1 Gly Ild Hi	Ly e G s T	s Va	1 Th 20	5 r Il	e Th	r Cy lin I eu (	ys I .ys I	es Al 25 Pro G	10 a Se	r Gl ys C	n As	PPro 1	le Li 30 Arg :	19 ys Ly ) Leu I	o eu ! eu !	ero

_	<210> 30 <211> 122 <212> PRT <213> Mus muscul	us															
5	<400> 30																
10			Val	Lys	Leu	Gln 5	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu 10	Leu	Met	Lys	Pro	Gly 15	Ala
		Ser	Val	Lys	Ile 20	Ser	Cys	Lys	Ser	Thr 25	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser 30	Asn	Tyr
15		Trp	Ile	Glu 35	Trp	Ile	Lys	Gln	Arg 40	Pro	Gly	His	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Ile
20		Gly	Glu 50	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser 55	Gly	Ser	Ile	Asn	Tyr 60	Asp	Glu	Lys	Phe
05		Lys 65	Gly	Lys	Ala	Thr	Phe 70	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser 75	Ser	Asp	Thr	Val	Tyr 80
25		Met	Phe	Leu	Ser	Gly 85	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp 90	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys
30		Ala	Arg	Gln	Ala 100	Asn	Arg	Gly	Phe	Asp 105	Ser	Ala	Trp	Phe	Ala 110	Tyr	Trp
35		Gly	Gln	Gly 115	Thr	Thr	Val	Thr	Val 120	Ser	Ser						
40	<210> 31 <211> 108 <212> PRT <213> Mus musculi	us															
	<400> 31																
45		Asp 1	Ile	Glu	Leu	Thr 5	Gln	Ser	His	Lys	Phe 10	Met	Ser	Thr	Ser	Val 15	Gly
50		Asp	Arg	Val	Ser 20	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala 25	Ser	Gln	Asp	Val	Thr 30	Ala	Ala
		Val	Ala	Trp 35	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro 40	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys 45	Leu	Leu	Ile
55		His	Ser 50	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr 55	Thr	Gly	Va <b>l</b>	Pro	Asp 60	Arg	Phe	Thr	Gly
60		Ser 65	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp 70	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile 75	Ser	Ser	Val	Gln	Ala 80
65		Glu	Asp	Leu	Ala	Val 85	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln 90	Туr	Tyr	Asn	Thr	Pro 95	Leu
		Thr	Phe	Gly	Ala 100		Thr	Lys	Leu	Glu 105	Leu	Lys	Arg				

```
<210> 32
      <211> 116
      <212> PRT
      <213> Mus musculus
 5
      <400> 32
                      Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys. Pro Gly Ala
                                                            10
10
                      Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Glu His
15
                      Ile Ile Asn Trp Val Lys Gln Thr His Arg Glu Asn Leu Glu Trp Ile
                                                   40
                      Gly Leu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
20
                                               55
                    Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ala Ser Asn Thr Ala Tyr 65 70 75 80
25
                    Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
30
                    Ala Arg Leu Arg Tyr Asp Ala Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
                                 100
                                         . 105
                    Thr Val Ser Ser
35
                            115
     <210> 33
      <211> 10
40
      <212> PRT
      <213> Secuencia artificial
      <220>
      <223>Detección de etiqueta c-Myc
     <400> 33
45
                                  Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
                                                  5
50
     <210> 34
     <211> 5
      <212> PRT
      <213> Secuencia artificial
      <220>
55
      <223> Etiqueta de Histidina para purificación
      <400> 34
                                              His His His His
                                                          5
60
      <210> 35
      <211> 11
     <212> PRT
65
      <213> Secuencia artificial
      <220>
      <223> Enlazador
      <400> 35
```

Gly Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser 5 <210> 36 <211> 24 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> 10 <223> Enlazador <400> 36 Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly 10 15 Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro 20 . 20 <210> 37 <211>98 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 37 25 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala 30 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 35 Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu 55 40 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr 70 45 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 90 Ala Arg 50 <210> 38 <211> 18 <212> PRT 55 <213> Homo sapiens <400> 38 Tyr Asp Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val 10 15 5 60 Ser Ser <210> 39 65 <211> 95 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 39

		Asp 1	Ile	Gln	Met	Thr 5	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser 10	Leu	Ser	Ala	Ser	Val 15	Gly
5		Asp	Arg	Val	Thr 20	Ile	Thr	Cys <sub>.</sub>		Ala 25	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser 30	Ser	Tyr
10		Leu	Asn	Trp 35	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro 40	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys 45	Leu	Leu	Ile
15		Туг	Ala 50	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln 55	Ser	Gly	Val	Pro	Ser 60	Arg	Phe	Ser	Gly
		Ser 65	Gly <sub>.</sub>	Ser	Gly	Thr	Asp 70	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile 75	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro 80
20		Glu	Asp	Phe	Ala	Thr 85	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln 90	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro 95	
25	<210> 40 <211> 12 <212> PRT <213> Homo sap	oiens															
	<400> 40																
30				Le	a Th	r Ph	e Gl	y Gly 5	y Gl	y Thi	r Ly	s Val	l Gli 10	u Il	e Ly	s	
35	<210> 41 <211> 116 <212> PRT <213> Secuencia	a artif	icial														
40	<220> <223> VH de hD	9															
40	<400> 41																

		G 1		al	Gln		Val 5	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu 10	Val	Lys	Lys	Pro	G1 15	-	.a
5		s -	er 1	/al	Lys	Val 20	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser 25	Gly	Tyr	Thr	Phe	Th: 30	r Gl	u H	is
10		Ι	le 1	Ile	Asn 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Gly	Gln	Asn	Leu 45	Gl:	ı Tr	p Me	et
15		G	_	Leu 50	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser 55	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr 60	Asn	G <b>1</b> 1	n Ly	rs Pl	ne
			ys : 5	Asp	Arg	Val	Thr	Met 70	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser 75	Thr	Sei	î Th	r Al	la T 8	-
20			let ·	Glu	Leu	Leu	Ser 85	Leu	ı Arg	Ser	Asp	Asp 90	Thr	Ala	Va.	L Ту	r Ty 99	•	ys
25		Þ	ala .	Arg	Leu	Arg 100	Tyr	Asp	Ala	Ala	Tyr 105	Trp	Gly	Gln	Gly	7 Th 11		nr V	al
30	040-40	Γ,	hr.	Val	Ser 115	Ser			٠										
	<210> 42 <211> 107 <212> PRT <213> Secuencia	a arti	ficial																
35	<220> <223> VL de hD	9																	
40	<400> 42		Asp	o Il	e Gl	.n Me	et Tl	nr G	ln Se	er Pi	co Se	er Se	er L∈	eu Se	er A	.la :	Ser	Val	Gly
45		<b>(1</b> )	1				5		hr C			10	)					15	_
			nup	, 11	y vc	20		16 1.		75 D	25		.1 61	ш д.	ab v		30		
50					_	_	_			_				_	_		_		_
			Val	. A1	a Tr 35		r G	ln G	ln Ly	/S P3		ly Ly	/s A]	la P		ys : 5	Leu	Leu	Ile
55		Туі		r A	35	1		rg ۱	ln Ly Cyr T 55	4(	)			er A	rg l	5			
		-	s <b>Se</b> 50	r A	35 la S	er T	yr <i>F</i> hr <i>F</i>	rg آ	fyr T	4( hr G	) :1y ∇	al P	ro S 6	er A O	rg l	5 ?he	Ser	Gly	
55 60		Sei 65	s Se 50	r A	35 la S er G	er T ly T	yr A	Arg I	fyr I 55	4( hr G	) :ly V :eu T	al P hr I 7	ro S 6 1e S 5	er A O er S	rg I	5 Phe Leu	Ser Gln	Gly Pro	

#### REIVINDICACIONES

- Un anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este, que comprende una cadena ligera variable que comprende una CDR L1 de secuencia KASQDINNYLR (SEQ ID NO:2), una CDR L2 de secuencia RANRLVD (SEQ ID NO:6), y una CDR L3 de secuencia LQYDEFPYT (SEQ ID NO:10); y una cadena pesada variable que comprende la CDR H1 de secuencia EYIIN (SEQ ID NO:14) una CDR H2 de secuencia WFYPGSGDIKYNEKFKD (SEQ ID NO:18), y una CDR H3 de secuencia NGRWDDDYFDY (SEQ ID NO:22), en donde el anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este se une específicamente a la ricina.
- 10 2. El anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este, de conformidad con la reivindicación 1, que comprende: la secuencia de la cadena ligera variable:

DIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINNYLRWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGS GQDYSLTISSLEYEDMGFYSCLQYDEFPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 27)

15 y la secuencia de la cadena pesada variable:

20

25

30

5.

EVQLQESGTGLVKPGASVKLSCKASGYTFTEYIINWVKQRSGQGLEWIGWFYPGSGDIKYNEKFKD KATLTADKSSSTVYMELSRLTSEDSAVYFCARNGRWDDDYFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID

NO:28).

3. El anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este, de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este se une específicamente a la proteína lectina B de la toxina de

- anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este se une específicamente a la proteína lectina B de la toxina de ricina.
- 4. El anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo es una IgG.
  - a 4, en donde el anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este, es humanizado.
    6. Una composición que comprende uno o más de un anticuerpo o fragmento de este de conformidad con cualquiera

El anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1

- de las reivindicaciones 1 a 5 y un diluyente, excipiente, o vehículo aceptable farmacéuticamente.
- 35 7. La composición de conformidad con la reivindicación 6, en donde la composición es una composición de vacuna.
  - 8. Una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 40 9. Un vector que comprende el ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 8.
  - 10. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 8 o el vector de conformidad con la reivindicación 9.
- 45 11. Una línea celular de hibridoma que expresa el anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 12. El anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la composición de conformidad con cualquier reivindicación 6 o 7, para usar en la prevención de los efectos deletéreos causados por la exposición a la ricina o en el tratamiento de la exposición a la ricina.
  - 13. El anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este o la composición para usar de conformidad con la reivindicación 12, en donde al menos uno de los anticuerpos o fragmentos de este es humanizado.
- 55 14. El anticuerpo, aislado o purificado, o fragmento de este de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la composición de conformidad con cualquier reivindicación 6 o 7, para usar con el propósito de conferir inmunidad contra la ricina.

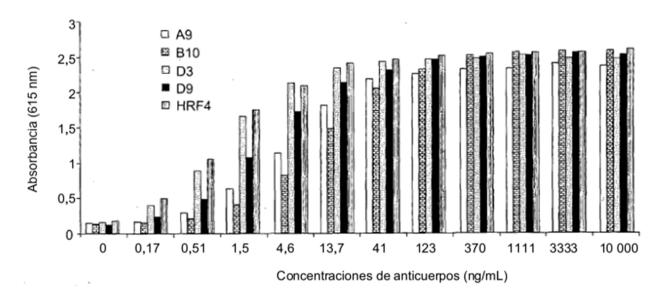


FIG. 1

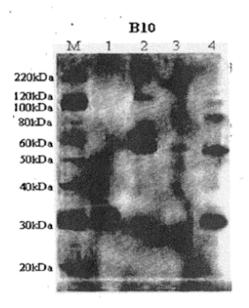


FIG. 2

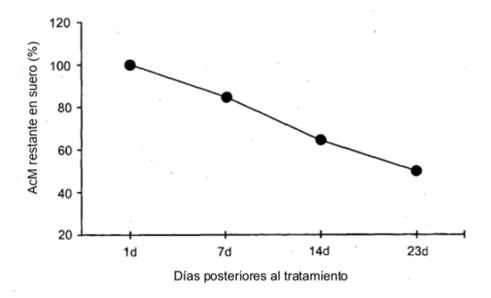
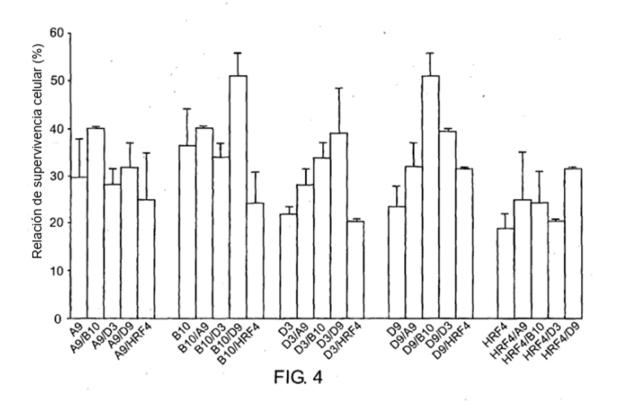


FIG. 3



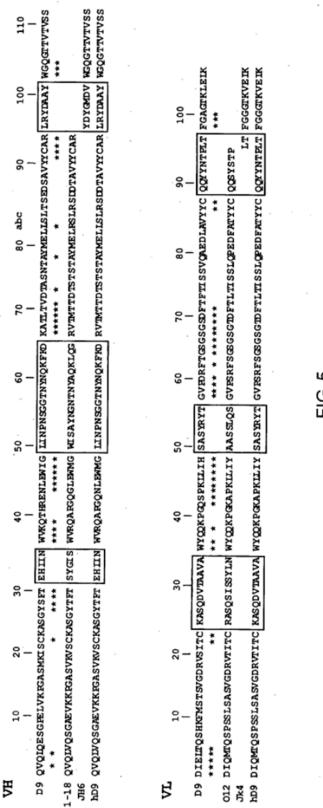


FIG. 5

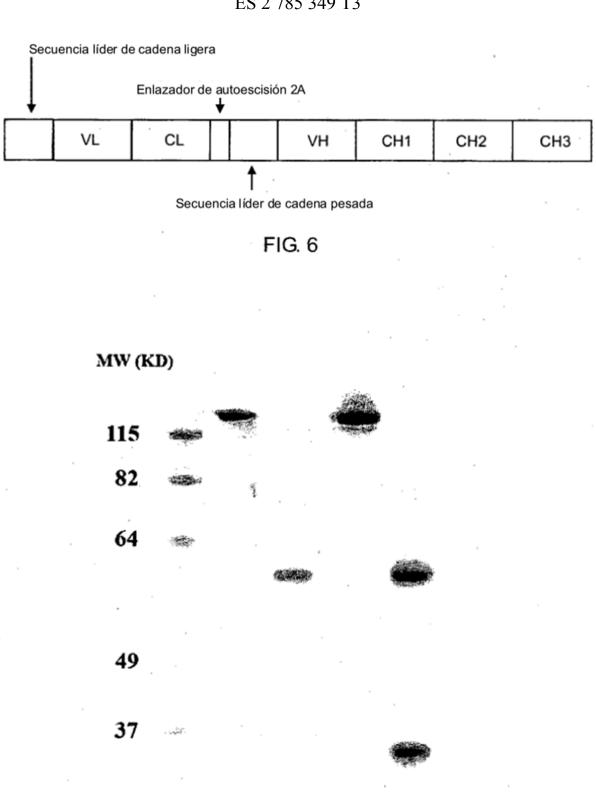


FIG. 7

1