

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 543**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2009 PCT/IB2009/006641**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010 WO10007533**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2009 E 09745098 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2352759**

54 Título: **Anticuerpos neutralizantes del citomegalovirus humano y uso de los mismos**

30 Prioridad:

16.07.2008 US 81334 P

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

14.02.2018

73 Titular/es:

**INSTITUTE FOR RESEARCH IN BIOMEDICINE
(100.0%)**

**Via Vincenzo Vela 6
6500 Bellinzona , CH**

72 Inventor/es:

**LANZAVECCHIA, ANTONIO y
MACAGNO, ANNALISA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 654 543 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos neutralizantes del citomegalovirus humano y uso de los mismos

5 Antecedentes

El citomegalovirus humano (hCMV) es un patógeno ampliamente distribuido que puede causar una patología grave en adultos inmunodeprimidos y tras la infección del feto y que se ha visto implicado en enfermedades crónicas como la aterosclerosis. El hCMV infecta múltiples tipos de células, incluidos fibroblastos, células endoteliales, epiteliales y hematopoyéticas [1]. *In vitro*, las cepas atenuadas propagadas de hCMV, que se están desarrollando como vacunas candidatas, han perdido el tropismo por las células endoteliales, al tiempo que conservan la capacidad de infectar fibroblastos [2]. Se cree que dos complejos de glicoproteínas víricas controlan el tropismo celular del hCMV. Parece ser necesario un complejo de glicoproteínas como gH, gL y gO para la infección de fibroblastos, mientras que un complejo de gH, gL y proteínas codificadas por los genes UL131-UL128 está implicado en la infección de células endoteliales, células epiteliales y células dendríticas [2-8].

Las globulinas hiperinmunitarias ya se comercializan para la profilaxis de la enfermedad por hCMV asociada con el trasplante y los datos recientes indican que tienen un efecto terapéutico en mujeres embarazadas [9]. Este enfoque terapéutico está limitado por la baja cantidad de anticuerpo neutralizante que puede transferirse y, por esta razón, sería altamente deseable la disponibilidad de anticuerpos humanos (tales como anticuerpos monoclonales humanos) con alta capacidad neutralizante. Aunque algunos anticuerpos contra los productos de los genes gH, gB y UL128 y UL130 han demostrado *in vitro* actividades neutralizantes [7, 10, 11] y un anticuerpo contra gH se ha evaluado en ensayos clínicos (que se interrumpieron debido a la falta de efectos terapéuticos), la potencia neutralizante de los anticuerpos aislados hasta el momento es modesta. La neutralización por estos anticuerpos se observó a concentraciones de anticuerpo que varían de 0,5 a 20 µg/ml. Además, los métodos actuales generalmente miden la potencia neutralizante de anticuerpos anti-hCMV usando fibroblastos como células diana. Sin embargo, también se sabe que el hCMV causa patología al infectar otros tipos de células tales como células endoteliales, epiteliales y leucocitos. Los anticuerpos conocidos contra UL128 y UL130 muestran una potencia muy baja para neutralizar la infección de células endoteliales [7] y no parece haber ningún anticuerpo monoclonal disponible que sea capaz de neutralizar la infección de células diana no fibroblásticas con alta potencia.

Por lo tanto, existe la necesidad de anticuerpos que neutralicen la infección por hCMV, particularmente la infección por hCMV de células diana no fibroblásticas, con alta potencia, así como la elucidación de las dianas a las que se unen dichos anticuerpos.

Lantto et al. (2003) Virology 305: 201-209 divulga que las características de unión determinan el potencial neutralizante de los fragmentos de anticuerpos específicos del dominio antigénico 2 de la glicoproteína B del hCMV.

McLean et al. (2005) J. Immunol. 174:4768-4778 divulga que el reconocimiento del hCMV por las inmunoglobulinas primarias humanas identifica una base innata para una respuesta inmunitaria adaptativa.

El documento WO 2007/146024 divulga composiciones inmunogénicas y vacunas profilácticas o terapéuticas para su uso en la protección y el tratamiento contra el hCMV.

45 Sumario de la invención

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de nuevos anticuerpos que neutralizan la infección por hCMV con alta potencia así como nuevos epítomos a los que se unen los anticuerpos de la invención. Por consiguiente, en un aspecto, la invención comprende un anticuerpo y fragmentos de unión al antígeno del mismo que tiene una alta potencia en la neutralización del hCMV.

La invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que es específico de una proteína gB de hCMV, en el que el anticuerpo o fragmento

- 55 (a) comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 336, 337 y 338, respectivamente, y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 339, 340 y 341, respectivamente;
- (b) comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 316, 317 y 318, respectivamente, y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se expone en las
- 60 SEQ ID NOs: 319, 320 y 321 respectivamente;
- (c) comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 278, 279 y 280 respectivamente, y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 281, 282 y 283 respectivamente;
- (d) comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs:
- 65 352, 279 y 280 respectivamente, y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 281, 282 y 283, respectivamente;

(e) comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 296, 297 y 298, respectivamente, y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 299, 300 y 301 respectivamente;

o

5 (f) comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 360, 279 y 280 respectivamente, y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 281, 282 y 361 respectivamente.

10 En una realización, el anticuerpo o fragmento de la invención comprende secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 348 y 349, respectivamente, SEQ ID NOs: 328 y 329, respectivamente, SEQ ID NOs: 290 y 291, respectivamente, SEQ ID NOs: 357 y 291, respectivamente, SEQ ID NOs: 308 y 309, respectivamente, o SEQ ID NOs: 367 y 368, respectivamente.

15 El anticuerpo o fragmento de la invención es preferiblemente un anticuerpo humano, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monocatenario, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv.

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o fragmento de la invención.

20 En una realización, la molécula de ácido nucleico de la invención comprende la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 342-347, 350, 351, 322-327, 330, 331, 284-289, 292, 293, 353-356, 358, 359, 287, 288, 302-307, 310, 311, 362-364, 287, 365, 366, 369 o 370, o una secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las SEQ ID NOs: 342-347, 350, 351, 322-327, 330, 331, 284-289, 292, 293, 353-356, 358, 359, 287, 288, 302-307, 310, 311, 362-364, 287, 365, 366, 369 o 370.

La invención proporciona además:

30 – un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención;
– una célula transformada con un vector de expresión de acuerdo con la invención; y
– una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de uno cualquiera de la invención, o el ácido nucleico de la invención, y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 La composición de la invención puede comprender, además, un segundo anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que neutraliza la infección por hCMV.

40 El segundo anticuerpo o fragmento es preferiblemente específico de UL128, un epítipo formado por una combinación de UL130 y UL131A, un epítipo formado por una combinación de UL128, UL130 y UL131A, un epítipo formado por una combinación de gH, gL, UL128 y UL130, un segundo epítipo de gB, gH, gL, gM, gN, gO o un epítipo formado por una combinación de gM y gN. El segundo anticuerpo es preferiblemente específico de un epítipo formado por una combinación de UL130 y UL131A.

En realizaciones particulares de la invención, el segundo anticuerpo se selecciona de:

45 (i) un anticuerpo que comprende secuencias de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NOs: 61 y 62, respectivamente;
(ii) un anticuerpo que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 49, 50 y 51 respectivamente y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 52, 53 y 54 respectivamente;
50 (iii) un anticuerpo que comprende secuencias de la cadena pesada y ligera de la SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente;
(iv) un anticuerpo que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 1, 2 y 3 respectivamente y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 4, 5 y 6 respectivamente;
55 (v) un anticuerpo que comprende secuencias de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NOs: 29 y 30, respectivamente;
(vi) un anticuerpo que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 17, 18 y 19 respectivamente y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 20, 21 y 22 respectivamente;
60 (vii) un anticuerpo que comprende secuencias de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NOs: 45 y 46 respectivamente;
(viii) un anticuerpo que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 33, 34 y 35 respectivamente y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 36, 37 y 38 respectivamente;
65

(ix) un anticuerpo que comprende secuencias de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NOs: 125 y 126, respectivamente; y

(x) un anticuerpo que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 variables de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 113, 114 y 115 respectivamente y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 116, 117 y 118 respectivamente.

La invención también proporciona:

- el uso del anticuerpo o fragmento de la invención, el ácido nucleico de la invención o la composición de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la infección por hCMV;
- el anticuerpo o fragmento de la invención, el ácido nucleico de la invención o la composición de la invención para su uso en el tratamiento de la infección por hCMV; y
- un método para producir el anticuerpo o fragmento de la invención, que comprende (i) cultivar la célula de la invención y (ii) aislar el anticuerpo o fragmento.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la tinción de células HEK293T transfectadas con los genes del hCMV UL128, UL130, UL131A, gH y gL, solos o en diferentes combinaciones, mediante anticuerpos monoclonales representativos (15D8, 2C12 y 8I21).

La Figura 2 muestra experimentos de competición cruzada en los que las células HEK293T transfectadas con el gen del hCMV gH (A) o gB (B) se incubaron primero con un anticuerpo competidor no marcado seguido de tinción con un anticuerpo anti-gH o anti-gB biotinilado.

La Figura 3 muestra la tinción de células HEK293T que expresan el gen UL128 VR1814 de tipo silvestre o un gen UL128 pan-mutado por el anticuerpo monoclonal humano 15D8 y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-UL128 no competitivo. El gen UL128 pan-mutado contiene sustituciones de la secuencia de VR1814 de tipo silvestre con variantes conocidas descritas en otros aislados clínicos y cepas de laboratorio del hCMV.

Descripción detallada de la invención

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de nuevos anticuerpos que neutralizan la infección por hCMV con alta potencia así como nuevos epítopos a los que se unen los anticuerpos de la invención. Tales anticuerpos son deseables, ya que solo se requieren bajas concentraciones para neutralizar una cantidad dada de virus. Esto facilita niveles más altos de protección a la vez que se administran cantidades más bajas de anticuerpos. Por consiguiente, en un aspecto, la invención comprende un anticuerpo neutralizante y fragmentos de unión al antígeno del mismo que tienen alta potencia para neutralizar la infección por hCMV. También se divulgan anticuerpos monoclonales humanos y los clones de linfocitos B inmortalizados que secretan tales anticuerpos.

Como se usa en la presente memoria, los términos “fragmento”, “fragmento de unión al antígeno” y “fragmento de anticuerpo” se usan indistintamente para referirse a cualquier fragmento de un anticuerpo que conserve la actividad de unión al antígeno de los anticuerpos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo monocatenario, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv.

Como se usa en la presente memoria, el término “alta potencia” se usa para referirse a un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que neutraliza la infección por hCMV con una CI₉₀ de menos de aproximadamente 2 µg/ml, (es decir, la concentración de anticuerpo requerida para la neutralización del 90 % de un aislado clínico de hCMV es de aproximadamente 2 µg/ml o menos, por ejemplo 1,9, 1,8, 1,75, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,25, 1,2, 1,15, 1,1 o 1,05 µg/ml o menos). El anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede tener una CI₉₀ de 1 µg/ml o menos (es decir 0,95, 0,9, 0,85, 0,8, 0,75, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05, 0,01 µg/ml o menos). El anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede tener una CI₉₀ de 0,16 µg/ml o menos (es decir 0,15, 0,125, 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,02, 0,015, 0,0125, 0,01, 0,0075, 0,005, 0,004, 0,003, 0,002 µg/ml o menos). El anticuerpo puede neutralizar la infección por hCMV a una concentración de 0,016 µg/ml o menos (es decir a 0,015, 0,013, 0,01, 0,008, 0,005, 0,003, 0,002, 0,001, 0,0005 µg/ml o menos). Esto significa que solo se requieren concentraciones muy bajas de anticuerpos para una neutralización del 90 % de un aislado clínico de hCMV *in vitro* en comparación con la concentración requerida de los anticuerpos conocidos, por ejemplo, MSL-109, 8F9 o 3E3, para la neutralización del mismo título de hCMV. La potencia se puede medir usando un ensayo de neutralización estándar como es conocido por un experto en la materia.

La divulgación proporciona un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo monoclonal humano, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a un epítipo de la proteína del hCMV UL128 y neutraliza la infección por hCMV con una CI₉₀ de menos de aproximadamente 2 µg/ml, por ejemplo 1,9, 1,8, 1,75, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,25, 1,2, 1,15, 1,1, 1,05, 1, 0,95, 0,9, 0,85, 0,8, 0,75, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,15, 0,125, 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,02, 0,015, 0,0125, 0,01, 0,0075, 0,005, 0,004, 0,003, 0,002, 0,001, 0,0005 µg/ml o menos.

La divulgación proporciona un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a un epítipo formado por las proteínas del hCMV gH, gL, UL128 y UL130, y neutraliza la infección por hCMV con una CI_{90} de menos de aproximadamente 2 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo 1,9, 1,8, 1,75, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,25, 1,2, 1,15, 1,1, 1,05, 1, 0,95, 0,9, 0,85, 0,8, 0,75, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,15, 0,125, 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,02, 0,015, 0,0125, 0,01, 0,0075, 0,005, 0,004, 0,003, 0,002, 0,001, 0,0005 $\mu\text{g/ml}$ o menos.

La divulgación proporciona un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a un epítipo formado por las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A, y neutraliza la infección por hCMV con una CI_{90} de menos de aproximadamente 2 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo 1,9, 1,8, 1,75, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,25, 1,2, 1,15, 1,1, 1,05, 1, 0,95, 0,9, 0,85, 0,8, 0,75, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,15, 0,125, 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,02, 0,015, 0,0125, 0,01, 0,0075, 0,005, 0,004, 0,003, 0,002, 0,001, 0,0005 $\mu\text{g/ml}$ o menos.

La divulgación proporciona un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a un epítipo formado por las proteínas del hCMV UL130 y UL131A, y neutraliza la infección por hCMV con una CI_{90} de menos de aproximadamente 2 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo 1,9, 1,8, 1,75, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,25, 1,2, 1,15, 1,1, 1,05, 1, 0,95, 0,9, 0,85, 0,8, 0,75, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,15, 0,125, 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,02, 0,015, 0,0125, 0,01, 0,0075, 0,005, 0,004, 0,003, 0,002, 0,001, 0,0005 $\mu\text{g/ml}$ o menos.

La divulgación proporciona un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a un epítipo de la proteína del hCMV gH y neutraliza la infección por hCMV con una CI_{90} de menos de aproximadamente 2 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo 1,9, 1,8, 1,75, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,25, 1,2, 1,15, 1,1, 1,05, 1, 0,95, 0,9, 0,85, 0,8, 0,75, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,15, 0,125, 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,02, 0,015, 0,0125, 0,01, 0,0075, 0,005, 0,004, 0,003, 0,002, 0,001, 0,0005 $\mu\text{g/ml}$ o menos.

La divulgación proporciona un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a un epítipo de la proteína del hCMV gB y neutraliza la infección por hCMV con una CI_{90} de menos de aproximadamente 2 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo 1,9, 1,8, 1,75, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,25, 1,2, 1,15, 1,1, 1,05, 1, 0,95, 0,9, 0,85, 0,8, 0,75, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,15, 0,125, 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,02, 0,015, 0,0125, 0,01, 0,0075, 0,005, 0,004, 0,003, 0,002, 0,001, 0,0005 $\mu\text{g/ml}$ o menos.

La divulgación proporciona un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a un epítipo formado por las proteínas del hCMV gM y gN y neutraliza la infección por hCMV con una CI_{90} de menos de aproximadamente 2 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo 1,9, 1,8, 1,75, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,25, 1,2, 1,15, 1,1, 1,05, 1, 0,95, 0,9, 0,85, 0,8, 0,75, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,15, 0,125, 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,02, 0,015, 0,0125, 0,01, 0,0075, 0,005, 0,004, 0,003, 0,002, 0,001, 0,0005 $\mu\text{g/ml}$ o menos.

Anticuerpos de la invención

Los anticuerpos de la invención se definen en las reivindicaciones. Los anticuerpos tienen una potencia particularmente alta para neutralizar el hCMV. Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo que neutraliza" es uno que previene, reduce, retrasa o interfiere con la capacidad de un patógeno, por ejemplo, hCMV, para iniciar y/o perpetuar una infección en un hospedador. Los anticuerpos de la invención y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos son capaces de neutralizar la infección por hCMV de varios tipos de células. En una realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención neutraliza la infección de células epiteliales, células retinianas, células endoteliales, células mieloides y células dendríticas. Los anticuerpos de la invención también pueden neutralizar la infección por hCMV de fibroblastos y células del estroma mesenquimales. Estos anticuerpos pueden usarse como agentes profilácticos o terapéuticos con una formulación apropiada, o como una herramienta de diagnóstico, como se describe en la presente memoria.

Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos o anticuerpos recombinantes. En una realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales, por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos. La invención también proporciona fragmentos de los anticuerpos de la invención que retienen la actividad de unión al antígeno de los anticuerpos y neutralizan la infección por hCMV. Aunque la especificación, incluidas las reivindicaciones, puede, en algunos lugares, referirse explícitamente a fragmento(s) de anticuerpo, variante(s) y/o derivado(s) de anticuerpos, se entiende que el término "anticuerpo" incluye todas las categorías de anticuerpos, concretamente, fragmento(s) de anticuerpo, variante(s) y derivado(s) de anticuerpos.

Los anticuerpos de la divulgación y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos se pueden unir a una o más proteínas del hCMV. Los anticuerpos se pueden unir a un epítipo formado por una sola proteína del hCMV o por una combinación de dos o más proteínas del hCMV. Ejemplos de proteínas del hCMV incluyen, pero no se limitan a, productos de genes víricos UL55 (glicoproteína B de la envuelta, "gB"), UL75 (glicoproteína H de la envuelta, "gH"), UL100 (glicoproteína M, "gM"), UL73 (glicoproteína N, "gN"), UL115 (glicoproteína L, "gL"), UL74 (glicoproteína O, "gO"), UL128 (glicoproteína UL128, "UL128"), UL130 (glicoproteína UL130, "UL130") o UL131A (glicoproteína UL131A, "UL131A"). Los anticuerpos se pueden unir a un epítipo formado por una sola proteína del hCMV. Los anticuerpos se pueden unir a un epítipo formado por la combinación de 2, 3 o más proteínas del hCMV.

La invención comprende un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de la proteína del hCMV gB. En un ejemplo de realización, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de la invención está presente en una composición con un segundo anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de la proteína del hCMV UL128, o a un epítipo formado por las proteínas del hCMV UL130 y UL131A, o a un epítipo formado por las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A, o a un epítipo formado por las proteínas del hCMV gH, gL, UL128 y UL130, o a un epítipo de la proteína del hCMV gH, o a un epítipo formado por las proteínas del hCMV gM y gN.

En una realización, el segundo anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo se une a un epítipo de UL128.

En otra realización, el segundo anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, se une a un epítipo formado por UL130 y UL131A. Como se usa en la presente memoria, un epítipo formado por UL130 y UL131A significa que el epítipo puede formarse por ambas proteínas UL130 y UL131A o puede estar formado por una de las dos proteínas, siendo necesaria la presencia de la otra proteína para la unión del anticuerpo. En otra realización más, el segundo anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, se une a un epítipo formado por UL128, UL130 y UL131A.

Como se usa en la presente memoria, un epítipo formado por UL128, UL130 y UL131A significa que el epítipo puede estar formado por las tres proteínas (UL128, UL130 y UL131A) o puede estar formado por una o más proteínas, siendo necesaria la presencia de la otra proteína(s) para la unión del anticuerpo. En otra realización más, el segundo anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, se une a un epítipo formado por gH, gL, UL128 y UL130. Como se usa en la presente memoria, un epítipo formado por gH, gL, UL128 y UL130 significa que el epítipo puede estar formado por las cuatro proteínas (gH, gL, UL128 y UL130) o puede estar formado por una o más de las cuatro proteínas, siendo necesaria la presencia de la otra(s) proteína(s) para la unión del anticuerpo.

En otra realización, el segundo anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, se une a un epítipo formado por gM y gN. Como se usa en la presente memoria, un epítipo formado por gM y gN significa que el epítipo puede estar formado tanto por gM como por gN o puede estar formado por una de las dos proteínas, siendo necesaria la presencia de la otra proteína para la unión del anticuerpo.

Se han determinado las secuencias de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de varios ejemplos de anticuerpos, comprendiendo cada una tres CDR en la cadena pesada y tres CDR en la cadena ligera. La posición de los aminoácidos de CDR se define de acuerdo con el sistema de numeración IMGT [12, 13, 14]. Las secuencias de las CDR, las cadenas pesadas, las cadenas ligeras, así como las secuencias de las moléculas de ácido nucleico que codifican las CDR, las cadenas pesadas, las cadenas ligeras se divulgan en la lista de secuencias. La Tabla 1 proporciona las SEQ ID NOs para las secuencias de las seis CDR de los ejemplos de anticuerpos. Las Tablas 2 y 3 proporcionan las SEQ ID NOs para las secuencias de las cadenas pesada y ligera, respectivamente, de los anticuerpos de ejemplo y la Tabla 4 proporciona las SEQ ID NOs para las secuencias de las moléculas de ácido nucleico que codifican las CDR, cadenas pesadas y cadenas ligeras de los anticuerpos.

Tabla 1

Anticuerpo	SEQ ID NOs. para CDRH1, CDRH2, CDRH3	SEQ ID NOs. para CDRL1, CDRL2, CDRL3
15D8	188, 189, 190	191, 192, 193
15D8 variante 1	188, 204, 205	191, 192, 193
15D8 variante 2	188, 189, 210	191, 192, 193
4N10	1, 2, 3	4, 5, 6
10F7	17, 18, 19	20, 21, 22
10P3	33, 34, 35	36, 37, 38
4I22	49, 50, 51	52, 53, 54
8L13	113, 114, 115	116, 117, 118
2C12	65, 66, 67	68, 69, 70
8C15	81, 82, 83	84, 85, 86
9I6	97, 98, 99	100, 101, 102
7B13	129, 130, 131	132, 133, 134
8J16	145, 146, 147	148, 149, 150
8I21	174, 175, 176	177, 149, 178
7I13	113, 161, 162	163, 149, 164
7H3	316, 317, 318	319, 320, 321
7H3 variante 1	316, 317, 332	319, 320, 321
6B4	336, 337, 338	339, 340, 341

Anticuerpo	SEQ ID NOs. para CDRH1, CDRH2, CDRH3	SEQ ID NOs. para CDRL1, CDRL2, CDRL3
5F1	278, 279, 280	281, 282, 283
10C6	352, 279, 280	281, 282, 283
4H9	296, 297, 298	299, 300, 301
4H9 variante 1	296, 312, 298	299, 300, 301
11B12	232, 233, 234	235, 149, 236
13H11	216, 217, 218	219, 220, 221
3G16	246, 247, 248	249, 250, 251
2B11	360, 279, 280	281, 282, 361
6L3	262, 263, 264	265, 266, 267

Tabla 2

Anticuerpo	SEQ ID NOs para cadenas pesadas
15D8	200
15D8 variante 1	208
15D8 variante 2	212
4N10	13
10F7	29
10P3	45
4I22	61
8L13	125
2C12	77
8C15	93
9I6	109
7B13	141
8J16	157
8I21	184
7I13	170
7H3	328
7H3 variante 1	334
6B4	348
5F1	290
5F1 variante 1	294
10C6	357
4H9	308
4H9 variante 1	314
11B12	242
13H11	228
3G16	258
2B11	367
6L3	274

Tabla 3

Anticuerpo	SEQ ID NO para cadenas ligeras
15D8	201
15D8 variante 1	201
15D8 variante 2	213
4N10	14
10F7	30
10P3	46
4I22	62
8L13	126
2C12	78
8C15	94
9I6	110
7B13	142
8J16	158
8I21	185
7I13	171
7H3	329
7H3 variante 1	329
6B4	349
5F1	291
5F1 variante 1	291
10C6	291
4H9	309
4H9 variante 1	309
11B12	243
13H11	229
3G16	259
2B11	368
6L3	275

Tabla 4

Anticuerpo	SEQ ID NO para ácidos nucleicos que codifican CDR, cadenas pesadas, cadenas ligeras y variantes (CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3 y <u>variantes</u> ; cadenas pesadas y <u>variantes</u> y cadenas ligeras y <u>variantes</u>)
15D8	194-199 y <u>206, 207, 211</u> ; 202 y <u>209, 214</u> ; 203 y <u>215</u>
4N10	7-12; 15; 16
10F7	23-28; 31; 32
10P3	39-44; 47; 48
4I22	55-60; 63; 64
8L13	119-124; 127; 128
2C12	71-76; 79; 80
8C15	87-92; 95; 96
9I6	103-108, 111, 112
7B13	135-140; 143; 144
8J16	151-156; 159; 160

Anticuerpo	SEQ ID NO para ácidos nucleicos que codifican CDR, cadenas pesadas, cadenas ligeras y variantes (CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3 y <u>variantes</u> ; cadenas pesadas y <u>variantes</u> y cadenas ligeras y <u>variantes</u>)
8I21	179-182,155,183; 186; 187
7I13	165, 166, 167, 168, 155, 169; 172; 173
7H3	322-327 y <u>333</u> ; 330 y <u>335</u> ; 331
6B4	342-347; 350; 351
5F1	284-289; 292 y <u>295</u> ; 293
10C6	353-355, 287, 288, 356; 358; 359
4H9	302-307 y <u>313</u> ; 310 y <u>315</u> ; 311
11B12	237-240, 155, 241; 244; 245
13H11	222-227; 230; 231
3G16	252-257; 260; 261
2B11	362-364; 287,365,366; 369; 370
6L3	268-273; 276; 277

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la divulgación pueden comprender una o más CDR de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos de ejemplo de la invención. En un ejemplo de realización, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la divulgación pueden comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 188-193, 204-205, 210, 1-6, 17-22, 33-38, 49-54, 113-118, 65-70, 81-86, 97-102, 129-134, 145-150, 174-178, y 161-164.

Los anticuerpos de la divulgación pueden comprender una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de una o más de las SEQ ID NOs: 188-190, 204, 205, 210, 1-3, 17-19,33-35,49-51, 113-115, 65-67, 81-83, 97-99, 129-131, 145-147, 174-176, 161 o 162. Por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación pueden comprender una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 188 para CDRH1, SEQ ID NO: 189 para CDRH2, SEQ ID NO: 190 para CDRH3; SEQ ID NO: 188 para CDRH1, SEQ ID NO: 204 para CDRH2, SEQ ID NO: 205 para CDRH3; SEQ ID NO: 188 para CDRH1, SEQ ID NO: 189 para CDRH2, SEQ ID NO: 210 para CDRH3; SEQ ID NO: 1 para CDRH1, SEQ ID NO: 2 para CDRH2, SEQ ID NO: 3 para CDRH3; SEQ ID NO: 17 para CDRH1, SEQ ID NO: 18 para CDRH2, SEQ ID NO: 19 para CDRH3; SEQ ID NO: 33 para CDRH1, SEQ ID NO: 34 para CDRH2, SEQ ID NO: 35 para CDRH3; SEQ ID NO 49 para CDRH1, SEQ ID NO: 50 para CDRH2, SEQ ID NO: 51 para CDRH3; SEQ ID NO: 113 para CDRH1, SEQ ID NO: 114 para CDRH2, SEQ ID NO: 115 para CDRH3; SEQ ID NO: 65 para CDRH1, SEQ ID NO: 66 para CDRH2, SEQ ID NO: 67 para CDRH3; SEQ ID NO: 81 para CDRH1, SEQ ID NO 82 para CDRH2, SEQ ID NO: 83 para CDRH3; SEQ ID NO: 97 para CDRH1, SEQ ID NO: 98 para CDRH2, SEQ ID NO: 99 para CDRH3; SEQ ID NO: 129 para CDRH1, SEQ ID NO: 130 para CDRH2, SEQ ID NO: 131 para CDRH3; SEQ ID NO: 145 para CDRH1, SEQ ID NO: 146 para CDRH2, SEQ ID NO: 147 para CDRH3; SEQ ID NO: 174 para CDRH1, SEQ ID NO: 175 para CDRH2, SEQ ID NO: 176 para CDRH3; y SEQ ID NO: 113 para CDRH1, SEQ ID NO: 161 para CDRH2, SEQ ID NO: 162 para CDRH3.

Los anticuerpos de la divulgación pueden comprender una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de una o más de las SEQ ID NOs: 191-193, 4-6, 20-22, 36-38, 52-54, 116-118, 68-70, 84-86, 100-102, 132-134, 148-150, 177, 178, 163, o 164. Por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación pueden comprender una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 191 para CDRL1, SEQ ID NO: 192 para CDRL2; SEQ ID NO: 193 para CDRL3; SEQ ID NO: 4 para CDRL1, SEQ ID NO: 5 para CDRL2 y SEQ ID NO: 6 para CDRL3; SEQ ID NO: 20 para CDRL1, SEQ ID NO: 21 para CDRL2, SEQ ID NO: 22 para CDRL3; SEQ ID NO: 36 para CDRL1, SEQ ID NO: 37 para CDRL2, SEQ ID NO: 38 para CDRL3; SEQ ID NO: 52 para CDRL1, SEQ ID NO: 53 para CDRL2, SEQ ID NO: 54 para CDRL3; SEQ ID NO: 116 para CDRL1, SEQ ID NO: 117 para CDRL2, SEQ ID NO: 118 para CDRL3; SEQ ID NO: 68 para CDRL1, SEQ ID NO: 69 para CDRL2, SEQ ID NO: 70 para CDRL3; SEQ ID NO 84 para CDRL1, SEQ ID NO: 85 para CDRL2, SEQ ID NO: 86 para CDRL3; SEQ ID NO: 100 para CDRL1, SEQ ID NO: 101 para CDRL2, SEQ ID NO: 102 para CDRL3; SEQ ID NO: 132 para CDRL1, SEQ ID NO: 133 para CDRL2, SEQ ID NO: 134 para CDRL3; SEQ ID NO: 148 para CDRL1, SEQ ID NO: 149 para CDRL2, SEQ ID NO: 150 para CDRL3; SEQ ID NO: 177 para CDRL1, SEQ ID NO: 149 para CDRL2, SEQ ID NO: 178 para CDRL3; SEQ ID NO: 163 para CDRL1, SEQ ID NO: 149 para CDRL2 y SEQ ID NO: 164 para CDRL3.

Los anticuerpos de la divulgación pueden comprender una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica a la de las SEQ ID NOs: 200, 208, 212, 13, 29, 45, 61, 125, 77, 93, 109, 141, 157, 184 o 170 y neutralizar la infección por hCMV. En una realización, el anticuerpo se une a un epítipo de la proteína del hCMV UL128 y comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 200, 208 o 212, y neutraliza la infección por hCMV. Un

anticuerpo de acuerdo con la divulgación puede comprender una cadena pesada que tiene la secuencia indicada en las SEQ ID NOs: 200, 208 o 212, y neutraliza la infección por hCMV.

El anticuerpo de la divulgación se puede unir a un epítipo formado por las proteínas del hCMV UL130 y UL131A y comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 13, 29, 45, 61 o 125 y neutraliza la infección por hCMV. Un anticuerpo de acuerdo con la divulgación puede comprender una cadena pesada que tiene la secuencia indicada en las SEQ ID NOs: 13, 29, 45, 61 o 125 y neutralizar la infección por hCMV.

El anticuerpo de la divulgación se puede unir a un epítipo formado por las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A y comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 77, 93, 109, 141, 157 o 170 y neutralizar la infección por hCMV. El anticuerpo de acuerdo con la divulgación puede comprender una cadena pesada que tiene la secuencia indicada en las SEQ ID NOs: 77, 93, 109, 141, 157 o 170 y neutralizar la infección por hCMV.

El anticuerpo de la divulgación se puede unir a un epítipo formado por las proteínas del hCMV gH, gL, UL128 y UL130 y comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 184 y neutralizar la infección por hCMV. Un anticuerpo de acuerdo con la divulgación puede comprender una cadena pesada que tiene la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 184, y neutralizar la infección por hCMV.

Los anticuerpos de la divulgación pueden comprender una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica a la de las SEQ ID NOs: 201, 213, 14, 30, 46, 62, 126, 78, 94, 110, 142, 158, 185 o 171 y neutralizar la infección por hCMV.

El anticuerpo de la divulgación puede unirse a un epítipo de la proteína hCMV UL128 y comprender una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 201 o 213, y neutralizan la infección por hCMV. Un anticuerpo de acuerdo con la divulgación puede comprender una cadena ligera que tiene la secuencia indicada en las SEQ ID NOs: 201 o 213, y neutralizar la infección por hCMV.

El anticuerpo de la divulgación puede unirse a un epítipo formado por las proteínas del hCMV UL130 y UL131A y comprender una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 14, 30, 46, 62 o 126, y neutralizar la infección por hCMV. Un anticuerpo de acuerdo con la divulgación puede comprender una cadena ligera que tiene la secuencia indicada en las SEQ ID NOs: 14, 30, 46, 62 o 126, y neutralizar la infección por hCMV.

El anticuerpo de la divulgación se puede unir a un epítipo formado por las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A y comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 78, 94, 110, 142, 158 o 171, y neutralizar la infección por hCMV. Un anticuerpo de acuerdo con la divulgación puede comprender una cadena ligera que tiene la secuencia indicada en las SEQ ID NOs: 78, 94, 110, 142, 158 o 171, y neutralizar la infección por hCMV.

El anticuerpo de la divulgación se puede unir a un epítipo formado por las proteínas del hCMV gH, gL, UL128 y UL130 y comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 185, y neutralizar la infección por hCMV. Un anticuerpo de acuerdo con la divulgación puede comprender una cadena ligera que tiene la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 185, y neutralizar la infección por hCMV.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la divulgación pueden comprender una o más CDR de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos de ejemplo de la invención. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención comprenden las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 316-321, SEQ ID NOs: 336-341, SEQ ID NOs: 352 y 279-283, SEQ ID NOs: 296-301, SEQ ID NOs: 360, 279-282 y 361 y SEQ ID NOs: 278-283, y neutralizan la infección por hCMV.

Los anticuerpos de la invención comprenden una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 316 para CDRH1, SEQ ID NO: 317 para CDRH2, SEQ ID NO: 318 para CDRH3; SEQ ID NO: 336 para CDRH1, SEQ ID NO: 337 para CDRH2, SEQ ID NO: 338 para CDRH3; SEQ ID NO: 278 para CDRH1, SEQ ID NO: 279 para CDRH2, SEQ ID NO: 280 para CDRH3; SEQ ID NO: 352 para CDRH1, SEQ ID NO: 279 para CDRH2, SEQ ID NO: 280 para CDRH3;

SEQ ID NO: 296 para CDRH1, SEQ ID NO: 297 para CDRH2, SEQ ID NO: 298 para CDRH3; y SEQ ID NO: 360 para CDRH1, SEQ ID NO: 279 para CDRH2, SEQ ID NO: 280 para CDRH3.

5 Los anticuerpos de la invención comprenden una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 319 para CDRL1, SEQ ID NO: 320 para CDRL2, SEQ ID NO: 321 para CDRL3; SEQ ID NO: 339 para CDRL1, SEQ ID NO: 340 para CDRL2, SEQ ID NO: 341 para CDRL3; SEQ ID NO: 281 para CDRL1, SEQ ID NO: 282 para CDRL2, SEQ ID NO: 283 para CDRL3; SEQ ID NO: 299 para CDRL1, SEQ ID NO: 300 para CDRL2, SEQ ID NO: 301 para CDRL3; y SEQ ID NO: 281 para CDRL1, SEQ ID NO: 282 para CDRL2, SEQ ID NO: 361 para CDRL3.

10 Los anticuerpos de la divulgación pueden comprender una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica a las de las SEQ ID NOs: 328, 334, 348, 290, 294, 357, 308, 314, 242, 228, 258, 367 o 274 y neutralizar la infección por hCMV.

15 El anticuerpo se puede unir a un epítipo de la proteína hCMV gB y comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 328, 334, 348, 290, 294, 308, 357, 314 o 367, y neutralizar la infección por hCMV. En una realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO: 328, 348, 290, 308, 357 o 367 y neutraliza la infección por hCMV.

20 El anticuerpo de la divulgación puede unirse a un epítipo de la proteína del hCMV gH y comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 242, 228 o 258, y neutralizar la infección por hCMV. Un anticuerpo de acuerdo con la divulgación puede comprender una cadena pesada que tiene la secuencia indicada en las SEQ ID NOs: 242, 228 o 258, y neutralizar la infección por hCMV.

30 El anticuerpo de la divulgación se puede unir a un epítipo formado por las proteínas del hCMV gM y gN y comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 274, y neutralizar la infección por hCMV. Un anticuerpo de acuerdo con la divulgación puede comprender una cadena pesada que tiene la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 274, y neutralizar la infección por hCMV.

35 Los anticuerpos de la divulgación pueden comprender una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica a la de las SEQ ID NOs: 329, 349, 291, 309, 243, 229, 259, 368 o 275, y neutralizar la infección por el hCMV.

40 El anticuerpo puede unirse a un epítipo de la proteína del hCMV gB y comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 329, 349, 291, 309 o 368 y neutralizar la infección por hCMV. En una realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una cadena ligera que tiene la secuencia indicada en las SEQ ID NOs: 329, 349, 291, 309 o 368, y neutralizar la infección por hCMV.

45 El anticuerpo de la divulgación puede unirse a un epítipo de la proteína del hCMV gH y comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 243, 229 o 259, y neutralizar la infección por hCMV. Un anticuerpo de acuerdo con la divulgación puede comprender una cadena ligera que tiene la secuencia indicada en las SEQ ID NOs: 243, 229 o 259, y neutralizar la infección por hCMV.

50 El anticuerpo de la divulgación se puede unir a un epítipo formado por las proteínas del hCMV gM y gN y comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 275, y neutralizar la infección por hCMV. Un anticuerpo de acuerdo con la divulgación puede comprender una cadena ligera que tiene la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 275, y neutralizar la infección por hCMV.

60 El anticuerpo de la invención no es MSL-109, 8F9, 3E3 o R551A. El anticuerpo de la invención no es 1F11, 2F4, 5A2 o 6G4, divulgado en las solicitudes de los Estados Unidos números 11/969.104 y 12/174.568.

Ejemplos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, 15D8, 4N10, 10F7, 10P3, 4I22, 8L13, 2C12, 8C15, 9I6, 7B13, 8J16, 8I21, 7I13, 7H3, 6B4, 5F1, 10C6, 4H9, 2B11, 11B12, 13H11, 3G16 y 6L3.

65 Las variantes de 15D8 que neutralizan la infección por hCMV consisten en una variante de la cadena pesada que

tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 208 ("15D8 variante 1") y la SEQ ID NO: 212 ("15D8 variante 2") y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 213 (15D8 variante 2). Las secuencias de ácido nucleico que codifican las variantes de la cadena pesada se indican en la SEQ ID NO: 209 (15D8 variante 1) y en la SEQ ID NO: 214 (15D8 variante 2). El ácido nucleico que codifica la cadena ligera variante se indica en la SEQ ID NO: 215 (15D8 variante 2). Por lo tanto, se divulgan anticuerpos que comprenden las cadenas pesadas variantes de 15D8 (SEQ ID NOs: 208, 212) y la cadena ligera variante (SEQ ID NO: 213) que neutralizan la infección por hCMV.

Como se usa en la presente memoria, el término "15D8" se usa para referirse a cualquiera y/o todas las variantes de 15D8 que neutralizan la infección por hCMV, por ejemplo, aquellas con cadenas pesadas correspondientes a las SEQ ID NOs: 208 y 212 y cadenas ligeras correspondientes a la SEQ ID NO: 213.

Una variante de 7H3 que neutraliza la infección por hCMV consiste en una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 334 ("7H3 variante 1"). La secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada variante se indica en la SEQ ID NO: 335. Por lo tanto, se divulgan los anticuerpos que comprenden la cadena pesada variante de 7H3 (SEQ ID NO: 334) que neutralizan la infección por hCMV.

Como se usa en la presente memoria, el término "7H3" se usa para referirse a cualquiera y/o todas las variantes de 7H3 que neutralizan la infección por hCMV, por ejemplo, aquellas con cadenas pesadas correspondientes a la SEQ ID NO: 334.

Una variante de 5F1 que neutraliza la infección por hCMV consiste en una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 294 ("5F1 variante 1"). La secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada variante se indica en la SEQ ID NO: 295. Por lo tanto, se divulgan los anticuerpos que comprenden la cadena pesada variante de 5F1 (SEQ ID NO: 294) que neutralizan la infección por hCMV.

Como se usa en la presente memoria, el término "5F1" se usa para referirse a cualquiera y/o todas las variantes de 5F1 que neutralizan la infección por hCMV, por ejemplo, aquellas con cadenas pesadas correspondientes a la SEQ ID NO: 294.

Una variante de 4H9 que neutraliza la infección por hCMV consiste en una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 314 ("4H9 variante 1"). La secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada variante se indica en la SEQ ID NO: 315. Por lo tanto, se divulgan los anticuerpos que comprenden la cadena pesada variante de 4H9 (SEQ ID NO: 314), que neutralizan la infección por hCMV.

Como se usa en la presente divulgación, el término "4H9" se usa para referirse a cualquiera y/o a todas las variantes de 4H9 que neutralizan la infección por hCMV, por ejemplo, aquellas con cadenas pesadas correspondientes a la SEQ ID NO: 314.

Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 15D8 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano. Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 15D8 variante 1 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano. Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 15D8 variante 2 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano. Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 8I21 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano.

Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 4N10 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano. Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 10F7 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano. Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 10P3 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano. Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 4I22 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano. Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 8L13 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano.

Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 2C12 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano. Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 8C15 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano. Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 9I6 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano. Un

anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 7B13 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano. Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 8J16 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano. Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 7I13 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano.

En otra realización más, un anticuerpo de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende todas las CDR del anticuerpo 7H3 como se indica en la Tabla 1, y neutraliza la infección por hCMV en un hospedador humano. Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 7H3 variante 1 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano. En otra realización, un anticuerpo de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende todas las CDR del anticuerpo 6B4 como se indica en la Tabla 1, y neutraliza la infección por hCMV en un hospedador humano. En otra realización, un anticuerpo de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende todas las CDR del anticuerpo 5F1 como se indica en la Tabla 1, y neutraliza la infección por hCMV en un hospedador humano. En otra realización, un anticuerpo de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende todas las CDR del anticuerpo 10C6 como se indica en la Tabla 1, y neutraliza la infección por hCMV en un hospedador humano. En otra realización, un anticuerpo de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende todas las CDR del anticuerpo 4H9 como se indica en la Tabla 1, y neutraliza la infección por hCMV en un hospedador humano. Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 4H9 variante 1 como se indica en la Tabla 1, y neutraliza la infección por hCMV en un hospedador humano. En otra realización, un anticuerpo de la invención, o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende todas las CDR del anticuerpo 2B11 como se indica en la Tabla 1, y neutraliza la infección por hCMV en un hospedador humano.

Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 11B12 como se indica en la Tabla 1, y neutraliza la infección por hCMV en un hospedador humano. En otra realización, un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 13H11 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano. Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 3G16 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano. Un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender todas las CDR del anticuerpo 6L3 como se indica en la Tabla 1, y neutralizar la infección por hCMV en un hospedador humano.

La divulgación comprende además un anticuerpo, o fragmento del mismo, que se une a un epítipo capaz de unirse a un anticuerpo de la invención, o un anticuerpo que compite con un anticuerpo de la invención.

Los anticuerpos de la divulgación también incluyen moléculas de anticuerpos híbridos que comprenden una o más CDR de un anticuerpo de la invención y una o más CDR de otro anticuerpo para el mismo epítipo. En una realización, dichos anticuerpos híbridos comprenden tres CDR de un anticuerpo de la invención y tres CDR de otro anticuerpo para el mismo epítipo. Ejemplos de anticuerpos híbridos comprenden i) las tres CDR de cadena ligera de un anticuerpo de la invención y las tres CDR de la cadena pesada de otro anticuerpo para el mismo epítipo, o ii) las tres CDR de la cadena pesada de un anticuerpo de la invención y las tres CDR de cadena ligera de otro anticuerpo para el mismo epítipo.

En otro aspecto, la invención también incluye secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas ligeras y pesadas y las CDR de los anticuerpos de la presente invención. En una realización, las secuencias de ácido nucleico incluyen secuencias de ácido nucleico que tienen al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad con el ácido nucleico que codifica una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención. Una secuencia de ácido nucleico de la divulgación puede tener la secuencia de un ácido nucleico que codifica una CDR de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención comprende las secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID NOs: 284-289, 292, 293, 302-307, 310, 311, 322-327, 330, 331, 333, 335, 342-347, 350, 351, 353-356, 358, 359, 362-364, 365, 366, 369 y 370. Se divulga una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a las secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID NOs mencionadas anteriormente.

Debido a la redundancia del código genético, existirán variantes de estas secuencias que codifican las mismas secuencias de aminoácidos. Estas variantes están incluidas dentro del alcance de la invención.

También se divulgan anticuerpos variantes que neutralizan la infección por hCMV. Por lo tanto, también se divulgan variantes de las secuencias enumeradas en la solicitud. Tales variantes incluyen variantes naturales generadas por mutaciones somáticas *in vivo* durante la respuesta inmunitaria o *in vitro* tras el cultivo de clones de linfocitos B inmortalizados. En otra alternativa, pueden surgir variantes debido a la degeneración del código genético, como se

mencionó anteriormente o pueden producirse debido a errores en la transcripción o traducción.

Se pueden obtener variantes adicionales de las secuencias de anticuerpo que tienen una afinidad y/o potencia mejoradas usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos se pueden usar para obtener anticuerpos con afinidad mejorada adicional. En otra alternativa, se puede usar la optimización de codones de la secuencia de nucleótidos para mejorar la eficacia de la traducción en los sistemas de expresión para la producción del anticuerpo. Además, también se divulgan polinucleótidos que comprenden una secuencia optimizada para la especificidad del anticuerpo o actividad neutralizante mediante la aplicación de un método de evolución dirigida a cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de la invención.

Las secuencias de anticuerpos variantes que neutralizan la infección por hCMV pueden compartir el 70 % o más (es decir 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias enumeradas en la solicitud. Dicha identidad de secuencia se puede calcular con respecto a la longitud completa de la secuencia de referencia (es decir la secuencia enumerada en la solicitud). El porcentaje de identidad, como se menciona en la presente memoria, se puede determinar utilizando la versión 2.1.3 de BLAST usando los parámetros predeterminados especificados por el NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) [matriz Blosum 62; penalización por apertura de hueco = 11 y penalización por extensión de hueco = 1].

Además se incluyen dentro del alcance de la invención los vectores de expresión, que comprenden una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Las células transformadas con tales vectores también se incluyen dentro del alcance de la invención. Los ejemplos de tales células incluyen, pero no se limitan a, células eucariotas, por ej., células de levadura, células animales o células de plantas. En una realización, las células son de mamífero, por ej., células humanas, CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, mieloma o hibridoma.

La divulgación también se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen a un epítipo capaz de unirse a los anticuerpos de la invención, que incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 15D8, 4N10, 10F7, 10P3, 4I22, 8L13, 2C12, 8C15, 9I6, 7B13, 8J16, 8I21, 7I13, 7H3, 6B4, 5F1, 10C6, 4H9, 11B12, 13H11, 3G16, 2B11 y 6L3.

Los anticuerpos monoclonales y recombinantes son particularmente útiles en la identificación y purificación de los polipéptidos individuales u otros antígenos contra los que están dirigidos. Los anticuerpos tienen una utilidad adicional ya que pueden emplearse como reactivos en inmunoensayos, radioinmunoensayos (RIA) o ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). En estas aplicaciones, los anticuerpos pueden marcarse con un reactivo detectable analíticamente tal como un radioisótopo, una molécula fluorescente o una enzima. Los anticuerpos también pueden usarse para la identificación y caracterización molecular (mapeo de epítopos) de antígenos.

Los anticuerpos se pueden acoplar a un fármaco para su administración a un sitio de tratamiento o acoplarse a un marcador detectable para facilitar la formación de imágenes de un sitio que comprende células de interés, tales como células infectadas con el hCMV. Los métodos para acoplar anticuerpos a fármacos y marcadores detectables son bien conocidos en la técnica, como lo son los métodos para la formación de imágenes usando marcadores detectables. Los anticuerpos marcados se pueden emplear en una amplia variedad de ensayos, que emplean una amplia variedad de marcadores. La detección de la formación de un complejo anticuerpo-antígeno entre un anticuerpo y un epítipo de interés (un epítipo de hCMV) puede facilitarse uniendo una sustancia detectable al anticuerpo. Los medios de detección adecuados incluyen el uso de marcadores tales como radionucleidos, enzimas, coenzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, cromógenos, sustratos o cofactores de enzimas, inhibidores de enzimas, complejos de grupos prostéticos, radicales libres, partículas, colorantes y similares. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente es luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , o ^3H . Tales reactivos marcados pueden usarse en una variedad de ensayos bien conocidos, tales como radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo, ELISA, inmunoensayos fluorescentes y similares. Véase por ejemplo, referencias 15-18.

Un anticuerpo puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina, un agente terapéutico o un ion de metal radiactivo o radioisótopo. Los ejemplos de radioisótopos incluyen, pero no están limitados a, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111 y similares. Dichos conjugados de anticuerpos pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada; la fracción de fármaco no debe interpretarse como limitada a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o la toxina de la difteria.

Las técnicas para conjugar tal fracción terapéutica a anticuerpos son bien conocidas. Ver, por ejemplo, Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies and

Cancer Therapy, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), páginas 243-256; ed. Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery, ed. Robinson et al. (2ª ed, Marcel Dekker, Inc.), páginas 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, ed. Pinchera et al. páginas. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italia, 1985));

5 "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy ed. Baldwin et al. (Academic Press, Nueva York, 1985), páginas 303-316; y Thorpe et al. (1982) Immunol. Rev. 62:119-158.

- 10 En otra alternativa, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como se describe en la referencia 19. Además, se pueden usar conectores entre los marcadores y los anticuerpos de la invención [20]. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se pueden marcar directamente con yodo radiactivo, indio, itrio u otra partícula radiactiva conocida en la técnica [21]. El tratamiento puede consistir en una combinación de tratamiento con anticuerpos conjugados y no conjugados
- 15 administrados simultáneamente o posteriormente [22, 23].

Los anticuerpos también pueden unirse a un soporte sólido.

- Adicionalmente, los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos funcionales de los mismos, pueden modificarse químicamente mediante conjugación covalente con un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida circulante, por ejemplo. Los ejemplos de polímeros y los métodos para unirlos a los péptidos se muestran en las referencias 24-27. En algunas realizaciones, los polímeros se pueden seleccionar de polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a temperatura ambiente y tiene la fórmula general: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ donde R puede ser hidrógeno, o un grupo protector tal como un grupo alquilo o alcohol. En una realización, el grupo protector
- 20 puede tener entre 1 y 8 átomos de carbono. En una realización adicional, el grupo protector es metilo. El símbolo n es un número entero positivo. En una realización, n está entre 1 y 1.000. En otra realización, n está entre 2 y 500. En una realización, el PEG tiene un peso molecular medio entre 1.000 y 40.000. En una realización adicional, el PEG tiene un peso molecular entre 2.000 y 20.000. En otra realización más, el PEG tiene un peso molecular de entre 3.000 y 12.000. En una realización, el PEG tiene al menos un grupo hidroxilo. En otra realización, el PEG tiene un
- 25 grupo hidroxilo terminal. En aún otra realización, es el grupo hidroxilo terminal el que se activa para que reaccione con un grupo amino libre sobre el inhibidor. Sin embargo, se entenderá que el tipo y la cantidad de los grupos reactivos se pueden variar para conseguir un PEG/anticuerpo conjugado covalentemente.

- Los polioles polioxietilados solubles en agua también son útiles. Incluyen sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG) y similares. En una realización, se usa POG. Sin estar sujetos a ninguna teoría, debido a que la cadena principal de glicerol del glicerol polioxietilado es la misma cadena principal que se encuentra naturalmente en, por ejemplo, animales y seres humanos en mono-, di-, triglicéridos, esta ramificación no necesariamente se consideraría un agente extraño en el cuerpo. En algunas realizaciones, el POG tiene un peso molecular en el mismo intervalo que PEG. La estructura de POG se muestra en la referencia 28, y en la referencia
- 35 24 se encuentra una descripción de los conjugados POG/IL-2.

- Otro sistema de administración de fármacos que se puede usar para aumentar la semivida circulatoria es el liposoma. Los métodos para preparar sistemas de administración de liposomas se describen en las referencias 29, 30 y 31. Otros sistemas de administración de fármacos son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo,
- 40 las referencias 32 y 33.

- Los anticuerpos de la invención se pueden proporcionar en forma purificada. Generalmente, el anticuerpo estará presente en una composición que está sustancialmente exenta de otros polipéptidos, por ejemplo, donde menos del 90 % (en peso), habitualmente menos del 60 % y más habitualmente menos del 50 % de la composición se compone de otros polipéptidos.
- 50

- Los anticuerpos pueden ser inmunogénicos en hospedadores no humanos (o heterólogos) por ejemplo en ratones. En particular, los anticuerpos pueden tener un idiotipo que es inmunogénico en hospedadores no humanos, pero no en un hospedador humano. Los anticuerpos para su uso humano incluyen aquellos que no pueden aislarse fácilmente de hospedadores tales como ratones, cabras, conejos, ratas, mamíferos que no son primates, etc. y generalmente no se pueden obtener por humanización o a partir de ratones xeno.
- 55

- Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo (por ej. IgA, IgG, IgM es decir una cadena pesada α , γ o μ), pero generalmente será IgG. Dentro del isotipo IgG, los anticuerpos pueden ser de subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los anticuerpos pueden tener una cadena ligera κ o λ .
- 60

Producción de anticuerpos

- Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica. La metodología general para fabricar anticuerpos monoclonales utilizando tecnología de hibridoma es bien conocida [34, 35]. Preferiblemente, se usa el método alternativo de inmortalización del EBV descrito en la referencia 36.
- 65

Usando el método descrito en la referencia 36, los linfocitos B que producen el anticuerpo de la invención se pueden transformar con el EBV en presencia de un activador de linfocitos B policlonal. La transformación con el EBV es una técnica estándar y puede adaptarse fácilmente para incluir activadores de linfocitos B policlonales.

- 5 Se pueden añadir estimulantes adicionales de crecimiento y diferenciación celular durante la etapa de transformación para mejorar aún más la eficacia. Estos estimulantes pueden ser citocinas tales como IL-2 e IL-15. En un aspecto, se añade IL-2 durante la etapa de immortalización para mejorar aún más la eficacia de la immortalización, pero su uso no es esencial.
- 10 Los linfocitos B inmortalizados producidos usando estos métodos pueden luego cultivarse usando métodos conocidos en la técnica y aislarse los anticuerpos a partir de los mismos.

Los anticuerpos también se pueden preparar cultivando células de plasma individuales en placas de cultivo de micropocillos usando el método descrito en la Solicitud de patente del Reino Unido 0819376.5. Además, a partir de cultivos de células plasmáticas individuales, se puede extraer ARN y se puede realizar la PCR de células individuales usando métodos conocidos en la técnica. Las regiones VH y VL de los anticuerpos se pueden amplificar por RT-PCR, secuenciar y clonar en un vector de expresión que luego se transfecta en células HEK293T u otras células del hospedador. La clonación del ácido nucleico en vectores de expresión, la transfección de células hospedadoras, el cultivo de las células hospedadoras transfectadas y el aislamiento del anticuerpo producido se puede realizar usando cualquier método conocido por los expertos en la materia.

Los anticuerpos monoclonales se pueden purificar adicionalmente, si se desea, usando filtración, centrifugación y diversos métodos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de afinidad. Las técnicas para la purificación de anticuerpos monoclonales, que incluyen técnicas para producir anticuerpos de calidad farmacéutica, son bien conocidas en la técnica.

Se pueden obtener fragmentos de anticuerpos monoclonales a partir de anticuerpos monoclonales mediante métodos que incluyen digestión con enzimas, tales como pepsina o papaína, y/o mediante escisión de enlaces disulfuro por reducción química. En otra alternativa, se pueden obtener fragmentos de los anticuerpos monoclonales por clonación y expresión de parte de las secuencias de las cadenas pesada o ligera. Los "fragmentos" de anticuerpos pueden incluir fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. La invención también abarca fragmentos Fv monocatenarios (scFv) derivados de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal de la invención, por ej., la invención incluye un scFv que comprende las CDR de un anticuerpo de la invención. También se incluyen monómeros y dímeros de cadena pesada o ligera, así como anticuerpos monocatenarios, por ej., Fv monocatenario en el que los dominios variables de la cadena pesada y ligera están unidos por un enlazador peptídico.

Se pueden usar técnicas estándar de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican los anticuerpos o fragmentos de los anticuerpos de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar completamente o en parte usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. La mutagénesis dirigida al sitio y las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden usar según corresponda.

Se puede usar cualquier sistema de célula hospedadora/vector adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican las moléculas de anticuerpo o fragmentos de las mismas. Se pueden usar sistemas bacterianos, por ejemplo, *E coli* y otros sistemas microbianos, en parte, para la expresión de fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab y F(ab')₂ y especialmente fragmentos Fv y fragmentos de anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, Fvs monocatenarios. Se pueden usar sistemas de expresión en células hospedadoras eucariotas, por ejemplo, de mamífero para la producción de moléculas de anticuerpo más grandes, que incluyen moléculas de anticuerpo completas. Las células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen células CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, mieloma o hibridoma.

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para conducir a la expresión de proteína a partir del ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención y aislar la molécula de anticuerpo.

Una molécula de anticuerpo puede comprender solo un polipéptido de la cadena pesada o ligera, en cuyo caso solo se necesita usar una secuencia codificante de polipéptido de la cadena pesada o ligera para transfectar las células hospedadoras. Para la producción de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como ligeras, la línea celular puede transfectarse con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de la cadena pesada. Como alternativa, se puede usar un único vector, incluyendo el vector secuencias que codifican polipéptidos de la cadena ligera y de la cadena pesada.

Como alternativa, los anticuerpos pueden producirse i) expresando una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula, y ii) aislando el producto de anticuerpo expresado. Adicionalmente, el método puede incluir iii) purificar el anticuerpo.

Selección y aislamiento de linfocitos B

Los linfocitos B transformados pueden seleccionarse para obtener aquellos que producen anticuerpos de la especificidad de antígeno deseada, y a continuación pueden producirse clones de linfocitos B individuales a partir de las células positivas.

La etapa de selección puede llevarse a cabo mediante ELISA, mediante tinción de tejidos o células (que incluyen células transfectadas), un ensayo de neutralización o uno de varios otros métodos conocidos en la técnica para identificar la especificidad de antígeno deseada. El ensayo puede seleccionarse basándose en el reconocimiento de antígeno simple, o puede seleccionarse basándose adicionalmente en una función deseada, por ej., para seleccionar anticuerpos neutralizantes en lugar de solo anticuerpos que se unen a antígenos, seleccionar anticuerpos que puedan cambiar las características de las células diana, como sus cascadas de señalización, su forma, su tasa de crecimiento, su capacidad de influir en otras células, su respuesta a la influencia de otras células o por otros reactivos o por un cambio en las condiciones, su estado de diferenciación, etc.

La etapa de clonación para separar clones individuales de la mezcla de células positivas se puede llevar a cabo usando dilución limitante, micromanipulación, deposición de células individuales mediante clasificación celular u otro método conocido en la técnica.

Los clones de linfocitos B inmortalizados de la invención se pueden usar de varias maneras por ej., como fuente de anticuerpos monoclonales, como fuente de ácido nucleico (ADN o ARNm) que codifica un anticuerpo monoclonal de interés, para investigación, etc.

La divulgación proporciona una composición que comprende linfocitos de memoria B inmortalizados, en la que las células producen anticuerpos con alta potencia neutralizante específica para hCMV, y en la que los anticuerpos se producen a ≥ 5 pg por célula por día. La divulgación también proporciona una composición que comprende clones de una célula de memoria B inmortalizada, en la que los clones producen un anticuerpo monoclonal con una alta afinidad específica para hCMV, y en la que el anticuerpo se produce a ≥ 5 pg por célula por día. Preferiblemente, dichos clones producen un anticuerpo monoclonal con una alta potencia para neutralizar la infección por hCMV.

Ejemplos de clones de linfocitos B inmortalizados incluyen, pero no se limitan a, 15D8, 4N10, 10F7, 10P3, 4I22, 8L13, 2C12, 8C15, 9I6, 7B13, 8J16, 8I21, 7I13, 7H3, 6B4, 5F1, 10C6, 4H9, 11B12, 13H11, 3G16, 2B11 y 6L3.

Epítopos

Como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos pueden usarse para cartografiar los epítopos a los que se unen. Los inventores han descubierto que los diversos anticuerpos que neutralizan la infección por hCMV de células endoteliales, células epiteliales, células retinianas y células dendríticas, están dirigidos hacia epítopos en la proteína del hCMV UL128, epítopos formados por las proteínas del hCMV UL130 y UL131A, epítopos formados por las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A, epítopos formados por las proteínas del hCMV gH, gL, UL128 y UL130, gB, gH, o epítopos formados por las proteínas del hCMV gM y gN. Los epítopos a los que se unen los anticuerpos pueden ser lineales (continuos) o conformacionales (discontinuos) y formados por una sola proteína del hCMV o por la combinación de 2, 3 o más proteínas del hCMV.

Los epítopos reconocidos por los anticuerpos pueden tener varios usos. El epítipo y mimotopos de los mismos en forma purificada o sintética se pueden usar para generar respuestas inmunitarias (es decir como una vacuna, o para la producción de anticuerpos para otros usos) o para seleccionar suero del paciente para obtener anticuerpos que inmunoreaccionan con el epítipo o mimotopos de los mismos. En una realización, dicho epítipo o mimotopo, o antígeno que comprende dicho epítipo o mimotopo, se puede usar como una vacuna para generar una respuesta inmunitaria. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos también se pueden usar en un método para controlar la calidad de las vacunas. En particular, los anticuerpos pueden usarse para comprobar que el antígeno en una vacuna contiene el epítipo inmunogénico específico en la conformación correcta.

El epítipo también puede ser útil para la selección de ligandos que se unen a dicho epítipo. Dichos ligandos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos; incluidos los de camellos, tiburones y otras especies, fragmentos de anticuerpos, péptidos, productos de tecnología de presentación en fagos, aptámeros, adnectinas o fragmentos de otras proteínas víricas o celulares, pueden bloquear el epítipo y así prevenir la infección.

Expresión recombinante

Los linfocitos de memoria B inmortalizados también se pueden usar como una fuente de ácido nucleico para la clonación de genes de anticuerpos para la expresión recombinante posterior. La expresión de fuentes recombinantes es más común para fines farmacéuticos que la expresión de linfocitos B o hibridomas por ej. por razones de estabilidad, reproducibilidad, facilidad de cultivo, etc.

Por lo tanto, la divulgación proporciona un método para preparar una célula recombinante, que comprende las

etapas de: (i) obtener uno o más ácidos nucleicos (por ej., genes de la cadena pesada y/o ligera) del clon de linfocitos B que codifica el anticuerpo de interés; y (ii) insertar el ácido nucleico en un hospedador de expresión para permitir la expresión del anticuerpo de interés en ese hospedador de interés.

- 5 De forma similar, la divulgación proporciona un método para preparar una célula recombinante, que comprende las etapas de: (i) secuenciación de ácido(s) nucleico(s) del clon de linfocitos B que codifica el anticuerpo de interés; y (ii) usar la información de secuencia de la etapa (i) para preparar ácido(s) nucleico(s) para su inserción en un hospedador de expresión para permitir la expresión del anticuerpo de interés en ese hospedador. El ácido nucleico puede, pero no necesita, manipularse entre las etapas (i) y (ii) para introducir sitios de restricción, cambiar el uso de
10 codones y/u optimizar las secuencias reguladoras de transcripción y/o traducción.

- La divulgación también proporciona un método para preparar una célula recombinante, que comprende la etapa de transformar una célula hospedadora con uno o más ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo monoclonal de interés, en el que los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos que se derivaron de un clon de linfocitos B
15 inmortalizado. Por lo tanto, los procedimientos para preparar primero el o los ácidos nucleicos y luego usarlos para transformar una célula hospedadora pueden realizarse en diferentes momentos por diferentes personas en diferentes lugares (por ej. en diferentes países).

- Estas células recombinantes pueden usarse luego para fines de expresión y cultivo. Son particularmente útiles para la expresión de anticuerpos para producción farmacéutica a gran escala. También se pueden usar como el principio activo de una composición farmacéutica. Se puede utilizar cualquier técnica de cultivo adecuada, que incluye, pero no se limita a, cultivo estático, cultivo en botella giratoria, fluido de ascitis, cartucho de biorreactor de fibra hueca, minifermentador modular, tanque agitado, cultivo de microvehículos, perfusión de núcleo cerámico, etc.
20

- Los métodos para obtener y secuenciar genes de inmunoglobulina de linfocitos B son bien conocidos en la técnica (por ej., ver referencia 37).
25

- El hospedador de expresión es preferiblemente una célula eucariota, que incluye células de levadura y animales, particularmente células de mamífero (por ej., células CHO, células NSO, células humanas tales como células PER.C6 [Crucell; referencia 38] o HKB-11 [Bayer; referencias 39 y 40], células de mieloma [41 y 42], etc.), así como las células vegetales. Los hospedadores de expresión preferidos pueden glicosilar el anticuerpo, particularmente con estructuras de carbohidratos que no son inmunogénicas en los seres humanos. En una realización, el hospedador de expresión puede ser capaz de crecer en medios sin suero. En una realización adicional, el hospedador de expresión puede crecer en cultivo sin la presencia de productos derivados de animales.
30

- El hospedador de expresión se puede cultivar para dar una línea celular.
35

- La invención proporciona un método para preparar una o más moléculas de ácido nucleico (por ej., genes de la cadena pesada y ligera) que codifican un anticuerpo de interés, que comprende las etapas de: (i) preparar un clon de linfocitos B inmortalizado; (ii) obtener del clon de linfocitos B ácido nucleico que codifica el anticuerpo de interés. La divulgación también proporciona un método para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de interés, que comprende las etapas de: (i) preparar un clon de linfocitos B inmortalizado de acuerdo con la invención; (ii) secuenciar el ácido nucleico del clon de linfocitos B que codifica el anticuerpo de interés.
40

- La divulgación también proporciona un método para preparar molécula(s) de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de interés, que comprende la etapa de obtener el ácido nucleico a partir de un clon de linfocitos B que se obtuvo a partir de un linfocito B transformado de la invención. Por lo tanto, los procedimientos para obtener primero el clon de linfocitos B y luego preparar el ácido(s) nucleico(s) a partir de este se pueden realizar en momentos muy diferentes por diferentes personas en diferentes lugares (por ej., en diferentes países).
45

- La divulgación proporciona un método para preparar un anticuerpo (por ej., para su uso farmacéutico), que comprende las etapas de: (i) obtener y/o secuenciar uno o más ácidos nucleicos (por ej., genes de la cadena pesada y ligera) del clon de linfocitos B seleccionado que expresa el anticuerpo de interés; (ii) insertar el o los ácidos nucleicos o usar el o los ácidos nucleicos para preparar un hospedador de expresión que pueda expresar el anticuerpo de interés; (iii) cultivar o subcultivar el hospedador de expresión en condiciones en las que se expresa el anticuerpo de interés; y, opcionalmente, (iv) purificar el anticuerpo de interés.
50

- La divulgación también proporciona un método para preparar un anticuerpo que comprende las etapas de: cultivar o subcultivar una población de células hospedadoras de expresión en condiciones en las que se expresa el anticuerpo de interés y, opcionalmente, purificar el anticuerpo de interés, en el que dicha población de células hospedadoras de expresión se ha preparado (i) proporcionando ácido o ácidos nucleicos del linfocito B seleccionado que codifica el anticuerpo de interés producido por una población de linfocitos de memoria B preparados como se describió anteriormente, (ii) insertando el ácido o ácidos nucleicos en un hospedador de expresión que puede expresar el anticuerpo de interés, y (iii) cultivando o subcultivando hospedadores de expresión que comprenden dichos ácidos nucleicos insertados para producir dicha población de células hospedadoras de expresión. Por lo tanto, los procedimientos para preparar primero el hospedador de expresión recombinante y luego cultivarlo para expresar el
55
60
65

anticuerpo pueden realizarse en momentos muy diferentes por diferentes personas en diferentes lugares (por ej., en diferentes países).

Además, las líneas celulares que expresan ejemplos de anticuerpos de la invención, 4N10, 2C12, 8C15, 8I21, 6B4, 10C6, 4H9, 11B12, 3G16 y 6L3 se depositaron en el Advanced Biotechnology Center (ABC), Largo Rossana Benzi 10, 16132 Génova (Italia), en los términos del Tratado de Budapest, el 9 de julio de 2008, (con los números de acceso PD 08009, PD 08007, PD 08006, PD 08005, PD 08004, PD 08014, PD 08013, PD 08011, PD 08012, y PD 08010, respectivamente) y una línea de linfocitos B inmortalizada que expresa 7H3 se depositó el 16 de julio de 2008 con el número de acceso PD 08017. Un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, expresado a partir de las líneas celulares anteriores que expresan 6B4, 10C6, 4H9 y 7H3 así como anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno del mismo, con la misma secuencia de aminoácidos expresada a partir de las líneas celulares anteriores que expresan 6B4, 10C6, 4H9 y 7H3 también se consideran dentro del alcance de la invención.

Estos depósitos se proporcionan para la comodidad de los expertos en la materia y no son una admisión de que tales depósitos se requieran para practicar la invención ni que las realizaciones equivalentes no estén dentro del conocimiento de la técnica a la vista de la presente divulgación. La disponibilidad pública de estos depósitos no es una concesión de una licencia para hacer, usar o vender los materiales depositados bajo esta u otras patentes.

Composiciones farmacéuticas

La invención proporciona una composición farmacéutica que contiene los anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos de la invención y/o el ácido nucleico que codifica dichos anticuerpos. Una composición farmacéutica también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable para permitir la administración. El vehículo no debe inducir la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, de metabolismo lento, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácidos minerales, tales como hidroclocloruros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH, pueden estar presentes en tales composiciones. Tales vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones y suspensiones, para su ingestión por el paciente.

Las formas de administración pueden incluir aquellas formas adecuadas para administración parenteral, por ej., por inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección en bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo aceitoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para su reconstitución antes del uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. En una realización, las composiciones están adaptadas para administración a sujetos humanos.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por cualquier número de vías que incluyen, entre otras, oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea, tópica, subcutánea, intranasal, enteral, sublingual, intravaginal o rectal. Los hiposprays también pueden usarse para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Generalmente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como inyectables, como soluciones líquidas o suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

La administración directa de las composiciones generalmente se realizará por inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se administrará al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un esquema de dosis única o un esquema de dosis múltiple. Los productos farmacéuticos conocidos a base de anticuerpos brindan orientación relacionada con la frecuencia de administración por ej., si un medicamento debe ser administrado diariamente, semanalmente, mensualmente, etc. La frecuencia y la dosis también pueden depender de la gravedad de los síntomas.

Las composiciones de la invención se pueden preparar de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones se

pueden preparar como inyectables, como soluciones líquidas o suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección (por ej., una composición liofilizada, como Synagis™ y Herceptin™, para la reconstitución con agua estéril que contiene un conservante). La composición puede prepararse para administración tópica por ej., como una pomada, crema o polvo. La composición puede prepararse para administración oral por ej., como un comprimido o cápsula, como un aerosol, o como un jarabe (opcionalmente con sabor). La composición puede prepararse para administración pulmonar por ej., como inhalador, usando un polvo fino o un aerosol. La composición puede prepararse como un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, aural u ocular por ej., como gotas. La composición puede estar en forma de kit, diseñada de modo que una composición combinada se reconstituya justo antes de la administración a un paciente. Por ejemplo, un anticuerpo liofilizado se puede proporcionar en forma de kit con agua estéril o un tampón estéril.

Se apreciará que el principio activo en la composición será una molécula de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o variantes y derivados de los mismos. Como tal, será susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición se va a administrar mediante una ruta que usa el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan al anticuerpo contra la degradación pero que liberen el anticuerpo una vez que se haya absorbido del tracto gastrointestinal.

Una descripción completa de vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, ISBN: 0683306472.

Las composiciones farmacéuticas de la invención generalmente tienen un pH entre 5,5 y 8,5, en algunas realizaciones esto puede estar entre 6 y 8, y en realizaciones adicionales aproximadamente 7. El pH puede mantenerse mediante el uso de un tampón. La composición puede ser estéril y/o estar exenta de pirógenos. La composición puede ser isotónica con respecto a los seres humanos. En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención se suministran en recipientes herméticamente cerrados.

Las composiciones farmacéuticas incluirán una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos y/o uno o más ácidos nucleicos, es decir una cantidad que es suficiente para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección deseada, o para exhibir un efecto terapéutico detectable. Los efectos terapéuticos también incluyen la reducción de los síntomas físicos. La cantidad eficaz precisa para cualquier sujeto particular dependerá de su tamaño y estado de salud, la naturaleza y el alcance de la afección, y los fármacos o combinación de fármacos seleccionados para la administración. La cantidad efectiva para una situación dada se determina mediante experimentación de rutina y está dentro del juicio de un médico. Para los fines de la presente invención, una dosis eficaz generalmente será de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, o de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de las composiciones de la presente invención en el individuo al que es administrado. Los productos farmacéuticos a base de anticuerpos conocidos proporcionan orientación a este respecto, por ej., Herceptin™ se administra por perfusión intravenosa de una solución de 21 mg/ml, con una dosis de carga inicial de 4 mg/kg de peso corporal y una dosis de mantenimiento semanal de 2 mg/kg de peso corporal; Rituxan™ se administra semanalmente a 375 mg/m²; etc.

Las composiciones pueden incluir más de uno (por ej., 2, 3, 4, 5, etc.) anticuerpos de la divulgación para proporcionar un efecto terapéutico aditivo o sinérgico. La composición puede comprender uno o más (por ej., 2, 3, 4, 5, etc.) anticuerpos de la divulgación y uno o más (por ej., 2, 3, 4, 5, etc.) anticuerpos adicionales que neutralizan la infección por hCMV.

Por ejemplo, un anticuerpo puede unirse a un epítipo de la proteína del hCMV UL128, un epítipo formado por las proteínas del hCMV UL130 y UL131A, un epítipo formado por las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A, un epítipo formado por las proteínas del hCMV gH, gL, UL128 y UL130, un epítipo de la proteína del hCMV gB, un epítipo de la proteína del hCMV gH, o un epítipo formado por las proteínas del hCMV gM y gN, mientras que otro puede unirse a un epítipo diferente de la proteína del hCMV UL128, un epítipo formado por UL130 y UL131A, un epítipo formado por UL128, UL130 y UL131A, un epítipo formado por gH, gL, UL128 y UL130, gB, gH, gL, gM, gN, gO, o un epítipo formado por gM y gN. Sin estar ligados a ninguna teoría, un anticuerpo puede dirigirse al mecanismo que media la infección de fibroblastos, mientras que el otro anticuerpo puede estar dirigido al mecanismo que media la infección de células endoteliales. Para un efecto clínico óptimo, puede ser ventajoso abordar ambos mecanismos de infección por hCMV y su mantenimiento.

La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos, en la que el primer anticuerpo es específico de un primer epítipo UL128, y el segundo anticuerpo es específico de un segundo epítipo UL128, una combinación de UL130 y UL131A, una combinación de UL128, UL130 y UL131A, una combinación de gH, gL, UL128 y UL130, gB, gH, gL, gM, gN, gO, o una combinación de gM y gN.

La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos, en la que el primer anticuerpo es específico de un primer epítipo de una combinación de UL130 y 131A, y el segundo anticuerpo es específico de UL128, un segundo epítipo de una combinación de UL130 y 131A, una combinación de UL128, UL130 y UL131A, una combinación de gH, gL, UL128 y UL130, gB, gH, gL, gM, gN, gO, o una combinación de gM y

gN.

5 La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos, en la que el primer anticuerpo es específico de un primer epítipo de una combinación de UL128, UL130 y 131A, y el segundo anticuerpo es específico de UL128, una combinación de UL130 y UL131A, un segundo epítipo de una combinación de UL128, UL130 y 131A, una combinación de gH, gL, UL128 y UL130, gB, gH, gL, gM, gN, gO, o una combinación de gM y gN.

10 La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos, en la que el primer anticuerpo es específico de un primer epítipo de una combinación de gH, gL, UL128, UL130 y UL131A, y el segundo anticuerpo es específico de UL128, una combinación de UL130 y UL131A, una combinación de UL128, UL130 y 131A, un segundo epítipo de una combinación de gH, gL, UL128 y UL130, gB, gH, gL, gM, gN, gO, o una combinación de gM y gN.

15 La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos, en la que el primer anticuerpo es específico de un primer epítipo gB, y el segundo anticuerpo es específico de UL128, una combinación de UL130 y UL131A, una combinación de UL128, UL130 y UL131A, una combinación de gH, gL, UL128 y UL130, un segundo epítipo gB, gH, gL, gM, gN, gO, o una combinación de gM y gN.

20 La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos, en la que el primer anticuerpo es específico de un primer epítipo gH, y el segundo anticuerpo es específico de UL128, una combinación de UL130 y UL131A, una combinación de UL128, UL130 y UL131A, una combinación de gH, gL, UL128 y UL130, gB, un segundo epítipo de gH, gL, gM, gN, gO, o una combinación de gM y gN.

25 La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos, en la que el primer anticuerpo es específico de un primer epítipo de una combinación de gM y gN, y el segundo anticuerpo es específico de UL128, una combinación de UL130 y UL131A, una combinación de UL128, UL130 y UL131A, una combinación de gH, gL, UL128 y UL130, gB, gH, gL, gM, gN, gO, o un segundo epítipo de una combinación de gM y gN.

30 Los ejemplos de anticuerpos para su uso en una composición farmacéutica que se unen a un epítipo de la proteína del hCMV UL128 incluyen, pero no se limitan a, 15D8. Los ejemplos de anticuerpos para su uso en una composición farmacéutica que se unen a un epítipo formado por las proteínas del hCMV UL130 y UL131A incluyen, pero no se limitan a, 4N10, 10F7, 10P3, 4I22, 8L13, 1F11, 2F4 y 5A2 (véase la Solicitud de los Estados Unidos N.º 11/ 969.104, presentada el 3 de enero de 2008 publicada como US 2008/0213265) Los ejemplos de anticuerpos para su uso en una composición farmacéutica que se unen a un epítipo formado por las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A incluyen, pero no se limitan a, 2C12, 7B13, 7I13, 8C15, 8J16, 9I6 y 6G4 (véase la solicitud de los Estados Unidos N.º 12/174,568, presentada el 16 de julio de 2008 publicada como US 2009/0081230). Los ejemplos de anticuerpos para su uso en una composición farmacéutica que se unen a un epítipo formado por las proteínas del hCMV gH, gL, UL128 y UL130 incluyen, pero no se limitan a, 8I21. Los ejemplos de anticuerpos de la invención para su uso en una composición farmacéutica que se unen a un epítipo de la proteína del hCMV gB incluyen, pero no se limitan a, 7H3, 10C6, 5F1, 6B4, 4H9 y 2B11. Los ejemplos de anticuerpos para su uso en una composición farmacéutica que se unen a un epítipo de la proteína del hCMV gH incluyen, pero no se limitan a, 11B12, 13H11 y 3G16. Los ejemplos de anticuerpos de la invención para su uso en una composición farmacéutica que se unen a un epítipo formado por las proteínas del hCMV gM y gN incluyen, pero no se limitan a, 6L3. La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos, en la que el primer anticuerpo es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención y el segundo anticuerpo es un anticuerpo ahora conocido en la técnica, o descubierto posteriormente, que neutraliza la infección por hCMV. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, MSL-109, 8F9 o 3E3.

50 La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 15D8 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 15D8 variante 1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 15D8 variante 2 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 8I21 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 2C12 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 8C15 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 9I6 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 7B13 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 8J16 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo

farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 7I13 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 4N10 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 10F7 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 10P3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 4I22 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 8L13 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 7H3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 7H3 variante 1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 10C6 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 5F1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 6B4 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 4H9 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 4H9 variante 1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 2B11 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 13H11 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 11B12 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 3G16 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo 6L3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender los anticuerpos anteriores de la invención o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, como el único principio activo. La composición farmacéutica puede comprender 2 o más, por ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más de los anticuerpos anteriores o fragmento de unión al antígeno del mismo. Como se describe en la presente memoria, las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden comprender un segundo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, que neutraliza la infección por hCMV.

45 Los anticuerpos de la invención se pueden administrar (ya sea combinados o por separado) con otros productos terapéuticos por ej., con compuestos quimioterapéuticos, con radioterapia, etc. Los compuestos terapéuticos preferidos incluyen compuestos antiviricos tales como ganciclovir, foscarnet y ciclofovir. Dicha terapia de combinación proporciona una mejora aditiva o sinérgica en la eficacia terapéutica con respecto a los agentes terapéuticos individuales cuando se administran solos. El término "sinergia" se usa para describir un efecto combinado de dos o más agentes activos que es mayor que la suma de los efectos individuales de cada agente activo respectivo. Por lo tanto, cuando el efecto combinado de dos o más agentes da como resultado la "inhibición sinérgica" de una actividad o proceso, se pretende que la inhibición de la actividad o proceso sea mayor que la suma de los efectos inhibidores de cada agente activo respectivo. La expresión "efecto terapéutico sinérgico" se refiere a un efecto terapéutico observado con una combinación de dos o más terapias en el que el efecto terapéutico (medido por cualquiera de un número de parámetros) es mayor que la suma de los efectos terapéuticos individuales observados con las respectivas terapias individuales

60 Los anticuerpos se pueden administrar a aquellos pacientes que previamente no han mostrado respuesta al tratamiento de la infección por hCMV, es decir que han demostrado ser resistentes al tratamiento anti-hCMV. Tal tratamiento puede incluir tratamiento previo con un agente antivirico. Esto puede ser debido, por ejemplo, a la infección con una cepa del hCMV resistente a los antiviricos.

65 En las composiciones de la invención que incluyen anticuerpos de la invención, los anticuerpos pueden constituir al menos 50 % en peso (por ej., 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) de la proteína total en la composición. Los anticuerpos están así en forma purificada.

La divulgación proporciona un método para preparar un producto farmacéutico, que comprende las etapas de: (i) preparar un anticuerpo de la invención; y (ii) mezclar el anticuerpo purificado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

La divulgación también proporciona un método para preparar un producto farmacéutico, que comprende la etapa de mezclar un anticuerpo con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se obtuvo a partir de un linfocito B transformado de la invención. Por lo tanto, los procedimientos para obtener primero el anticuerpo monoclonal y luego preparar el producto farmacéutico pueden realizarse en momentos muy diferentes por diferentes personas en diferentes lugares (por ej., en diferentes países).

Como alternativa a la administración de anticuerpos o linfocitos B con fines terapéuticos, es posible administrar ácido nucleico (generalmente ADN) que codifica el anticuerpo monoclonal (o fragmento activo del mismo) de interés a un sujeto, de modo que el ácido nucleico se puede expresar en el sujeto *in situ* para proporcionar un efecto terapéutico deseado. Los vectores de administración para terapia génica y de ácidos nucleicos adecuados son conocidos en la técnica.

Las composiciones de la divulgación pueden ser composiciones inmunogénicas, y en algunas realizaciones pueden ser composiciones de vacuna que comprenden un antígeno que comprende un epítipo de la proteína del hCMV UL128, formado por las proteínas del hCMV UL130 y UL131A, formadas por las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A, formadas por las proteínas del hCMV gH, gL, UL128 y UL130, en la proteína del hCMV gB, en la proteína del hCMV gH, o formada por las proteínas del hCMV gM y gN. Las composiciones alternativas pueden comprender (i) un antígeno que comprende un epítipo formado por una combinación de proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A, y (ii) un antígeno que comprende un epítipo encontrado en gB, gH, gL, gM, gN, gO, UL128, UL130 o UL131A, o una combinación de los mismos. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (es decir para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir para tratar la infección).

Las composiciones pueden incluir un agente antimicrobiano, particularmente si está empaquetado en un formato de dosis múltiple. Pueden comprender un detergente por ej., un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los detergentes generalmente están presentes en niveles bajos por ej., <0.01 %. Las composiciones también pueden incluir sales de sodio (por ej., cloruro de sodio) para dar tonicidad. Una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl es típica.

Las composiciones pueden comprender un alcohol de azúcar (por ej., manitol) o un disacárido (por ej., sacarosa o trehalosa) por ej., a alrededor de 15-30 mg/ml (por ej., 25 mg/ml), particularmente si van a ser liofilizadas o si incluyen material que ha sido reconstituido a partir de material liofilizado. El pH de una composición para liofilización puede ajustarse a aproximadamente 6,1 antes de la liofilización.

Las composiciones también pueden comprender uno o más agentes inmunorreguladores. En una realización, uno o más de los agentes inmunorreguladores incluyen un adyuvante.

Las composiciones de epítipo pueden provocar tanto una respuesta inmunitaria mediada por células como una respuesta inmunitaria humoral con el fin de atacar eficazmente una infección por hCMV. Esta respuesta inmunitaria puede inducir anticuerpos de larga duración (por ej., neutralizantes) y una inmunidad mediada por células que puede responder rápidamente después de la exposición al hCMV.

Tratamientos y usos médicos

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos de la invención o derivados y variantes de los mismos se pueden usar para el tratamiento de la infección por hCMV, para la prevención de la infección por hCMV o para el diagnóstico de la infección por hCMV.

Los métodos de diagnóstico pueden incluir poner en contacto un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con una muestra. Tales muestras pueden ser muestras de tejido tomadas de, por ejemplo, glándulas salivales, pulmón, hígado, páncreas, riñón, oreja, ojo, placenta, tracto alimentario, corazón, ovarios, hipófisis, glándulas suprarrenales, tiroides, cerebro o piel. Los métodos de diagnóstico también pueden incluir la detección de un complejo antígeno/anticuerpo.

Por lo tanto, la divulgación proporciona (i) un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o variantes y derivados del mismo de acuerdo con la invención, (ii) un clon de linfocitos B inmortalizado de acuerdo con la invención, (iii) un epítipo capaz de unirse a un anticuerpo de la invención o (iv) un ligando, preferiblemente un anticuerpo, capaz de unirse a un epítipo que se une a un anticuerpo de la invención para su uso en terapia.

También se divulga un método para tratar a un paciente que comprende administrar a ese paciente (i) un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, o variantes y derivados del mismo de acuerdo con la invención, o un ligando, preferiblemente un anticuerpo, capaz de unirse a un epítipo que se une a un anticuerpo de la invención.

La invención también proporciona el uso de (i) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la infección por hCMV.

La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, un ácido nucleico de la invención o una composición de la invención para su uso en el tratamiento de la infección por hCMV. La divulgación también proporciona el uso de un anticuerpo y/o una proteína que comprende un epítipo al que se une dicho anticuerpo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente y/o diagnóstico en un paciente. También proporciona un método para tratar un sujeto que necesita tratamiento, que comprende la etapa de administrar una composición de la invención al sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un ser humano. Una forma de verificar la eficacia del tratamiento terapéutico implica controlar los síntomas de la enfermedad después de la administración de la composición de la invención. El tratamiento puede ser un esquema de dosis única o un esquema de dosis múltiples.

En una realización, un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno del mismo, un epítipo o una composición de la invención se administra a un sujeto que necesita dicho tratamiento profiláctico o terapéutico. Tal sujeto incluye, pero no se limita a, alguien que está particularmente en riesgo de infección por hCMV o es susceptible a ella. Los ejemplos de sujetos incluyen, pero no se limitan a, sujetos inmunodeprimidos o mujeres embarazadas hCMV-seronegativas o infectadas recientemente con el hCMV. Los ejemplos de sujetos inmunodeprimidos incluyen, pero no se limitan a, aquellos afectados por el VIH o aquellos sometidos a terapia inmunosupresora.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos también se pueden usar en la inmunización pasiva. Además, también se pueden usar en un kit para el diagnóstico de la infección por hCMV.

Los epítopos capaces de unirse a un anticuerpo, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales 15D8, 4N10, 10F7, 10P3, 4I22, 8L13, 2C12, 8C15, 9I6, 7B13, 8J16, 8I21, 7I13, 7H3, 6B4, 5F1, 10C6, 4H9, 2B11, 11B12, 13H11, 3G16, y 6L3 se pueden usar en un kit para controlar la eficacia de los procedimientos de vacunación detectando la presencia de anticuerpos anti-hCMV protectores.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, o variantes y derivados de los mismos, como se describe en la presente memoria, también pueden usarse en un kit para controlar la fabricación de vacunas con la inmunogenicidad deseada.

La divulgación también proporciona un método para preparar un producto farmacéutico, que comprende la etapa de mezclar un anticuerpo monoclonal con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, en la que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal que se obtuvo a partir de un hospedador de expresión de la invención. Por lo tanto, los procedimientos para obtener primero el anticuerpo monoclonal (por ej., expresarlo y/o purificarlo) y luego mezclarlo con el vehículo o los vehículos farmacéuticos se puede realizar en momentos muy diferentes por diferentes personas en diferentes lugares (por ej., en diferentes países).

Comenzando con un linfocito B transformado de la invención, se pueden realizar varias etapas de cultivo, subcultivo, clonación, subclonación, secuenciación, preparación de ácido nucleico etc. con el fin de perpetuar el anticuerpo expresado por el linfocito B transformado, con optimización opcional en cada etapa. En una realización preferida, los métodos anteriores comprenden además técnicas de optimización (por ej., afinidad de maduración u optimización) aplicadas a los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo. La invención abarca todas las células, ácidos nucleicos, vectores, secuencias, anticuerpos etc. usados y preparados durante tales etapas.

En todos estos métodos, el ácido nucleico usado en el hospedador de expresión puede manipularse para insertar, eliminar o modificar ciertas secuencias de ácido nucleico. Los cambios de dicha manipulación incluyen, pero no se limitan a, cambios para introducir sitios de restricción, para modificar el uso de codones, para añadir u optimizar secuencias reguladoras de la transcripción y/o traducción, etc. También es posible cambiar el ácido nucleico para alterar los aminoácidos codificados. Por ejemplo, puede ser útil introducir uno o más (por ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Tales mutaciones puntuales pueden modificar las funciones efectoras, la afinidad de unión al antígeno, las modificaciones postraduccionales, la inmunogenicidad, etc., pueden introducir aminoácidos para la unión de grupos covalentes (por ej., marcadores) o pueden introducir etiquetas (por ej., para fines de purificación). Las mutaciones se pueden introducir en sitios específicos o se pueden introducir al azar, seguido de selección (por ej., evolución molecular). Por ejemplo, uno o más ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las regiones CDR, regiones variables de la cadena pesada o regiones variables de cadena ligera de anticuerpos pueden mutarse al azar o direccionalmente para introducir diferentes propiedades en los aminoácidos codificados. Dichos cambios pueden ser el resultado de un proceso iterativo en el que se retienen los cambios iniciales y se introducen nuevos cambios en otras posiciones de nucleótidos. Además, los cambios logrados en etapas independientes pueden combinarse. Las diferentes propiedades introducidas en los aminoácidos codificados pueden incluir, pero no se limitan a, afinidad mejorada.

Generalidades

El término “que comprende” abarca “que incluye” así como “que consiste” por ej., una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional por ej., X + Y.

5 La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente” por ej., una composición que está “sustancialmente exenta” de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando sea necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

10 El término “aproximadamente” en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

El término “enfermedad” como se usa en la presente memoria pretende ser generalmente sinónimo, y se usa indistintamente con los términos “trastorno” y “afección” (como en afección médica), ya que todos reflejan una condición anormal del cuerpo humano o animal o de una de sus partes que deteriora el funcionamiento normal, se manifiesta generalmente por signos y síntomas distintivos, y hace que el ser humano o animal tenga una duración o calidad de vida reducida.

20 Como se usa en la presente memoria, la referencia al “tratamiento” de un paciente pretende incluir prevención y profilaxis. El término “paciente” significa todos los mamíferos, incluidos los seres humanos. Los ejemplos de pacientes incluyen seres humanos, vacas, perros, gatos, caballos, cabras, ovejas, cerdos y conejos. En general, el paciente es un ser humano.

Ejemplos

25 Las realizaciones de ejemplo de la presente invención se proporcionan en los siguientes ejemplos. Los siguientes ejemplos se presentan solo a modo de ilustración y para ayudar a un experto de conocimientos comunes en la materia en el uso de la invención. Los ejemplos no están destinados de ninguna manera a limitar de otro modo el alcance de la invención.

30 Ejemplo 1: clonación de linfocitos B y selección de actividad neutralizante de hCMV

Se identificaron donantes con altos títulos de anticuerpos neutralizantes de hCMV en el suero. Los linfocitos B de memoria se aislaron e immortalizaron usando EBV y CpG como se describe en la referencia 36. Brevemente, los linfocitos B de memoria se aislaron mediante selección negativa usando perlas CD22, seguido de la eliminación de linfocitos B IgM⁺, IgD⁺ IgA⁺ usando anticuerpos específicos y clasificación de células. Las células clasificadas (IgG⁺) se immortalizaron con EBV en presencia de CpG 2006 y se irradiaron las células mononucleares alogénicas. Los cultivos replicados que contenían cada uno 50 linfocitos B de memoria se establecieron en veinte placas de fondo U de 96 pocillos. Después de dos semanas, los sobrenadantes de cultivo se recogieron y se analizaron en cuanto a su capacidad para neutralizar la infección por hCMV de fibroblastos o células epiteliales en ensayos separados. Los clones de linfocitos B se aislaron a partir de cultivos policlonales positivos como se describe en la referencia 36. Las concentraciones de IgG en el sobrenadante de los clones seleccionados se determinaron usando un ELISA específico de IgG.

45 Para el ensayo de neutralización vírica, se mezcló una cantidad titulada de un aislado de hCMV clínico con un volumen igual de sobrenadante de cultivo o con diluciones de sueros humanos que contenían anticuerpos neutralizantes. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se añadió a monocapas confluentes de células endoteliales (por ej., células HUVEC o células HMEC-1), células epiteliales (por ej., células retinianas ARPE), fibroblastos (por ej., MRC-9 o células estromales mesenquimales) o células mieloides (por ej., células dendríticas derivadas de monocitos) en placas de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron a 37 °C durante dos días. El sobrenadante se descartó, las células se fijaron con metanol frío y se tiñeron con una mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón contra antígenos tempranos del hCMV, seguido de una Ig anti-ratón de cabra marcada con fluoresceína. Las placas se analizaron usando un microscopio de fluorescencia. En ausencia de anticuerpos neutralizantes, las células infectadas fueron de 100-1.000/campo, mientras que en presencia de concentraciones saturantes de anticuerpos neutralizantes, la infección se inhibió por completo. El título neutralizante se indica como la concentración de anticuerpo (µg/ml) que proporciona una reducción del 50 % o del 90 % de la infección por hCMV.

60 La Tabla 5A muestra la neutralización de un aislado clínico del hCMV (VR1814) tanto en una línea celular fibroblástica (MRC-9) como en una línea celular epitelial retiniana humana (ARPE). Algunos anticuerpos neutralizaron la infección por hCMV de las células epiteliales (ARPE) pero no neutralizaron la infección de los fibroblastos (MRC-9). Esto concuerda con los datos previos de que las diferentes proteínas son responsables del tropismo hacia un tipo de célula particular [7]. La mayoría de estos anticuerpos, que son específicos de una o más proteínas del complejo proteico gH/gL/UL128/UL130/UL131A, neutralizaron la infección por hCMV de las células epiteliales a concentraciones muy bajas (50 % de reducción de la infección por hCMV en concentraciones que varían de 0,01 µg/ml y 0,001 µg/ml). Otros anticuerpos, que son específicos de la proteína del hCMV gB, gH o una combinación de gM y gN, neutralizaron la infección por hCMV de fibroblastos y células epiteliales con potencia

comparable. Estos resultados muestran que algunos de los anticuerpos neutralizantes del hCMV son igualmente potentes tanto en fibroblastos como en células epiteliales, mientras que otros muestran actividad diferencial en los dos tipos de células.

- 5 Basándose en el análisis mostrado en la Tabla 5A, los anticuerpos se agruparon en el Grupo 1 (infección por hCMV neutralizante de fibroblastos y células epiteliales) y el Grupo 2 (infección por hCMV neutralizante de células epiteliales). La Tabla 5B muestra un experimento independiente realizado usando anticuerpos purificados. Los resultados muestran que los anticuerpos del Grupo 2 neutralizaron la infección de células epiteliales con valores de CI_{90} (es decir, la concentración de anticuerpo necesaria para lograr una reducción del 90 % de la infección vírica)
- 10 que varían de 0,007 µg/ml a 0,003 µg/ml mientras que los anticuerpos del Grupo 1 neutralizaron la infección tanto de fibroblastos como de células epiteliales con valores de CI_{90} que varían de 0,1 µg/ml a 30 µg/ml. Los anticuerpos del Grupo 2 también neutralizaron la infección de células endoteliales (HUVEC) y células mieloides (células dendríticas derivadas de monocitos) (datos no mostrados). Los anticuerpos del Grupo 1 también neutralizaron la infección de células endoteliales (HUVEC), células mieloides (células dendríticas derivadas de monocitos) y células del estroma
- 15 mesenquimal de médula ósea, como se muestra para algunos anticuerpos representativos en la Tabla 5C. Los anticuerpos de la invención también neutralizaron la infección de células endoteliales (HUVEC) por diferentes aislados clínicos del hCMV: VR6952 (de orina), VR3480B1 (de sangre, resistente a ganciclovir) y VR4760 (de sangre, resistente a ganciclovir y foscarnet) (datos no mostrados).)
- 20 Se prevé que los anticuerpos que neutralizan la infección de diferentes tipos de células pueden combinarse para producir un efecto de neutralización aditivo o sinérgico cuando los diferentes tipos de células están presentes durante la infección. Como ejemplo, un anticuerpo neutralizante, tal como 15D8 que es potente para neutralizar la infección de células epiteliales pero que no neutraliza la infección de fibroblastos podría combinarse con 3G16 que tiene actividad neutralizante de virus en fibroblastos. Como otro ejemplo, un anticuerpo neutralizante, tal como 9I6
- 25 que es potente para neutralizar la infección de células epiteliales pero no neutraliza la infección de fibroblastos, podría combinarse con 6B4 que tiene actividad neutralizante de virus en fibroblastos.

Tabla 5A

mAb	Donante	Especificidad ⁽²⁾	Neutralización 50 % ⁽¹⁾	
			MRC-9	ARPE
15D8	GRA	UL128	-	++++
4N10	GIO	UL130/UL131A	+	++++
10F7	PAP	UL130/UL131A	+	+++
10P3	PEL	UL130/UL131A	-	++++
4122	PEL	UL130/UL131A	-	+++
8L13	PEL	UL130/UL131A	-	+++
2C12	PAP	UL128/UL130/UL131A	+	+++
7B13	PAP	UL128/UL130/UL131A	-	++++
7113	PAP	UL128/UL130/UL131A	-	+++
8C15	PAP	UL128/UL130/UL131A	-	++++
8J16	PAP	UL128/UL130/UL131A	-	++++
9I6	PEL	UL128/UL130/UL131A	-	++++
8121	PEL	gH/gL/UL128/UL130	-	+++
11B12	PAP	gH	+	+
13H11	GRA	gH	+	+++
3G16	PEL	gH	+	+
7H3	PEL	gB	+	-
10C6	PEL	gB	+	+
5F1	PEL	gB	+	+
6B4	PEL	gB	+	+
4H9	PEL	gB	+	+
6L3	PEL	gM/gN	No realizado	+

1) Valores que indican la concentración de anticuerpo necesaria para proporcionar una reducción del 50% de la infección por hCMV de los fibroblastos (por ej., MRC-9) o células epiteliales (por ej., células retinianas ARPE). La concentración es como se indica a continuación:

++++ <0,001 µg/ml; +++ <0,01 µg/ml; ++ <0,1 µg/ml; + ≤ 2 µg/ml;
 - No neutralizante a la concentración más alta probada (2 µg/ml).
 2) Especificidad como se define en la Tabla 6.

Tabla 5B

Grupo	mAb	Donante	Especificidad ⁽²⁾	Neutralización 90 % ⁽¹⁾ MRC-9	Neutralización 90 % ⁽¹⁾ ARPE
2	15D8	GRA	UL128	nn ⁽³⁾	0,008
2	4N10	GIO	UL130/UL131A	Nn	0,02
2	10F7	PAP	UL130/UL131A	Nn	0,002
2	10P3	PEL	UL130/UL131A	Nn	0,0025
2	4122	PEL	UL130/UL131A	Nn	0,0015
2	8L13	PEL	UL130/UL131A	Nn	0,001
2	2C12	PAP	UL128/UL130/UL131A	Nn	0,006
2	7B13	PAP	UL128/UL130/UL131A	Nn	0,003
2	7113	PAP	UL128/UL130/UL131A	Nn	0,008
2	8C15	PAP	UL128/UL130/UL131A	Nn	0,0025
2	8J16	PAP	UL128/UL130/UL131A	Nn	0,0008
2	916	PEL	UL128/UL130/UL131A	Nn	0,0007
2	8121	PEL	gH/gL/UL128/UL130	Nn	0,03
1	11B12	PAP	gH	3,5	1,2
1	13H11	GRA	gH	1,12	0,4
1	3G16	PEL	gH	1,0	0,3
1	7H3	PEL	gB	3	0,6
1	10C6	PEL	gB	0,75	0,2
1	5F1	PEL	gB	0,5	0,1
1	6B4	PEL	gB	1,0	0,15
1	4H9	PEL	gB	10	0,4
1	2B11	PEL	gB	0,75	0,2
1	6L3	PEL	gM/gN	30	10

1) Los valores que indican la concentración de anticuerpo en µg/ml requerida para proporcionar una reducción del 90% de la infección por hCMV (VR1814) de los fibroblastos (p.ej, MRC-9) o células epiteliales (p.ej, células retinianas ARPE),

2) Especificidad como se define en la Tabla 6,

3) nn, no neutralizante a la concentración más alta probada (10 µg/ml),

Tabla 5C

Grupo	mAb	Especificidad	Neutralización 50 % ⁽¹⁾		
			HUVEC	Mo-DC	BM-MSC
1	7H3	gB	nd	0.06	2
1	10C6	gB	0,19	0,02	0,3
1	5F1	gB	0,21	0,05	0,3
1	6B4	gB	nd	0,11	2

1) Los valores que indican la concentración de anticuerpo en µg/ml requerida para proporcionar una reducción del 50% de la infección por hCMV (VR1814) de las células primarias. HUVEC, células endoteliales de vena umbilical humana, Mo-DC, células dendríticas derivadas de monocitos, BM-MSC, células estromales de médula ósea mesenquimales.

Para cartografiar la especificidad de los anticuerpos neutralizantes del hCMV, se transfectaron células HEK293T con uno o más vectores que codifican las proteínas del hCMV de longitud completa UL128, UL130, UL131A, gH, gL, gB, gM y gN. Después de 36 h, las células se fijaron, se permeabilizaron y se teñieron con los anticuerpos monoclonales humanos seguido de IgG anti-humana de cabra. La Figura 1 muestra la unión de anticuerpos representativos a células HEK293T que expresan una o más proteínas del hCMV. La Tabla 6 muestra el patrón de tinción de todos los diferentes anticuerpos contra células HEK293T transfectadas con el gen del hCMV. Con la excepción del anticuerpo 15D8, que teñía las células transfectadas con UL128, todos los otros anticuerpos del Grupo 2 no teñieron transfectantes de un solo gen, lo que sugiere que pueden reconocer epítomos que requieren la coexpresión de más de un producto génico. De hecho, cinco anticuerpos (4N10, 10F7, 10P3, 4I22 y 8L13) teñían células que coexpresaban UL130 y UL131A, seis anticuerpos (2C12, 7B13, 7I13, 8C15, 8J16 y 9I6) teñían células que coexpresaban UL128, UL130 y UL131A, y un anticuerpo (8I21) teñía células transfectadas con UL128 y UL130 así como con gH y gL. Todos estos anticuerpos también teñieron las células HEK293T transfectadas con todos los genes que forman el complejo gH/gL/UL128-130. Entre los anticuerpos del Grupo 1, tres (11B12, 13H11 y 3G16) teñían células que expresan la proteína del hCMV gH, seis (7H3, 10C6, 5F1, 6B4, 4H9 y 2B11) teñían células que expresaban la proteína del hCMV gB y uno (6L3) teñía células que coexpresaban las proteínas del hCMV gM y gN.

Tabla 6

Células HEK293T transfectadas con:	Anticuerpo monoclonal						
	Grupo 2				Grupo 1		
	15D8	4N10 10F7 10P3 4I22 8L13	2C12 7B13 7I13 8C15 8J16 9I6	8I21	11B12 13H11 3G16	7H3 10C6 5F1 6B4 4H9 2B11	6L3
UL128	+	-	-	-	-	-	nd ⁽¹⁾
UL130	-	-	-	-	-	-	nd
UL131A	-	-	-	-	-	-	nd
UL128+UL130	+	-	-	-	-	-	nd
UL128+UL131A	+	-	-	-	-	-	nd
UL130+UL131A	-	+	-	-	-	-	nd
UL128+UL130+UL131A	+	+	+	-	-	-	-
gH	-	-	-	-	+	-	-
gL	-	-	-	-	+	-	-
gH+gL	-	-	-	-	+	-	-
gH+UL128+UL130+UL131A	+	+	+	-	+	nd	nd
gL+UL128+UL130+UL131A	+	+	+	-	-	nd	nd
gH+gL+UL128	+	-	-	-	+	nd	nd
gH+gL+UL130	-	-	-	-	+	nd	nd
gH+gL+UL131A	-	-	-	-	+	nd	nd
gH+gL+UL128+UL130	+	-	-	+	+	nd	nd
gH+gL+UL128+UL130+UL131A	+	+	+	+	+	-	-
gB	-	-	-	nd	-	+	-
gM	nd	-	-	nd	nd	nd	-
gN	nd	-	-	nd	nd	nd	-
gM+gN	-	-	-	-	nd	nd	+
1) nd, no realizado							

Para explorar adicionalmente la identidad de los sitios de antígeno a los que se unen los anticuerpos, se realizaron experimentos de competición cruzada. Aquí, las células HEK293T se transfectaron con vectores que codifican las proteínas del hCMV de longitud completa gH, gL, UL128, UL130 y UL131A. Las células se incubaron a continuación con un exceso de 20 veces de un anticuerpo neutralizante del hCMV competidor antes de la adición de un anticuerpo biotinilado. Este procedimiento se repitió varias veces con diferentes anticuerpos competidores y anticuerpos biotinilados. En estos experimentos se incluyeron cuatro anticuerpos descritos en la Solicitud de patente

N.º 11/ 969,104 publicada como US 2008/0213265 (1F11, 2F4 y 5A2) y en la Solicitud de patente N.º 12/174,568 publicada como US 2009/0081230 (6G4). Los datos se muestran en la Tabla 7A, B.

Tabla 7A

Competidor (exceso 20 veces)	Especificidad ⁽¹⁾	Inhibición de la unión (%)							
		15D8-biotina	4N10-biotina	10F7-biotina	4122-biotina	1F11-biotina	2F4-biotina	5A2-biotina	
15D8	UL128	100	0	0	0	0	0	0	
4N10	UL130/UL131A	0	100	0	0	0	0	100	
10F7	UL130/UL131A	0	0	100	100	100	100	0	
10P3	UL130/UL131A	0	nd	nd	0	0	0	Nd	
4122	UL130/UL131A	nd	0	100	100	100	100	0	
8L13	UL130/UL131A	nd	nd	100	nd	100	Nd	nd	
1F11	UL130/UL131A	0	0	100	100	100	100	0	
2F4	UL130/UL131A	nd	0	100	100	100	100	0	
5A2	UL130/UL131A	nd	100	0	0	0	50 ⁽²⁾	100	
2C12	UL128/UL130/UL131A	0	0	0	0	0	0	0	
7B13	UL128/UL130/UL131A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
7113	UL128/UL130/UL131A	nd	nd	nd	nd	0	nd	nd	
8C15	UL128/UL130/UL131A	nd	nd	nd	0	nd	nd	nd	
8J16	UL128/UL130/UL131A	nd	nd	nd	0	0	0	nd	
9I6	UL128/UL130/UL131A	nd	nd	Nd	0	0	0	nd	
6G4	UL128/UL130/UL131A	0	0	0	0	0	0	0	
8121	gH/gL/UL128/UL130	0	90	nd	0	0	0	95	

1) Especificidad tal como se define es la Tabla 6.

2) La competencia por debajo del 100% puede deberse al solapamiento parcial de los epítomos o al impedimento estérico o a una menor afinidad.

1) Especificidad tal como se define en la Tabla 6.

2) La competencia por debajo del 100% puede deberse al solapamiento parcial de los epítopos o al impedimento estérico o a una menor afinidad.

Tabla 7B

Competidor (exceso 20 veces)	Especificidad ⁽¹⁾	Inhibición de la unión (%)					
		2C12-biotina	8C15-biotina	8J16-biotina	916-biotina	6G4-biotina	8121-biotina
15D8	UL128	0	nd	Nd	nd	0	0
4N10	UL130/UL131A	0	nd	Nd	nd	0	90 ⁽²⁾
10F7	UL130/UL131A	0	nd	Nd	nd	0	0
10P3	UL130/UL131A	0	nd	Nd	nd	0	0
4I22	UL130/UL131A	0	nd	0	nd	nd	0
8L13	UL130/UL131A	nd	nd	Nd	nd	nd	nd
1F11	UL130/UL131A	0	nd	Nd	nd	0	0
2F4	UL130/UL131A	0	nd	Nd	0	0	0
5A2	UL130/UL131A	0	nd	Nd	0	0	92
2C12	UL128/UL130/UL131A	100	100	100	100	100	0
7B13	UL128/UL130/UL131A	100	100	100	100	100	0
7I13	UL128/UL130/UL131A	0	0	0	0	0	0
8C15	UL128/UL130/UL131A	100	100	100	100	100	0
8J16	UL128/UL130/UL131A	100	100	100	70	100	0
916	UL128/UL130/UL131A	100	100	100	100	100	0
6G4	UL128/UL130/UL131A	100	100	100	100	100	0
8121	gH/gL/UL128/UL130	0	nd	Nd	nd	0	100
3G16	gH	0	nd	Nd	nd	0	0

1) Especificidad tal como se define es la Tabla 6.
2) La competencia por debajo del 100 % puede deberse al solapamiento parcial de los epítomos o a impedimento estérico o a una menor afinidad.

Basándose en los datos de la Tabla 7A, B, se pueden distinguir al menos siete sitios antigénicos distintos en el complejo del hCMV formado por gH, gL, UL128 y UL130 (Tabla 8). El sitio 1 está presente en UL128 y está definido por el anticuerpo 15D8. Los sitios 2 a 4 están formados por la combinación de UL130 y UL131A y están definidos por los anticuerpos 10F7, 4I22, 8L13, 1F11 y 2F4 (sitio 2), por 4N10 y 5A2 (sitio 3), y por 10P3 (sitio 4), respectivamente. Los sitios 5 y 6 están formados por la combinación de UL128, UL130 y UL131A y están definidos por los anticuerpos 2C12, 7B13, 8C15, 8J16, 916 y 6G4 (sitio 5) y por 7I13 (sitio 6), respectivamente. Finalmente, el sitio 7 está formado por la combinación de gH, gL, UL128 y UL130 y está definido por el anticuerpo 8I21. Los anticuerpos que definen el sitio 7 y el sitio 3 compitieron parcialmente entre sí, lo que sugiere que estos sitios pueden estar próximos en la estructura del complejo gH/gL/UL128-131A.

Se anticipa que los anticuerpos neutralizantes dirigidos a diferentes epítomos en la misma diana se pueden usar en combinación para lograr una neutralización robusta de la infección del virus, como se ejemplifica por 10F7 y 4N10 o por 8J16 y 7I13. Además, se prevé que los anticuerpos neutralizantes dirigidos a diferentes moléculas diana o combinaciones de moléculas diana se puedan usar juntos para lograr una neutralización robusta del virus. Como un ejemplo, la Tabla 8 sugiere que 15D8 y 10F7, 15D8 y 2C12, u 8J16 y 8I21 podrían combinarse para producir efectos de neutralización del hCMV aditivos o sinérgicos.

Tabla 8

Antígeno diana	Sitio antigénico	Anticuerpos que definen el sitio antigénico
UL128	1	15D8
UL130/UL131A	2	10F7, 4I22, 8L13, 1F11, 2F4
UL130/UL131A	3	4N10, 5A2
UL130/UL131A	4	10P3
UL128/UL130/UL131A	5	2C12, 7B13, 8C15, 8J16, 916, 6G4
UL128/UL130/UL131A	6	7I13
gH/gL/UL128/UL130	7	8I21

De una manera similar a la descrita en la Tabla 7, las células HEK293T se transfectaron con un vector que codifica gH de longitud completa para examinar la unión de competición cruzada de los anticuerpos anti-gH. Como puede verse en la Figura 2A y en la Tabla 9, se identificaron al menos dos sitios de unión diferentes en la proteína del hCMV gH. El anticuerpo 3G16 define un sitio y los anticuerpos 11B12 y 13H11 definen un segundo sitio. Finalmente, las células HEK293T se transfectaron con un vector que codificaba gB de longitud completa para examinar la unión de competición cruzada de los anticuerpos anti-gB. Como se puede ver en la Figura 2B y la Tabla 10, se identificaron al menos tres sitios antigénicos diferentes en la proteína del hCMV gB. El anticuerpo 6B4 define un sitio, 7H3 define un segundo sitio y el conjunto de 10C6, 5F1, 4H9 y 2B11 define un tercer sitio. El anticuerpo 6B4 (que reconoce el sitio 1 de la gB) reaccionó mediante ELISA con el péptido gB 69-78 (CE₅₀ de 0,044 µg/ml). Se prevé que los anticuerpos que se dirigen a sitios diferentes incluso en la misma molécula diana se puedan usar en combinación para lograr una neutralización robusta del virus.

Tabla 9

Competidor (exceso 20 veces)	Especificidad ⁽¹⁾	Inhibición de la unión (%) de:			Sitio antigénico en gH
		3G16-biotina	11B12-biotina	13H11-biotina	
3G16	gH	100	0	0	1
11B12	gH	0	100	100	2
13H11	gH	0	100	100	2

1) Como se define en la Tabla 6

Tabla 10

Competidor (exceso 20 veces)	Especificidad ⁽¹⁾	Inhibición de la unión (%) de:						Sitio antigénico en gH
		7H3-biotina	10C6-biotina	5F1-biotina	6B4-biotina	4H9-biotina	2B11-biotina	
6B4	gB	0	0	0	100	0	0	1
7H3	gB	100	0	0	0	0	0	2
10C6	gB	0	100	100	0	100	100	3
5F1	gB	0	100	100	0	100	100	3
4H9	gB	0	100	100	0	100	100	3
2B11	gB	0	100	100	0	100	100	3

1) Como se define en la Tabla 6.
2) La competencia por debajo del 100 % puede deberse a una superposición parcial de epítomos, a impedimento estérico o a una menor afinidad.

Como resumen, **15D8** se une a un epítipo de UL128 que es distinto del epítipo reconocido por 2C12, 7B13, 6G4 (todos ellos específicos de una combinación de UL128, UL130 y UL131A) y del epítipo reconocido por 8I21 (específico de una combinación de gH, gL, UL128 y UL130). Además, la unión de **15D8** a su epítipo no es inhibida por 4N10, 10F7, 10P3 y 1F11 (todos ellos específicos de una combinación de UL130 y UL131A).

4N10 se une a un epítipo que requiere la expresión de UL130 y UL131A y que es igual o se solapa en gran medida a los epítomos reconocidos por 5A2 (específico de una combinación de UL130 y UL131A) y 8I21 (específico de una combinación de gH, gL, UL128 y UL130) pero distinto de los epítomos reconocidos por 10F7, 4I22, 1F11, 2F4 (todos ellos específicos de una combinación de UL130 y UL131A), 2C12 y 6G4 (ambos específicos de una combinación de UL128, UL130 y UL131A). Además, la unión de **4N10** a su epítipo no es inhibida por 15D8 (específico de UL128).

10F7 se une a un epítipo que requiere la expresión de UL130 y UL131A que es igual o se solapa en gran medida con el epítipo o los epítomos reconocidos por 4I22, 8L13, 1F11 y 2F4 pero distinto del epítipo o epítomos reconocidos por 4N10 y 5A2 (ambos específicos de una combinación de UL130 y UL131A), así como distinto de los epítomos reconocidos por 2C12 y 6G4 (ambos específicos de una combinación de UL128, UL130 y UL131A). Además, la unión de **10F7** a su epítipo no es inhibida por 15D8 (específico de UL128) o por 13H11 (específico de gH).

4I22 se une a un epítipo que requiere la expresión de UL130 y UL131A y que es igual o que se solapa parcialmente al epítipo o epítomos reconocidos por 2F4, 1F11 y 10F7 pero distinto del epítipo o epítomos reconocidos por 4N10, 10P3 y 5A2 (todos ellos específicos de una combinación de UL130 y UL131A) y distinto de los epítomos reconocidos por 2C12, 8C15, 8J16, 9I6, 6G4 (todos ellos específicos de una combinación de UL128,

UL130 y UL131A) y 8I21 (específico de una combinación de gH, gL, UL128 y UL130. Además, la unión de **4I22** a su epítipo no es inhibida por los anticuerpos 15D8 (específico de UL128) o por 13H11 (específico de gH).

2C12 se une a un epítipo que requiere la expresión de los productos de los genes del hCMV UL128, UL130 y UL131A y que es el mismo o se solapa en gran parte con el epítipo o epítipos reconocidos por 7B13, 8C15, 8J16, 9I6 y 6G4 pero distinto del epítipo reconocido por 7I13 (todos ellos específicos de una combinación de UL128, UL130 y UL131A) y distinto del epítipo o epítipos reconocidos por 15D8 (específico de UL128), 4N10, 10F7, 10P3, 4I22, 8L13, 1F11, 2F4, 5A2 (todos ellos específicos de una combinación de UL130 y UL131A) y 8I21 (específico de una combinación de gH, gL, UL128 y UL130). Además, la unión de **2C12** a su epítipo no es inhibida por 3G16 (específico de gH).

8C15 se une a un epítipo que requiere la expresión de los productos de los genes del hCMV UL128, UL130 y UL131A y que es el mismo o se solapa en gran parte con el epítipo o epítipos reconocidos por 2C12, 7B13, 8J16, 9I6 y 6G4 pero distinto del epítipo reconocido por 7I13 (todos ellos específicos de una combinación de UL128, UL130 y UL131A).

8J16 se une a un epítipo que requiere la expresión de los productos de los genes del hCMV UL128, UL130 y UL131A y que es el mismo o se solapa en gran parte con el epítipo o epítipos reconocidos por 2C12, 7B13, 8C15, 9I6 y 6G4, pero distinto del epítipo reconocido por 7I13 (todos específicos de una combinación de UL128, UL130 y UL131A) y del epítipo reconocido por 4I22 (específico de una combinación de UL130 y UL131A).

9I6 se une a un epítipo que requiere la expresión de los productos de los genes del hCMV UL128, UL130 y UL131A y que es el mismo o se solapa en gran parte con el epítipo o epítipos reconocidos por 2C12, 7B13, 8C15, 8J16 y 6G4 pero distinto del epítipo reconocido por 7I13 (todos ellos específicos de una combinación de UL128, UL130 y UL131A) y de los epítipos reconocidos por 2F4 y 5A2 (específicos de una combinación de UL130 y UL131A).

8I21 se une a un epítipo que requiere la expresión de los productos de los genes del hCMV gH, gL, UL128 y UL130 y que puede solaparse parcialmente con el epítipo o epítipos reconocidos por 4N10 y 5A2 (ambos específicos de una combinación de UL130 y UL131A) pero distinto de los epítipos reconocidos por 15D8 (específico de UL128), 10F7, 10P3, 4I22, 1F11, 2F4 (todos ellos específicos de una combinación de UL130 y UL131A), 2C12, 7B13, 7I13, 8C15, 8J16, 9I6 y 6G4 (todos ellos específicos de una combinación de UL128, UL130 y UL131A). Además, la unión de **8I21** su epítipo no es inhibida por 3G16 (específico de gH).

3G16 se une a un epítipo de gH que es distinto del epítipo o epítipos reconocidos por 11B12 y 13H11 (ambos específicos de gH).

11B12 se une a un epítipo de gH que es igual o se solapa en gran parte con el epítipo reconocido por 13H11 y distinto de los epítipos reconocidos por 3G16 (ambos específicos de gH).

13H11 se une a un epítipo de gH que es igual o se solapa en gran parte con el epítipo reconocido por 11B12 y distinto de los epítipos reconocidos por 3G16 (ambos específicos de gH).

6B4 reconoce un epítipo de gB que es distinto del epítipo o epítipos reconocidos por 7H3, 4H9, 5F1, 10C6 y 2B11 (todos ellos específicos de gB).

7H3 se une a un epítipo de gB que es distinto del epítipo o epítipos reconocidos por 6B4, 7H3, 4H9, 5F1, 10C6 y 2B11 (todos ellos específicos de gB).

10C6 se une a un epítipo de gB que es igual o parcialmente solapado con el epítipo o epítipos reconocidos por 5F1, 4H9 y 2B11, pero distinto del epítipo o epítipos reconocidos por 7H3 y 6B4 (todos ellos específicos de gB).

5F1 se une a un epítipo de gB que es el mismo o se solapa en gran parte con el epítipo o epítipos reconocidos por 10C6, 4H9 y 2B11 pero distinto del epítipo o epítipos reconocidos por 6B4 y 7H3 (todos ellos específicos de gH).

4H9 se une a un epítipo de gB que es el mismo o se solapa en gran parte con el epítipo o epítipos reconocidos por 5F1, 10C6 y 2B11, pero distinto del epítipo o epítipos reconocidos por 6B4 y 7H3 (todos ellos específicos de gH).

2B11 se une a un epítipo de gB que es el mismo o se solapa en gran parte con el epítipo o epítipos reconocidos por 5F1, 10C6 y 4H9 pero distinto del epítipo o epítipos reconocidos por 6B4 y 7H3 (todos ellos específicos de gH).

Ejemplo 3: Amplitud de la actividad neutralizante del anticuerpo 15D8

UL128 es el gen más conservado del locus UL132-128. Sin embargo, las secuencias derivadas de varios aislados clínicos revelaron la existencia de 10 variantes con una o más mutaciones en comparación con la secuencia VR1814. Por lo tanto, investigamos si la unión del anticuerpo 15D8 específico de UL128 se vería afectada por cualquiera de estas mutaciones. Con este objetivo, se alinearon secuencias publicadas de aminoácidos de variantes

de UL128 de aislados clínicos (VR4603-M, VR4836-M, VR5001-M, VR4254-M, VR4969-M, VR4313-M, VR4116-M, VR5235-T, VR5055-T, VR4168-A, VR1814-PCR) y cepas de laboratorio (Towne, TB40/E, AD169, Merlin y Toledo) y se sintetizó un gen que codifica una proteína que incluye todas las sustituciones de aminoácidos descritas, así como una mutación adicional que se vio que se generaba a una frecuencia muy alta *in vitro* tras la amplificación por PCR (F33V). La secuencia de nucleótidos del gen sintético fue:

atgaacagcaagacgtgacgccgttcttgacgacctgtgtggtgctattggaccacagccgctgccgagggtacgcgcagaagaatgtt
gcgaattcataaacgtcaaccacccgccggaacgctgttacgatttcaaatgtgcaatctgttcaccgtgcgctgcgggtgtccggacggc
gaagtctgtacagtcccgagaaaacggctgagattcgccggatcgccaccacatgacccattcattgacacgccagggtcatccacaaca
aactgacgagctgcaactacaatccgttatacctgaagctgacggcggaatacgtgcggcaaatgagcgacaaggcgagctacctg
ctggggcccgctggcagcgttccctatcgatggatcaacctggaatacgacaagataacccggatcggtgggcctggatcagctacctggag
agcgtaagaaacacaaacggctggatgtgtgccgcgctaaaatgggctatatgctgcagtag.

Las células HEK293T se transfectaron con el UL128 original de VR1814 o con el gen pan-mutado y se tiñeron con diluciones en serie del anticuerpo 15D8. Como se muestra en la Figura 3, la proteína de UL128 original y del pan-mutado fueron reconocidas por 15D8 con una eficacia comparable (tinción saturada a ~ 0,2 µg/ml). Estos hallazgos indican que 15D8 reconoce un epítipo altamente conservado en la proteína codificada por UL128.

REFERENCIAS

[1] Plachter et al. (1996) Adv Virus Res 46:195-261.

[2] Gerna et al. (2002) J Med Virol 66:335-339.

[3] Adler, B., L. Scrivano, Z. Ruzcics, B. Rupp, C. Sinzger, and U. Koszinowski. 2006. Role of human cytomegalovirus UL131A in cell type-specific virus entry and release. J Gen Virol 87:2451-2460.

[4] Gerna, G., E. Percivalle, D. Lilleri, L. Lozza, C. Fornara, G. Hahn, F. Baldanti, and M.G. Revello. 2005. Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8+ T cells. J Gen Virol 86:275-284.

[5] Hahn, G., M.G. Revello, M. Patrone, E. Percivalle, G. Campanini, A. Sarasini, M. Wagner, A. Gallina, G. Milanesi, U. Koszinowski, F. Baldanti, and G. Gerna. 2004. Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. J Virol 78:10023-10033.

[6] Patrone, M., M. Secchi, L. Fiorina, M. Ierardi, G. Milanesi, and A. Gallina. 2005. Human cytomegalovirus UL130 protein promotes endothelial cell infection through a producer cell modification of the virion. J Virol 79:8361-8373.

[7] Wang, D., and T. Shenk. 2005. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. Proc Natl Acad Sci USA 102:18153-18158.

[8] Wang, D., and T. Shenk. 2005. Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. J Virol 79:10330-10338.

[9] Nigro et al. 2005. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. N Engl J Med 353:1350-1362.

[10] Borucki et al. 2004. A phase II, double-masked, randomized, placebo-controlled evaluation of a human monoclonal anti-Cytomegalovirus antibody (MSL-109) in combination with standard therapy versus standard therapy alone in the treatment of AIDS patients with Cytomegalovirus retinitis. Antiviral Res 64:103-111.

[11] McLean et al. 2005. Recognition of human cytomegalovirus by human primary immunoglobulins identifies an innate foundation to an adaptive immune response. J Immunol, 174:4768-4778.

[12] Lefranc et al. 2003. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. Dev Comp Immunol. 27(1):55-77.

[13] Lefranc et al. 1997. Unique database numbering system for immunogenetic analysis. Immunology Today, 18:509..

[14] Lefranc (1999) *The Immunologist*, 7:132-136.

[15] US 3.766.162

5 [16] US 3.791.932

[17] US 3.817.837

[18] US 4.233.402

10 [19] US 4.676.980

[20] US 4.831.175

15 [21] US 5.595.721

[22] WO00/52031

[23] WO00/52473

20 [24] US 4.766.106

[25] US 4.179.337

25 [26] US 4.495.285

[27] US 4.609.546

[28] Knauf et al. (1988) *J. Bio. Chem.* 263:15064-15070

30 [29] Gabizon et al. (1982) *Cancer Research* 42:4734

[30] Cafiso (1981) *Biochem Biophys Acta* 649:129

35 [31] Szoka (1980) *Ann. Rev. Biophys. Eng.* 9:467

[32] Poznansky et al. (1980) *Drug Delivery Systems* (R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y.) pp. 253-315

[33] Poznansky (1984) *Pharm Revs* 36:277

40 [34] Kohler, G. and Milstein, C., 1975, *Nature* 256:495-497.

[35] Kozbar et al. 1983, *Immunology Today* 4:72.

45 [36] WO2004/076677

[37] Chapter 4 of Kuby *Immunology* (4th edition, 2000; ASIN: 0716733315

[38] Jones et al. *Biotechnol Prog* 2003,19(1):163-8

50 [39] Cho et al. *Cytotechnology* 2001,37:23-30

[40] Cho et al. *Biotechnol Prog* 2003,19:229-32

55 [41] US 5.807.715

[42] US 6.300.104

60

Lista de SEQ ID

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
1	4N10	CDRH1 aa	GGTFSSYV
2		CDRH2 aa	VIIFDTV
3		CDRH3 aa	ARGILAYCGGDCYNTPYGMDV
4		CDRL1 aa	QSISSW
5		CDRL2 aa	KAS
6		CDRL3 aa	QYNSST
7		CDRH1 nuc	ggaggcaccdtcagcagctatgtt
8		CDRH2 nuc	gtcatccatctttgatcacgla
9		CDRH3 nuc	gogagggaattctagcatattgtgtgtgattgctataataacccdtacggtatggagctc
10		CDRL1 nuc	cagagtagtagctgg
11		CDRL2 nuc	aaggogtdt
12		CDRL3 nuc	caacagataatagttogtggao
13		cad pesada aa	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFSSYVIIVWRQAPGQGLEWMGG VIIFEDTVNYAQKFQGRVTITADESTAYMELSLKSEDTAVVYCARGILAYC GGDCYNTPYGMVDVWGQGTITVTVSS
14		cad ligera aa	DIQMTQSPSILASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPKGKAPKLLIKASS LEIGVPSRISGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQYNSSWTFGQGTKVEIK
15		cad pesada nuc	caggtgcagctgggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggtaggggtctcct gcaaggctctggaggcacccttcagcagctatgtttatcatctgggtgcgacaggccctgggacaa ggctctgagtggtggatgggggggtcatccctatctttgatacagtaaatcgcacagaagttcca gggcagagtcagattaccgcggagcaatccacgagtactgcctacatggagctgagcagcct gaaatctgaggacacggcgtatattactgtgcgagaggaattctagcatattgtgtgtgtgatt gctataatacccttacggtagtgagcgtctgggggccaaggacacgggtcacccgtctcctcag
16		cad ligera nuc	gacatccagatgaccagctccttcacatcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcact tgccggggccagtcagagtagtagtggttggtcctggtatcagcagaaccagggaagccc caaaactcctaataaaggcgttagtttagaaattgggggtcccatcaaggatcagcggcaggt ggatctgggacagaattcactctcacatcagcagcagcctgcagcctgatgtttgcaactttac tgccaacagataatagttcgtggagcttcggccaaggacgaaggtggaaatcaaac GTFGDYA
17	10F7	CDRH1 aa	

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
18		CDRH2 aa	IRSKAYGGTT
19		CDRH3 aa	TRASSLLWLLNPQPNFDY
20		CDRL1 aa	NIGSNN
21		CDRL2 aa	DDS
22		CDRL3 aa	QVWDSSSDHPV
23		CDRH1 nuc	ggattcaaccttgggtattatgct
24		CDRH2 nuc	attagaagcaagcttatggggacaaca
25		CDRH3 nuc	actagagcatctcattactatggtactaaaccccaacccacttgaclac
26		CDRL1 nuc	aacatiggaagtaacaat
27		CDRL2 nuc	gatgatagc
28		CDRL3 nuc	cagggtgggatagtagtagtcatcogtga
29		cad pesada aa	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYAMSWFRQAPGKLEWVGF IRSKAYGGTTEYAAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNLSKTEDTAVYCTRASSL LWLLNPQPNFDYWGGQTLTVSS
30		cad ligera aa	SYVLTQPPSVAPGQTARITCGGNNIGSNNVHWYQQKPGQAPLVVYDD SDRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSDHPVFGGG TKLTVL
31		cad pesada nuc	gagggtcagctgggtggagctcggggggaggcttggtacagccagggcggtccctgagactctct gtacagcttctggattcaccttgggtgattatgctatgagctgggtccgaggctccaggggaagg ggctggagtggtggtttcattagaagcaagcttatgggtgggacaacagaatacgccgctc tgtgaaaggcagattcaccatctcaagagatgattcacaagacatcgccctatctgcaaatgaac agcctgaaacccgaggacacagccgtgtattactgtactagagacatcttcatctatggttact aaacctcaacccaacttgactactggggccagggaaacctgggtcacccgtctctcctcag tcctatgtgctgactcagccacctcgggtcagtggtggcccccagggacagacggccaggattacctg tgggggaaacaacattgggaagtaacaatgtgcactggtaccagagaagccagggccggcccc tgtgtggtcgctctatgatgtagcagccggccctcagggatccctcagcagcgtctctggtctcaa ctctgggaaacacggccacctgaccatcagcagggtcgaagccggggatgagggccgactatta ctgtcaggtgtgggatatgtagtagtgcacatccggtattcggcgaggaggaccaaagctgacccgtcc tag
32		cad ligera nuc	
33	10P3	CDRH1 aa	GFTFHNRYR

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
34		CDRH2 aa	IKQDGSEK
35		CDRH3 aa	ARGEGYTYGVVYSAMDV
36		CDRL1 aa	VLPNQY
37		CDRL2 aa	KDT
38		CDRL3 aa	QSADSSGADYV
39		CDRH1 nuc	ggattcaactttcataactatogc
40		CDRH2 nuc	ataaagcaagatggaagtgagaa
41		CDRH3 nuc	gogagggggaagggtacactatgggtogtctatctattccgtatggaogtc
42		CDRL1 nuc	gtattgccaaaccaatat
43		CDRL2 nuc	aaagacact
44		CDRL3 nuc	caatcagcaga cag cagtggtg cagattatgtc
45		cad pesada aa	EVQLVESGGGLVFRPGGSLRLSCAASGFTFHNYRMNWVRQAPGKGLEWVA NIKQDGESEKSVDSVRGRTTSRDNSKNSLYLQINSLRAEDTAVVYCARGEGY TYGVVYSYAMDVWGQGTIVVSS
46		cad ligera aa	SYELTQPPSVSPGQATARITCSGNVLPNQYASWYQQKPGAPLVLYKDT RPSGIPGRFSGSSGTTVLTISGVQAEADYYCQADSSGADYVFGTGTVK TVL
47		cad pesada nuc	gaggtgcagctggtagagctctgggggaggcttggtcggcctgggggggtccctgagactctcat gtgcagcctctggattcacctttcataactatcgcataactggaactgggtccgaggctccagggaag gggctggagtggtggccaaacataaagcaagatggaaagtgaagaaatcctatgtggactctgtg aggggctgattcaccaactccagagacaaactccaagaattcactctatctgcaaatcaacagcct gcgagcagaggacacggctgtctattactgtgcgaggggtgaagggtacacctatgggtgtgtct actcattccgtatggagctctggggccaagggaaccacacagtcactgtctctcctcag
48		cad ligera nuc	tcctatgagctgacacagccaccctcgggtcagtggtccccaggagacagcggccaggatcacct gctctggaaaatgtattgccaaaccaataatgcttcttggtaccagcagaagcaggccggccct gtattggtatataaagacactgagagggccctcagggtatccctgggctgattctctggctccag ctcagggaacagacagtcacgttgaccatcagtgaggtccaggcagaggaaggctgactatta ctgtcaatcagcagacagcagtggtggtccgattatgtcttcggaactgggaccaaggctaccgtcc tag
49	4I22	CDRH1 aa	GFTFSSYA

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
50		CDRH2 aa	ISYDGDNK
51		CDRH3 aa	AREELVGLMPPYYNYGLDV
52		CDRL1 aa	NSNIGNNY
53		CDRL2 aa	DND
54		CDRL3 aa	ETWDTSLSAVV
55		CDRH1 nuc	ggattcaaccttcagttcctatgct
56		CDRH2 nuc	attcatatgatggogacaacaaa
57		CDRH3 nuc	gogagagaagagttagtaggggtgatgctccctatttacaactaoggaatggagctc
58		CDRL1 nuc	aactccaacatcgggaataattat
59		CDRL2 nuc	gacaatgat
60		CDRL3 nuc	gaaacatgggatataccagcctgagtgctgctgtgtc
61		cad pesada aa	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGDNKFYADSVKGRFRISRDTSKNTLYLEMNLSRAADTAIYYCAREELV GLMPPYYNYGLDVWGQGTITVSS
62		cad ligera aa	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGNSNIGNNNVSWYQQLPGRAPKLLIYDN DHRPSGIPDRFSGSKSGTSATLVITGLQIGDEADYYCETWDTLSAAVVFGG GTKLTVL
63		cad pesada nuc	caggtgcagctggtagtctggggagggtgggtccagcctggagggtcctgagactctct gttagcctctggattcaccttcagttcctatgctatgcactgggtcgcaggctccaggcaagg gactggagtgggtggcagttatttcataatgatggcgacaaacaaattctacgcagactcgtgaag ggccgattcaggatctccagagacacatccaagaatacactgtatctggaaatgaacagcctga gagctcgggacacggctatatattactgtgcgagagagaagtagtagtgggttgatgacctcctat tacaactacggattggagctctggggccaaggaaaccaggtcacctcgtcag
64		cad ligera nuc	cagctgtgtgtgactcagccgcctcagttgtctgcggccccaggagacagaaggtcaccatctcctg ctctggaagcaactccaacatcgggaataattatgtatgtgtggtaccagcagctccagggaaga gccccaaactcctcatttatgacaaatgatcaccgacctcagggttctgacgattctctgggc tcaaagtctggcacgtcagccaccctgggtcatcaccggactcagactggggacgagggcgatt attactcgaaacatgggataccagcctgagtgctgtgtgtgtcttctggcgaggggaccaagctg accgtcctac
65	2C12	CDRH1 aa	GFSLNTNGVG
66		CDRH2 aa	IYWNGNE

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
67		CDRH3 aa	VHWPQGLTIVTRLAFDI
68		CDRL1 aa	TSDVGRYNF
69		CDRL2 aa	DVS
70		CDRL3 aa	CSYAGGNFFSYV
71		CDRH1 nuc	ggcttctcaccaacaataagagtggt
72		CDRH2 nuc	atttadggaatgtaatgag
73		CDRH3 nuc	gtacacggcccaagggtgactacggtgacaagacttgcttttgatatac
74		CDRL1 nuc	aacagtgatgtglogtataaadt
75		CDRL2 nuc	gatgcagt
76		CDRL3 nuc	tgtctcatatgcaggcggcaatttttctcttatgtc
77		cad pesada aa	QITLRESGPTLVKPTQLTLICTFSGLNTNGVGVWIRQPPGKALEWLALI YWNNGEYSPSLKSRLLTITKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCVHWPQ GLTTVTRLAFDIWGQGTMTVTSS
78		cad ligera aa	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTTSVGRYNFVSWYQQHPGKAPKLLMY DVSQRPSGVPSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAVFYCCSYAGGNFFSYVFG TGTKVTVL
79		cad pesada nuc	cagatcaccttgaggagtgctggctctacgctggtgaaacccacacagaccctcacgctgacct gcaccttctctggcttctcactcaacactaatggagtggtggtggatccgtcagccccag gaaaggccctggagtggtgctgactcatttactggaaatggtaatgagggtacagccccctctctg aaaaagcagactcaccatcaccaaggacactccaaaaaccagggtggtctcgacaatgaccaac atggaccctgtggacacagccacataattactgtgtacactggcccccaagggttgactacgggtgac aagacttgctttgatatactggggccaaggagactatggtcacctctcttcag
80		cad ligera nuc	cagctgcccctgactcagcctcgctcagtgctcgggtctctggacagtcagtcaccatctctctgc actggaaccaccagtgatgttggtcggtataacttctctctggtaccacaacacccaggcaa agccccaaactctgtgatgtatgctcagtcagcggccctcaggggtccctagtcgctctctctgg ctcaagctctggcaacacggcctccctgaccatctctgggctccaggctgaggatgaggctgtttt ttactgctctcatatgcaggcggcaatttttctcttatgtcttcggaaactgggaccaaggctcacc gtcctag
81	8C15	CDRH1 aa	GGSIIRSY
82		CDRH2 aa	IYVSGNT
83		CDRH3 aa	ARHDVIVVRGVFDV
84		CDRL1 aa	SSDIGTYNL

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
85		CDRL2 aa	DGS
86		CDRL3 aa	CSYAGTSDFFV
87		CDRH1 nuc	ggggctccatcggagttactac
88		CDRH2 nuc	atctattacagtggaacacc
89		CDRH3 nuc	gogagacatgatgtagtagtcoggggtctttgatgac
90		CDRL1 nuc	agcagtgatattggaactataacdt
91		CDRL2 nuc	gattggcagt
92		CDRL3 nuc	tgtcatatgctggtagdagatttcttttggtt
93		cad pesada aa	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRSYVSWIRQPPGKGLEWIGHIY YSGNTNYSPLQSRVTISLDTPKNQFSLRLSSVTAAATAVYCARHADVIVVRG VFDVWGQGTIVTVSS
94		cad ligera aa	QSAITQPASVSGSPGQISITISCTGTSSDIGTYNLVSWYQQHPGKAPKVLIDG SKRPSGVSSRFSASKSGNTASLTISGLQAEDETDYCCSYAGTSDFFVWFGGG TKLTVL
95		cad pesada nuc	caggtgcagctgcaggagtcggggccaggctctggtagaagccttcggagaccctgtccctcacct gcactgtctctgggtggctccatccggagttactactggagctggatcggcagccccccagggaag ggactggagtggtgggacacatctattacagtggggaacacaaactacagccccctccctccaga gtcaggtcaccatatcattagacacgcccagaacaaattctcctcggtgctgagctctgtgacc gccgcagacacggccgtctattactgtgcgagacatgatgtgtagtagtccgggtgtctttga tgtctggggccaaggacagtggtcaccgtctcttcag
96		cad ligera nuc	cagtcgtccctgactcagctgcctcgtgtgtgggtcacctggacagtcgatcacatctctctgc actggaaaccagcagtgatattggaaactataacctgtctcctggaccacaacacccaggca aagcccccaagtcctaatattatgatggcagtaagcggccctcagggttttctagtcgtctctg ctccaagtctggcaacacggcctccctgacaatctctgggctccaggtcagggacgagactga ttattactgtctcatatgctggtagtagcgtatttctgtggttttcggcggaggaccaaagctg accgtcctgg
97	916	CDRH1 aa	GDTFPAYW
98		CDRH2 aa	INPIDSET
99		CDRH3 aa	ARGTSTGLREAFHI
100		CDRL1 aa	QSLGYSDGNTY
101		CDRL2 aa	EVS
102		CDRL3 aa	MQGTHWPPMCS

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
103		CDRH1 nuc	ggagacacttttccggcctactgg
104		CDRH2 nuc	atdctatctattgactcagagacc
105		CDRH3 nuc	gccccggggagacaagta dggcctcagagaggcttttcatatc
106		CDRL1 nuc	caaagcctcgggatacagtgatggaacaactat
107		CDRL2 nuc	gaggttttt
108		CDRL3 nuc	atgcaaggtacacatggcctcccatgtgcagt
109		cad pesada aa	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCRESGDTFPAYWIAWVRQMPGKGLEWMGI IYPIDSETTSPSFQGVQVTISADKSIINTAYLQWSSLKASDSAIYYCARGTSTGLR EAFHIWGQGTMVTVSS
110		cad ligera aa	DVVMTQSPSLAVTLGQPAVISCRSSQSLGSDNTYLNWFQQRPQSQSPRR LIYEVSNRDSGVPDFRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGTYYCMQGTHTWPPM CSFGQGQTKLEIK
111		cad pesada nuc	gagggtcagctggtgcagctggagcagaggtgaaaaagccccggggagctctgaagatctcct gtagggaaatctggagacacttttccgcctactggatcgctgggtgcgccagatgcccgaggaa aggcctggagtgaggaaattatctatctctattgactctgagaccacatatagccggtccttcca aggccaggtcaccatttcagccgacaaagtccatcaaacccctacctgcagtgaggagcagcctg aaggcctcggactcggcatttattactgtgccccgggggacaagtactggcctcagagaggcctt tcatatctggggccaaagggaacaatgggtcaccgtctcttcag
112		cad ligera nuc	gatgttgatgactcagctctccactctcctggcggcgtcacccctggacagcggcctacatctcct gcaggtcaagtcaaaagcctcggatacagtgatgggaaacacacctatttgattggtttcagcagag accaggccaatctcccaggcgcctaatattatgaggtttctaacgggactctgggggtcccagaca gattcagcggcagtggtcgggcactgatttcacactgaaatcagcaggggtggaggctgagg atgttgggacttattactgcatgcaaggtaacacactggcctcccatgtgcagtttggccaggggg accaagttggagatcaaac
113	8L13	CDRH1 aa	GFTFSNYG
114		CDRH2 aa	IWNDSKK
115		CDRH3 aa	ARDEGVQMVFAMPDYGMDV
116		CDRL1 aa	KLGDKE
117		CDRL2 aa	QDS
118		CDRL3 aa	QAWDSSTAHYV
119		CDRH1 nuc	ggattcaccttcagtaattatggc
120		CDRH2 nuc	atattggaatgatggaagtaagaaa

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
121	7B13	CDRH3 nuc	g c g a g a g a t g a a g g t g t a c a a a t g g t g t t c g c c a t g c c d g a d a o g g t a t g g a c g t c
122		CDRL1 nuc	a a a t t g g g g a t a a a t t c
123		CDRL2 nuc	c a a g a t t c c
124		CDRL3 nuc	c a g g o t g g g a c a g c a g c a d g c c c a t t a t g t c
125		cad pesada aa	QVQLLES GGVVQ PGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHVVWRQAPGKGLEWVA VIWNDGSKYYAESVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDE GVQMVFAMPDYGM DVWGQGT TTVTVSS
126		cad ligera aa	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGDKL GDFACWYQQRP GQSPILVIYQDSK RPSGIPERFSGNSGNTATLTIRGTQAMDEADYYCQAWDSSTAHYVFGTGT KVTVL
127		cad pesada nuc	c a g g t g c a g t t g c t g g a g t c t g g g g g a g g c g t g g t c c a g c c t g g g a g g t c c c t g a g a c t c t c c t g t g c a g c g t c t g g a t t c a c c t t c a g t a a t t a t g g c a t g c a c t g g g t c c g c a g g t c c a g g c a a g g g g c t g g a g t g g g c a g t t a t a t g g a a t g a t g g a a g t a a g a a a t a t t a t g c a g a g t c c g t g a a g g g c g g t t c a c c a t c t c a g a g a c a a t t c a a g a a c a c a g t a t a t c t a c a a a t g a a c a g c c t g a g a g c c g a g g a c a c g g c t g t g t a t t a c t g t c g a g a g a t g a a g g t g t a c a a a t g g t g t c g c c a t g c c t g a c t a c g g t a t g g a c g t c t g g g g c c a g g g g a c c a c g g t c a c c g t c t c t c a g
128		cad ligera nuc	t c t a t g a a c t g a c t c a g c c a c c c t c a g t g t c g t g t c c c a g g a c a g a c a g c c a g c a t c a c t t g c t c t g g a g a t a a a t t g g g g g a a a t t c g c t t g c t g g t a t c a g c a g a g g c c a g g c c a g t c t c t a t a c t g g t c a t c t a c a g a t t c a a g c g g c c c t c a g g g a t c c c t g a g c g a t t c t g g t c c a a c t c t g g g a a c a c a g c c a c t c t g a c c a t c c g c g g g a c c a g g c t a t g g a t g a g g t g a c t a t t a c t g t c a g g c g t g g g a c a g c a g c a c t g c c c a t t a t g t c t t c g g a a c t g g g a c c a a g g t c a c c g t c c t g
129	7B13	CDRH1 aa	GFSFSNYG
130		CDRH2 aa	IPSDGNYQ
131		CDRH3 aa	AHLGGGLFDF
132		CDRL1 aa	SSDVGGYEF
133		CDRL2 aa	DVD
134		CDRL3 aa	YSSADTWV
135		CDRH1 nuc	g g a t t c d t c a g t a a t t a t g g c
136		CDRH2 nuc	a t a c o g t d g a l g g a a a t t a t c a a
137		CDRH3 nuc	g c c a c d c g g g g g g t t a t t t g a c t t c
138		CDRL1 nuc	a g c a g t g a t g t g t g g t a t g a g t t t
139		CDRL2 nuc	g a t g t o g a t

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
140		CDRL3 nuc	tactcatdgcagacacctgggtc
141		cad pesada aa	QQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVA LIPSDGNYQYYTDSVKGRFTVSRDNRNTLYLQMKSLRAEDTARYHCAHLG GGLEDFWGGQTLTVSS
142		cad ligera aa	QSALNQPRSVSGSPGQSVSISCTGSSSDVGGYEFVSWYQHHPGKAPKLIYD VDKRPSGVPPDRFSGSRSGDTASLTISGLQAEDEADYYCYSSADTWVFGGGTK LTVL
143		cad pesada nuc	caggtgcagctggtggagctctgggggaggcggtgggtccagcctgggggggtccctgagattgtcct gtgcagcgtctggattctcttccttcagtaattatggcatgcaactgggtccgccaggctccaggcaag gggtggagtggtggcacttataccgctctgatggaaattatcaatactatacagactccgtgaa gggcgattcacgctccagagacaattccaggaaacacgttgatctgcaaatgaagagcctg agagctgaggacacggtagatatcattgtgtgccacctcggggggggtttatttgactctggggg ccaggcacccctggtcacgctctctcag
144		cad ligera nuc	cagtgccctgaatcagcctcgctcagtgctcgggtctcctggacagtcagtcctcatctcctgc actggctccagcagtgatgttggtggttatgagttgtctcctggtaaccaacaccacccaggcaa agccccaaactcataatttatgatgtcgataaagcggccctcagggtccctgatcgcttctctgg ctccaggtctggcgacacggcctccctgaccatctctgggtccaggctcaggatgaggctgatt attactgctactcatctgcagacacctgggtctctcggcgaggaggaaccaagctcactgtcctag GGFTSSYY VYVGEST AREVDKRGFDY QSVSGGY GAS QQYGRITPLT ggtgcttcaaccagtagttattat gtgtattacggtgaaagtacc gogagagaagtggataaacgggggctttgactac cagagtgtagcggcggttac gggtcatcc cagcagtatgttaggacacccgctcact
145	8J16	CDRH1 aa	
146		CDRH2 aa	
147		CDRH3 aa	
148		CDRL1 aa	
149		CDRL2 aa	
150		CDRL3 aa	
151		CDRH1 nuc	
152		CDRH2 nuc	
153		CDRH3 nuc	
154		CDRL1 nuc	
155		CDRL2 nuc	
156		CDRL3 nuc	

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
157		cad pesada aa	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCSVSGGFTSSYYWSWIRQAPGKGLEWIGYVY YGESTDYNPSLKSRAISIDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREVDKRGFDY WGQALVTVSS
158		cad ligera aa	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSGGYLAWYQQEPGQAPRLVIYGAS SRATGIPDRFSASGSGTDFTLTIITRIPEPDAVYYCQYQYGRTPLTFGGGTKVEI K
159		cad pesada nuc	cagggtcagctgcaggagtcggggcccgagactgggtgaagccttcggagaccctgtccctcacct gcagtgctcttggtggcttcaccagtagttattatggagttggatccggcagggcccccgggaag ggactggagtggtggtctatgtgtattacgggtgaagtagcattacaacccctccctcaagag tcgagccaccatatcaatagacacgtccaagaacaaattctccctgaagctgagctctgtgaccg ctgcggacacggcctctattattgtgtagagagaagtggtgataaacgggggctttgactactggggg ccaggagagccctgggtcacggtctcctcag
160		cad ligera nuc	gaaattgtgtgacgcagctccaggcacctctattgtctccaggggaaagagccaccctctc ctgcagggccagtcagagtgtagcggttagcttagcttgtagccagcaggaacctggccag gctcccaggctcgtcatctatggtgcatccagcagggccactggcatccagacaggttcagtg cagtggtctgggacagactcactcaccatcaccagactggagccagaagatttgcagtg attactgtcagcagtagtggttagacacgcgtcacttcggtcggaggggaccaaggtggagatcaa ac
161	7113	CDRH2 aa	ISYDASSK
162		CDRH3 aa	AKALRYLDWFLSDPFDY
163		CDRL1 aa	QSVSSDF
164		CDRL3 aa	QQAASPP
165		CDRH1 nuc	ggattcaccttcagtaactatggc
166		CDRH2 nuc	atatctatgatgcaagtagtaaa
167		CDRH3 nuc	gogaaagccctaog atatctgactggttccctcloggaaccccttcgactac
168		CDRL1 nuc	cag agttagtagcagcttc
169		CDRL3 nuc	cagcagtagtgcctcaacgccc
170		cad pesada aa	QVQLVESGGGVWQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWWVRQPGKGLEWVA VISYDASSKYTDSVQGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRGDTAVYYCAKALRY LDWFLSDPFDYWGGGTLTVSS

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
171		cad ligera aa	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSDFLAWYQQKPGQAPRLIYGAS SRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYVCQQYAAASPPFGQGTRLEIK
172		cad pesada nuc	caggtgcaactggtagtgctggggaggcggtgggtccagcctggagggtccctcagactctcct gtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcatgctgggtccgcccagggtccaggcaag gggctggagtggtggcagttatcttatgatgcaagtagtaatactatacagactccgtgca gggcccattaccatctccagagacaattccaagaacacactgtttctgcaaatgaacagcctg agaggtgaagacacggctgtattactgtgcgaaagccctacgatatcttgactggttcctctc ggacccctcgactactggggccagggaaccctggtaaccgtctcctcag
173		cad ligera nuc	gaaattgtgtgacgagctctccaggcacctgtcttctccaggsgaaagagccacccctctcc tgcaggggccagtcagagtgtagtagcacttcttagcctgggtaccagcagaaacctggccagg ctcccaggctcctcatctatgggtgcatccagcaggccactggcatccagacagggtcagtggc agtggtctgggacagacttactctcaccatcagcagcctggagcctgaagattttgagctcta ttactgtcagcagtagtgcctcaccgcccctcgggccaagggaacagactggagattaaac GFTFSSDG ISSDGSTP AKDWALFRWLRTFDH QSVGIN QQYNDWPPWT ggattcaacctcagtagogacggc atatcatdgaoggaagtaactcca gcaaaagattgggcattatttcggggctaogaaaccttggatcat cag agtgttgccatcaat caacaataataatgactggccctcogtggagc LVELVESGGGVVQPGRLSLRSLCAASGFTSSDGMHWRQSPGRGLEWVAF ISSDGSTPYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAMYFCAKDWAL FRWLRTFDHWGQGLTVVSS ETVMTQSPATLSVSPGGRATLSRASQSVGINLAWYQQKPGQAPRLIYG STRASGFPARFSGSGGTFTLTITSLQSEDFAVYVCQQYNDWPPWTFGQG TKVEIK
174	8I21	CDRH1 aa	
175		CDRH2 aa	
176		CDRH3 aa	
177		CDRL1 aa	
178		CDRL3 aa	
179		CDRH1 nuc	
180		CDRH2 nuc	
181		CDRH3 nuc	
182		CDRL1 nuc	
183		CDRL3 nuc	
184		cad pesada aa	
185		cad ligera aa	

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
186		cad pesada nuc	ctggtggaactgggtggagctcggggggaggcgtgggtccagcctggggagggtccctgagactctcct gtgcagcctctggattcaccttcagtagcgacggcagcatgcactgggtccgagagtcaggcag ggggctggaatgggtggcctttatatcatctgacggaagtactccatactatgctgactccgtga agggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacactgtatctgcaaatgaacagcct cagagctgaggacacgggctatgtacttctgtgccaaagattgggcattatttcggtgggtacgaa cctttgatcattggggccagggaaccctgggtcacccgtctctcag
187		cad ligera nuc	gaaacgggtgatgacgagctccagccacccctgtctgtgtctcctgggggaagagccacccctc ctgcaggccagtcagagtggtggcatcaatttagcctggtagcagcagaaacctggccaggct ccaggctcctcatctatgggtgcataccaggccctctggtttccagcaggttcagtggcagt gggtctgggacagagttcactctcaccatcaccagcctgcagctgaagattttgcagctctattac tgtcaacaataataatgactggcctcctcgtagcgttcggcctcagggaaccaaagggtggagatcaaac GYSFTNYW IYPGDSDI ARHAIRGDFDY KLGEKY QDT QAWDTNTVI ggatacagcttaaccaactctgg atctatcctgggtgactgatac gagagacatgcaatacaggagatgggtttgactac aaatgggggaaaaaac caagatac cagggtgggacaccaacatgata EVQLVQSGAEVKKPKGESLKISQASGYSFTNYWIAWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDSDIKYSFRRGQVTISADKISNAFLQWRSLRASDTAMYYCARHAIRG DGFYWGQGTLVTVSS SYELTQPPSVSPGQTATITCSGDKLGEKYACWYQKPGQSPVLVYMQDT KRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTRAMDEADYYCOAWDNTVIFGGTKL TVL
188	15D8	CDRH1 aa	
189		CDRH2 aa	
190		CDRH3 aa	
191		CDRL1 aa	
192		CDRL2 aa	
193		CDRL3 aa	
194		CDRH1 nuc	
195		CDRH2 nuc	
196		CDRH3 nuc	
197		CDRL1 nuc	
198		CDRL2 nuc	
199		CDRL3 nuc	
200		cad pesada aa	
201		cad ligera aa	

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
202		cad pesada nuc	gagggtgcagctgggtcagctcgtggagcagaagtgaataaaagcccgaggagctctctgaagatctcc tgtcaggcttctggatatacagctttaccactactggatcgctgggtgcgccagatgccgggaa aggcctggagtggtgggcatcatctcctgggtgactctgatatcaatacagcccgctcctcc gaggccaggtcaccatctcagccgacaagtcacatcagtaatgccttctcctcagtggaagcct gagggcctcggacacgcctatgtattactgtgcgagacatgcaatacagagagatgggtttgac tactgggcccagggaacccctggtcaccgtctcctcag
203		cad ligera nuc	tcctatgagctgactcagccacccctcagtcgtcgtgtcccaggacagacacacatcacctg ctctggagataaattgggggaaaaatacgttgcgttggtatcagcagaagccaggccagtcctcc gttttggtcatgtatcaagatacgaagcggccctcagggatccctgagcgttcttggtctcaa ctctgggaacacagccactctgacatcagcgggacccgggctatggatgaagctgactattac tgtcaggcgtgggacaccaaactgtgatattcggcggagggaaccaagctgaccgtcctcag IYPGDSDT
204		CDRH2 aa var 1	GRHAIRGDGFDY
205		CDRH3 aa var 1	atctatcctggtagctdgatacc
206		CDRH2 nuc var 1	gggagacatgcaataagaggagatgggtttgactac
207		CDRH3 nuc var 2	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISQASGYFTNYYIAWVRQMPGKGLEWMGI
208		cad pesada aa var 1	IYPGDSDTKYSFSGQVTISADKSIATAFLQWRSRASDTAMYYCGRHAIRG DGFYWGQGTLTVSS
209		cad pesada nuc var 1	gagggtgcagctgggtcagctcgtggagcagaagtgaataaaagcccgaggagctctctgaagatctcc tgtcaggcttctggatatacagctttaccactactggatcgctgggtgcgccagatgccgggaa aggcctggagtggtgggcatcatctcctgggtgactctgatatcaatacagcccgctcctcc gaggccagggtcaccatctcagccgacaagtcacatcagtcactgccttctcctcagtggaagcctg agggcctcggacaccccatgtattactgtgggagacatgcaatacagagagatgggtttgact actgggcccagggaacccctggtcaccgtctcctcag ERHAIRGDGFDY
210		CDRH3 aa var 2	gagagacatgcaataagaggagatgggtttgactac
211		CDRH3 nuc var 2	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISQASGYFTNYYIAWVRQMPGKGLEWMGI
212		cad pesada aa var 2	IYPGDSDTKYSFSGQVTISADKSIATAFLQWRSRASDTAMYYCERHAIRG DGFYWGQGTLTVSS

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
213		cad ligera aa var 2	SYVLTQPPSVSPVSPGQTATITCSGDKLGEKYACWYQQKPGQSPVLVLMYQDT KRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTRAMDEADYYCQAWDTNTVIFGGGTKL TVL
214		cad pesada nuc var 2	gagggtcagctgggtcagctgggagcagaagtgaaaaagccggggagtcctcgaagatctcc tgtcaggcttctggatacagctttaccactactggatcgccctgggtgcgccagatgccgggaa aggcctggagtggtgggcatcatctatcctggtagctctgataccaatacacgcccgtcttcc gaggccagggtcacatctcagccgacaagtcacatcagtagctcctcctcagtgggcgaagcctg aggccctggacaccccatgtattactgtgagagacatgcaatacgaggagatggggttgact actggggccagggaacccctggtcaccgtctctctcag
215		cad ligera nuc var 2	tcctatgtctgactcagccaccctcagtgctcgtgtcccgaggacagacagccaccatcacctg ctctggagataaattgggggaaaaatacgttctgtgtatcagcagaagccaggccagtcctcct gtttgtcatgtatcaagatacgaagcgccctcagggatccctgagcgattctctggctccaa ctctgggaacacagccactctgaccatcagcgggacccgggctatggatgaagctgactattac tgtcaggctgggacaccaaactgtgatattcggcggaggagaccaaagctgaccgtctctag GYFTFTNY IHPSSGGT GRAFRILGLSDVFNND QGINNY AAS QKYNAPFT ggatacaccttcaocaaactactat atocacccctagtagtggtggcaca gggagagccttggatctgggaacttggatgtcttggtaatgac cagggcattacaactat gdgcatcc caaaagtataacagtgccccctcact QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYIHVVQRAPGQGLEWMG IHPSSGGTSAQKFKQGRVTMTTRDTSTSTVSMDLSSLRSEDTAVYCGRAFRI LGLSDVFNNDWGQGTVTVSS DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGINNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAAS TLQSGVPSRFRSGSGGTAFTLTILSLQPEDVATYCYQKYNAPFTFGPGTKVDI K
216	13H11	CDRH1 aa	
217		CDRH2 aa	
218		CDRH3 aa	
219		CDRL1 aa	
220		CDRL2 aa	
221		CDRL3 aa	
222		CDRH1 nuc	
223		CDRH2 nuc	
224		CDRH3 nuc	
225		CDRL1 nuc	
226		CDRL2 nuc	
227		CDRL3 nuc	
228		cad pesada aa	
229		cad ligera aa	

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
230		cad pesada nuc	cagggtcagttggtgagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaaggtttcct gcaaggcatctggatacaccttcaccaactactatatacactgggtgacagggccctggaca aggacttgagtggtggatgggaataatccaccctagtagtggtggcacaagctacgcacagaagttc cagggcagagtcaccatgaccaggagacagtcacagagcacagtttccatggacctgagcagc ctgagatctgaagacacggcggtatattactgtgggagagccttcggatcttgggactttcggat gtcttgttaatgactggggccagggaactgtggtcaccgtctcctcag gacatccagatgaccagtcctcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcacatcac ttgccgggcgagtcagggcattacaattatttagcctgggtatcagcagaaaccagggaagt cctaagctcctgatctatgctgcatccacattgcaatcaggggtccatctcggttcagtggcagt ggatctgggacagcttccaccctcaccatcctcagcctgagcctgaagatgttgcaactattac tgtcaaaaagtataacagtgcccccttcactttcggccctgggaccaaagtgagacatcaaac GFTFTSSA IVLGSNT AADRGRGGYNVYTY QTISNTY QQNGQSPWT ggattcaaccttadagctgct atogtctctggcaggglaacaca gaggcagatagggtagaggaggatatacatatcattac cagactatagtaacacctac cagcagaatggtcagtcacctggacg QMLVQSGPQVKPGTSVKVSKASGFTFTSSAMQWVRQARGQRPEWI GWIVLGSNTNYAQKFQERVTLTRDMSTATAYMELSLRSEDVAVYYCAAD RGRGGYNVYTYWGQGLVAVSS EIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQTISNTYVAWYQQKPGQAPRLIYGAS SRATGIPDRFSGSGTDFTLTIRLEPEDFAVYYCQQNGQSPWTFGQGTN VEIK
231		cad ligera nuc	
232	11B12	CDRH1 aa	
233		CDRH2 aa	
234		CDRH3 aa	
235		CDRL1 aa	
236		CDRL3 aa	
237		CDRH1 nuc	
238		CDRH2 nuc	
239		CDRH3 nuc	
240		CDRL1 nuc	
241		CDRL3 nuc	
242		cad pesada aa	
243		cad ligera aa	

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
244		cad pesada nuc	caaatgcagctggtgcagctctgggcctcaagtgaagaagcctgggacctcagtgaaaggtctctct gcaaggcttctggattcacctttactagctctgctatgcagtggtgctggcaggctcgtggacag cgcctgagtgataggatggatcgctccttggcagcggttaacacaaactacgcacagaagtcc aggaagagtcaccccttaccaggacatgtccactgctacagcctacatggaaactgagcagcct gagatcgaggacacggccgtgtattactgtgcggcagatagggttagagggtggatacaatgt atacacttactggggccaggggaccctggtcgcgtctcctcag gaattgtgatgacgcagctccaggaccctgtcttctcaggggaaagagccacctctc ctgcaggggcagtcagactattagtaacacctaactgtggcctggtaaccagcagaacctggccag gctccagggtcctcatctatgtgtgcacccagcaggggccactggcatccacagacaggttcagtg cagtggtctgggacagacttcaactcaccatccgagactggagcctgaagattttgcagtgt attactgcagcagaatggtcagtcaccttggacgttcgggccaagggaacacgtgggaaatcaa ac
245		cad ligera nuc	GYTFGGY INPMTGAT ARGGPTSTRITGKRHFDL ISDV/GAYNS DVT SSYTTSDTYV ggatacaccttcaacggctactat atcaaccdtatgagdgagaccaca gogagaggaggtcctaccagtaacccaataaacagggaaaagggcadtogatctc atcagtgacgttggtgttataadct gacgtcad agctcatatacaaccagtgaacattatgtc RAQLVQSAAEMKNPGLSVKVSCEASGYTFTGYVHWMRQAPGQGLEWM GWINPMTGATKSPQKFQGRVTMTRDTSTTATHIELTRLRSDSVAFFCARG GPTSTRITGKRHFDLWGRGLITVAS QSALTQPASVSGSPGESITISCTGTISDV/GAYNSVSWYQQHSGTAPELIYDVT NRPAGVSSRFSGSKSGNTASLTISWLQSEDEAEYCYSSYTTSDTYVFGSGTQV TVL
246	3G16	CDRH1 aa	
247		CDRH2 aa	
248		CDRH3 aa	
249		CDRL1 aa	
250		CDRL2 aa	
251		CDRL3 aa	
252		CDRH1 nuc	
253		CDRH2 nuc	
254		CDRH3 nuc	
255		CDRL1 nuc	
256		CDRL2 nuc	
257		CDRL3 nuc	
258		cad pesada aa	
259		cad ligera aa	

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
260		cad pesada nuc	cggcgccagttggtgcagtcgtcggtgagatgaagaacccctggggcctcagtagggtctctcct gagagcttcttggtatataccttcacgggtactatgtacactggatgcgacagggccccgggaca aggactagagtggtggatggatcaaccctatgactggagccacaagttccacagaagttt cagggcaggggtcaccatgaccaggacacttcaccacccgcaacccacatagaactgactagg ctgagatctgacgacagtcggtctttttctgtgagaggaggtctaccagtagccgaataaac agggaacgggcacttcgatctctggggcggcgacccctgatcactgtgcctcag cagtcgtccctgactcagcctgcctcgtgtctgggtctcctggagagtcgatcaccatctcctgc actggaaccatcagtgacgttggtgcttataactctgtctctgtgtaccacaacactcaggcac agccccggaactcatcttattgatcgtcactaatcggtcccgagggtttcgagtcgtctctggg ctcaagtcgtggcaacacggcctcctgaccatctctggctcagtcgtgaggacgaggctgaat attattgcagctcatatacaaccagtgacacttatgtcttcggaaagtgggaccacaagtcaccgtc ctaa GFTVSTTY IHTGGIFGVGGT AREHRTIDAFDA QNIRNY TTS QQSYDGWT ggattcaacgtcagtaaccactac attcatacgggtggcattttggtggtggcggtaaca gagagggaacatcggtgggaactatogatgcttttgatgccc cagaacattogaaattat adacatcc caacagagttacgatgggtggaag EVRLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSTTYMAWVVRQAPGKLEWVSLI HTGGIFGVGGTSYADSVKGRFTISRDTSKNTVSLQMSSLRVEDTAIFYCAREH RGTDADFADAWGQGTVIVSS DIHMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQNIIRNYLNWYQHPGKAPKLLIYTSR LQSGVPSRFSFGSGGTDFLTITVNSLQPEDFASYCQQSYDGTGWTGQGTKE MK
261		cad ligera nuc	
262	6L3	CDRH1 aa	
263		CDRH2 aa	
264		CDRH3 aa	
265		CDRL1 aa	
266		CDRL2 aa	
267		CDRL3 aa	
268		CDRH1 nuc	
269		CDRH2 nuc	
270		CDRH3 nuc	
271		CDRL1 nuc	
272		CDRL2 nuc	
273		CDRL3 nuc	
274		cad pesada aa	
275		cad ligera aa	

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
276		cad pesada nuc	gaggtagcactggaggagctctggggaggcttggtccagctcagctggggggtccttgagactctct gtgcagcctctggattcacggtcagtagccacctacatggcctgggtccgagggtccagggtccaggaa ggggctggaatgggtctcactattcataccggtaggcatctttggcggttggtacatcctacgc agactcgtgaaggcagattcaccatctccagagacacttccagaacacacagtgctctctcaa atgagcagcctgagagtcgaggacacggccatctattctgtgagagggaacatcgggggaacta tcgatgcttttgatgctggggcgaaggacagtggtcgtctctcag
277		cad ligera nuc	gacatcacatgaccagtcctcctcctcctgctgctgcatctgttggagacagagtcaccatcact tgcggggcaagtcagaacattcgaaattattttaatttggtatcaacataaaccagggaagccc ctaaactcgtatctatactacatccgctctgcaagtggggtcccatcaagggtcagtgggcagt ggatcggggacagatttcactctcaccgtcaacagcctgcaaccagaagactttgcaagtacta ctgtcaacagagttacgtaggggtggacgttcggccaggggaccagggtggaaatgaaac
278	5F1	CDRH1 aa	GTFSSYE
279		CDRH2 aa	IDFTGSTI
280		CDRH3 aa	VRDAGRWGTSWYYFDY
281		CDRL1 aa	SSNIGAGYD
282		CDRL2 aa	GNN
283		CDRL3 aa	QSYDSSLNGWV
284		CDRH1 nuc	ggattcatttcagtagdtag
285		CDRH2 nuc	attgattttactggdcaaccatc
286		CDRH3 nuc	gtgagagatgagggcogtggggcaccagttggtactacttgaclat
287		CDRL1 nuc	agctccaacatcggggcagggtatgat
288		CDRL2 nuc	gglacaac
289		CDRL3 nuc	cagtgtatgacagcagcdgaatgttggtg
290		cad pesada aa	AVQLVESGGGLAQPGRSLRLSCKVSGFTSSYEMNNVVRQAPGKGLEWIAVI DFTGSTIYYADSVKGRFTISRDTARNSLYLQMNKLRVEDTAVYVCVRDAGR GTSWYYFDYWGGTLTVSS
291		cad ligera aa	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGLSSNIGAGYDIHWYQQIPGKAPKLLIYGN NNRPSGVPDRFSGSKSGTSVSLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLNGWVFGG GTRLTVL

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
292		cad pesada nuc	gcggtgagctggtagctctggggcggttgccacagcctggagcggctccctgaggctctcgtgt gtaaagtgtctggattcactttcagtagctatgagatgaactgggtccgaggctccagggaag gggctggagtgattgcatacattgattttactggctcaaccatctactacgcagactctgtgaag ggacgattcaccatttcagagacacccagggaactcactctatctgcagatgaacaaattga gagtcgaggacacggctgtttactgtgtgagagatggggccgttggggcaccagttggttac tactttgactattggggccagggaacccctggtcacgtctcctcag
293		cad ligera nuc	cagtcgtgctgacgcagcgcctcagtgctctggggcccgaggcagagggtcaccatctcctg cacitgggctcagctccaacatcggggcagggttatgatatatacactgggtatcagcagattccagga aaagcccccacaaactcctcactatgtgtaacaaacatcgccctcaggggtccctgaccgattctc tggtctaaagtctggcacctcagtcctcctggccatcactgggctccaggctgaggatgaggctg atttactgcccagtcgtatgacagcagcctgaatgggtgggtgttcggcgaggaggaccaggttg accgtcctaa
294		cad pesada aa var 1	AVQLVESGGDLAQPGRLRLSCKVSGFTFSYEMNWRQAPGKGLEWIAIYI DFTGSTIYYADSVKGRFTISRDTARNISLYLQMNKLKRVEDTAVYYCVRDAGR GTSWYYFDYWGGTLTVSS
295		cad pesada nuc var 1	gcggtgagctggtagctctggggcgacttgccacagcctggagcggctccctgaggctcctg gtaaagtgtctggattcactttcagtagctatgagatgaactgggtccgaggctccagggaag gggctggagtgattgcatacattgattttactggctcaaccatctactacgcagactctgtgaag ggacgattcaccatttcagagacacccagggaactcactctatctgcagatgaacaaattga gagtcgaggacacggctgtttactgtgtgagagatggggccgttggggcaccagttggttac tactttgactattggggccagggaacccctggtcacgtctcctcag
296	4H9.6	CDRH1 aa	GFTFSHE
297		CDRH2 aa	IDFTGSII
298		CDRH3 aa	ARDGGRWGTSWYYFDY
299		CDRL1 aa	SSNFGAGYD
300		CDRL2 aa	GS
301		CDRL3 aa	QSYDSSL SAWV
302		CDRH1 nuc	ggattcaccttcagttctcatgag
303		CDRH2 nuc	attgattttactggcagttatata
304		CDRH3 nuc	ggcagagatgggggtcgttggggcaccagttggtactactttgatac
305		CDRL1 nuc	agttccaaacttggggcagggttatgat

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
306		CDRL2 nuc	ggtagc
307		CDRL3 nuc	cagtcctatgacagcagcctgagcgttggtg
308		cad pesada aa	AVQLVESGGGLVPRPGSLRLSCAASGFTSSHEMHWRQAPGKGLEWLSYI DFTGSIYYADSVRGRFTISRDN TKSLFLQMNSLRDEDTALYYCARDGGRW GTSWYYFDYWGGQVLVTSS
309		cad ligera aa	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTITCTGSSNFGAGYDGHWYQLPGTAPKLLIY GSNRP SGVPDRFSGSKGTSVSLAITGLQADDEADYWCQSYDSSL SAWVFGG GTKLTVL
310		cad pesada nuc	gcggtcagctggtagctggggaggcttggtacggcctggagggtccctgagactctcct gtgcagcctctgggtcaccttcagttctcatgagatgcactgggtccgccaggtccagggaag gggtgggaatggctttcatatcattgattttactggcagctattatatactacgcagactctgtgagg ggtcggttcaccatctccagagacaacacaaaagtcactgtttctgcaaatgaacagcctga gagacgaggatacggctctttattactgtgcgagagatgggggtcgttggggcaccagttggta ctactttgactactggggccaggagtcctggtcacgcctctctctcag
311		cad ligera nuc	cagtcgtgtctgacgcagcgcctcagtgctggggcccccaggaggcagagggtcaccataacct gcactggggagcagttccaaactcggggcaggttatgtagacactgggtaccagcaactccagg aacagcccccacactcctcatctatggtagcaatcgccctcagggggtccctgaccgattctctg gctccaaagtctggcacctcagtcctcctggccatcactgggtccaggctgacgatgaggctgat tattactgccagtcctatgacagcagcctgagcgttgagggtgttcggcggaggggaccacagctgac cgtctctac
312		CDRH2aa var 1	IDFTGSSI
313		CDRH2 nuc var 1	atgattttactggcagtaglata
314		cad pesada aa var 1	AVQLVESGGGLVPRPGSLRLSCAASGFTSSHEMHWRQAPGKGLEWLSYI DFTGSIYYADSVRGRFTISRDN TKSLFLQMNSLRDEDTALYYCARDGGRW GTSWYYFDYWGGQVLVTSS
315		cad pesada nuc var 1	gcggtcagctggtagctggggaggcttggtacggcctggagggtccctgagactctcct gtgcagcctctgggtcaccttcagttctcatgagatgcactgggtccgccaggtccagggaag gggtgggaatggctttcatatcattgattttactggcagtagtatatactacgcagactctgtgagg ggtcggttcaccatctccagagacaataccaaaagtcactgtttctgcaaatgaacagcctga gagacgaggatacggctctttattactgtgcgagagatgggggtcgttggggcaccagttggta ctactttgactactggggccaggagtcctggtcacgcctctctcctcag

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
316	7H3	CDRH1 aa	GYTFDYY
317		CDRH2 aa	FNPNSSGT
318		CDRH3 aa	AKDSAKTASAYYGLNFFYYGMDV
319		CDRL1 aa	SSNIGKNY
320		CDRL2 aa	KNN
321		CDRL3 aa	SAWDGSLSRPL
322		CDRH1 nuc	ggatacacatcaccgactactat
323		CDRH2 nuc	ttcaacccdaacagtggtggcaca
324		CDRH3 nuc	gcgaaagattccgcgaaaactcgagtgcttattatggactgaacttcttactacggtatgga cgtc
325		CDRL1 nuc	agttccaaacatoggaaagaattat
326		CDRL2 nuc	aagaataat
327		CDRL3 nuc	tcagcgtggatggcagcctgagtgctcacta
328		cad pesada aa	QVQLVQSGAEVKNPGLASVKVCKASGYTFDYIHVVVRQAPGQGLEWMG WFNPNSGGTNFVQNFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSLRSDDTAMYYCAKD SAKTASAYYGLNFFYYGMDVWGQGTTVTVSS
329		cad ligera aa	QSVLSQPPASGTPGQRVTISCSGSSNIGKNYVYVYQQVPGTAPKLLMFK NNQRPSPGVPDRFSGSKGTSAISLRSLEADYYCSAWDGSLSRPLFGG GTKVTVL
330		cad pesada nuc	caggtcagctggtgcagctcggggctgaagtaagaaacctggggcctcagtgaggctcct gcaaggctctggatacaccttcaccgactactatatacacctgggtcgacagggccctggaca aggacttgagtggtggctggttcaacctaaacagtggtgggacaaacttgtaacagaacttc aggcagggtcaccatgaccaggagacagtcacatcagcacagcctacatggagctcagcaggc tgagatctgacgacacgggcatgtattactgtgcgaaagattcgcgaaaaactgcgagtgcttat tatggactgaacttcttactacggtatggacgtcgggggccaaggggaccacgggtcacgcgtc ctcag

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
331		cad ligera nuc	<p>cagctgtactgagtcagccacccctcagcatctgggacccccgggagagggcaccatctcttgg ttctgggaagcagttccaacatcggaagaattatgtattgtgtaccagcaggtccagggaacg gccccaaaactcctcatgtttaagaataatcagcgaccctcaggggtccctgacgattctctgg ctcaagcttgggcacctctgcctccctggccatcagtgggctcgggtccgaggtgaggtgatt attattgttcagcgtgggagtgccagcctgagtcgtccactattcggcggagggaaccaaggtagcc gtccttag</p>
332		CDRH3 aa var 1	ARDSAKTASAYYGLNFFYYGMDV
333		CDRH3 nuc var 1	gcgagagattccgcgaaaaactgcgagtgcttattatggactgaacttcttactacggtatgga cgtc
334		cad pesada aa var 1	<p>QVQLVQSGAEVKNPGASVKVSKASGYTFTDYYIHVVVRQAPGQGLEWVMG WFNPNSGGTNFVQNFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRLSDDTAMYYCAR DSAKTASAYYGLNFFYYGMDVWVGQTTVTSS</p>
335		cad pesada nuc var 1	<p>caggtgcagctgggtcagctggggtgaagtgaaagaaacccctggggcctcagtgaaaggtctcct gcaaggcttctggatacaccttcacgcgactactatacactgggtgacagggccctggaca aggacttgagtggtgggtgggttcaacccaaacagtggtggcacaactttgtacagaacttc agggcagggtcaccatgaccaggacacgtccatcagcacagcctacatggagctcagcagggc tgagatctgacgacacggccatgtattactgtgcgagagattccgcgaaaactgagtgcttat tatggactgaacttcttactacggtatggacgtctggggccaagggaaccacgggtcacccgtctc ctcag</p>
336	6B4	CDRH1 aa	GFRFNEFN
337		CDRH2 aa	ISIDGRHK
338		CDRH3 aa	VTDGKAVDGFSGILEF
339		CDRL1 aa	QSVGGY
340		CDRL2 aa	DAS
341		CDRL3 aa	QQRNNWPPLT
342		CDRH1 nuc	ggattcaggttcaatgaatttaaat
343		CDRH2 nuc	atdcaatigatggagacacaaa
344		CDRH3 nuc	gtgacagatggaaaagcagtggaagggttttcoggaatttttagagttc
345		CDRL1 nuc	cagagtggtggcggtac
346		CDRL2 nuc	gatgcaccc
347		CDRL3 nuc	cagcagcgtacaaacagggccaccactcadt

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
348		cad pesada aa	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFRFNEFNMHWVRQAPGKGLEWVA VISIDGRHKYNADSVGEGRFTISRDNRSNTLYLQMNSLRVEDTALVYCVTDGK AVDGFSGILEFWGQGTPVTST</p>
349		cad ligera aa	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCWASQSVGYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASI RATGIPARFSGSGGTHFTLTINSLEPEDFAVYVCQQRNWPPLTFGGGTKV EIK</p>
350		cad pesada nuc	<p>cagggtcaactggtggagtgctgggggagcggtgtccagcctgggagggtccctgagactctct gtgcagcctctggattcaggttcaatgaatttaatatgcactgggtccgccaggctccaggcaag ggcctggagtggtggcagttatctcaattgatgggagacacaaatacaacgcagactccgtgg agggcgattcaccatctccagagacaattccagaaaacacttttatctgcaaatgaacagcctg agagttgaggacacggctctttattactgtgtgacagatgggaaagcagtggtgggttttcggg aattttagagttctggggccagggaacccagtcacgctctccacag</p>
351		cad ligera nuc	<p>gaaattgtgtgacacagctccggccacctgtcttctccaggggagagagccacctctct tgctgggccagtcagagtggtggcggtacttagcctggtaccacaaaacctggccaggctc ccaggctctcatctatgatgcataccatcaggggccactggcatccagccaggttcagtggcagt gggtctgggacacacttcactctcaccatcaatagcctcagagctgaagatttgcggtttattac tgtcagcagcgtaacaactggccaccactcacttctggcggaggggaccaaggtggagatcaaa c</p>
352	10C6	CDRH1 aa	GFSFSNFE
353		CDRH1 nuc	ggattcagtttcaglaadttag
354		CDRH2 nuc	attgattttactggctaccatc
355		CDRH3 nuc	gtgagagatgcgggcggttggggcaccagttggtactattttgadat
356		CDRL3 nuc	cagtcataatgacagcagcctgaatggtgggtg
357		cad pesada aa	<p>AVQLVESGGGLAQPGRSLRLSCKVGSFNSFNMWVRQAPGKGLEWYAI DFTGSTIYSDSVKGRFTISRDTARNSLYQMINKLRVEDTAVYCVRDAGRW GTSWYFFDYWGQGLTVTVSS</p>

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
358		cad pesada nuc	gcggtcagctgggtggaatccggggcggttgccacagcctggacggctccctgaggctctcgtgt gtaagtgccggattcagtttcagtaactttgagatgaactgggtccgccggctccagggaag gggctggagtggtgattgcataattgattttactggtctaccatctactactcagactctgtgaag ggacggtttaccatttcagagacacggccaggaaactcactctatctcagatgaacaaattga gagtcgaggacacggctgtttattactgtgagagatgaggcggttggggcaccagttggtac tatttgactattggggcagggaacccctggtcacgcgtctctcag
359		cad ligera nuc	Cagtctgtgtgacgcagcgcctcagtgctggtggggcccccaggagagggtcaccatctct gcactgggtcagctcaacatcggggcagggttatgatatacatctggtatcagcagattccagg aaaagcccccactcctcatctatggttaacaaatcgccctcaggggctccctgaccgattct ctggcttaagtctggcacctcagctcctcctggccatcactgggtcaggctgaggatgaggct gattattactgcagtcataatgacagcagcctgaatggttgggtgttcggcggagggaaccaggtt gaccgtcctaa GFTGSEYE QSYDNSLNGWV ggattcacctcgggaagctatgaa attgactttacgtgttcacacac gtgagagatgctgggtccgctggggcaccagttggtattactttgadat ggcaacaaac cagtcctatgacaacagcctggaatggttgggtg AVRLVESGGGLAQPGRLSLRSCQVSGFTGSEYEMNWNVRQAPGKGLEWIAIY DFTGSTIYYADSVKGRFTISRNTARNSLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDAGR GTSWYFDYWGQGTRVTVSP QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGISSNIGAGYDIHWYQQIPGKAPKLLVYG NNRPSGVDPDRFSGSKGTSVSLAITGLQVEDEADYYCQSYDNSLNGWVFG GGRLTLTVL gcggtgcggctgggtgagctcgggggagggttgccacagcctggacggtccctgagactctcgt gtcaagtgtctggattcaccttcggaagctatgaaatgaactgggtccgccaggctccggcaa gggactggagtggtgctcctacattgactttactggttcaaccatctactacgagactctgtgaa gggctgattcaccatattcagaacacccagggaactcactctatctcagatgaacagcctg agagtcgaggacacggctgtttattactgtgagagatgaggcggtcgtggggcaccagttggt attactttgactattggggccaaggaaacccgggtcacgcgtctctcccccag
360	2B11	CDRH1 aa	
361		CDRL3 aa	
362		CDRH1 nuc	
363		CDRH2 nuc	
364		CDRH3 nuc	
365		CDRL2 nuc	
366		CDRL3 nuc	
367		cad pesada aa	
368		cad ligera aa	
369		cad pesada nuc	

SEQ ID	mAb	Descripción	Secuencia
370		cad ligera nuc	cagtctgtgtgacgcagcccgccctcagtgctgtggtggcccccagggcagagggtcaccatctcttg cacitgggatcagctccaacatcgggggcaggttatgatatacactgggtatcagcagattccaggga aaagcccccaaaactcctcgtctatggcaacaacaatcgggccctcaggaggtccctgaccgattctc tggcttaagtctggcacctcagctcctcggtggccatcactgggctccaggttgaggatgaggctg attattactggcagtcctatgacaacacagcctgaatgggtgggtgttcggcgggaggagaccagggttg accgtcctaa

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que es específico de una proteína del hCMV, gB, en el que el anticuerpo o fragmento

(a) comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 336, 337 y 338, respectivamente, y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 339, 340 y 341, respectivamente;

(b) comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 316, 317 y 318, respectivamente, y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 319, 320 y 321 respectivamente;

(c) comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 278, 279 y 280 respectivamente, y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 281, 282, y 283 respectivamente;

(d) comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 352, 279 y 280 respectivamente, y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 281, 282 y 283, respectivamente;

(e) comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 296, 297 y 298, respectivamente, y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 299, 300 y 301 respectivamente;

o

(f) comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 360, 279 y 280 respectivamente, y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 281, 282 y 361 respectivamente.

2. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, que comprende secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 348 y 349, respectivamente, SEQ ID NOs: 328 y 329, respectivamente, SEQ ID NOs: 290 y 291, respectivamente, SEQ ID NOs: 357 y 291, respectivamente, SEQ ID NOs: 308 y 309, respectivamente, o SEQ ID NOs: 367 y 368, respectivamente.

3. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monocatenario, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv.

4. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4, que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 342-347, 350, 351, 322-327, 330, 331, 284-289, 292, 293, 353-356, 358, 359, 287, 288, 302-307, 310, 311, 362-364, 287, 365, 366, 369 o 370 o una secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos codificada por una cualquiera de las SEQ ID NOs: 342-347, 350, 351, 322-327, 330, 331, 284-289, 292, 293, 353-356, 358, 359, 287, 288, 302-307, 310, 311, 362-364, 287, 365, 366, 369 o 370.

6. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 o 5.

7. Una célula transformada con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6.

8. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el ácido nucleico de la reivindicación 4 o 5, y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

9. La composición de la reivindicación 8, que comprende además un segundo anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que neutraliza la infección por hCMV.

10. La composición de la reivindicación 9 en la que dicho segundo anticuerpo o fragmento es específico de UL128, un epítipo formado por una combinación de UL130 y UL131A, un epítipo formado por una combinación de UL128, UL130 y UL131A, un epítipo formado por una combinación de gH, gL, UL128 y UL130, un segundo epítipo de gB, gH, gL, gM, gN, gO o un epítipo formado por una combinación de gM y gN.

11. La composición de la reivindicación 10, en la que dicho segundo anticuerpo es específico de un epítipo formado por una combinación de UL130 y UL131A.

12. La composición de la reivindicación 11, en la que dicho segundo anticuerpo se selecciona de:

(i) un anticuerpo que comprende secuencias de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NOs: 61 y 62, respectivamente;

- (ii) un anticuerpo que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 49, 50 y 51 respectivamente y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 52, 53 y 54 respectivamente;
- 5 (iii) un anticuerpo que comprende secuencias de la cadena pesada y ligera de la SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente;
- (iv) un anticuerpo que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 1, 2 y 3 respectivamente y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 4, 5 y 6 respectivamente;
- 10 (v) un anticuerpo que comprende secuencias de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NOs: 29 y 30, respectivamente;
- (vi) un anticuerpo que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 17, 18 y 19 respectivamente y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 20, 21 y 22 respectivamente;
- 15 (vii) un anticuerpo que comprende secuencias de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NOs: 45 y 46 respectivamente;
- (viii) un anticuerpo que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 33, 34 y 35 respectivamente y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 36, 37 y 38 respectivamente;
- 20 (ix) un anticuerpo que comprende secuencias de la cadena pesada y ligera de las SEQ ID NOs: 125 y 126, respectivamente; y
- (x) un anticuerpo que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 variables de la cadena pesada como se expone en las SEQ ID NOs: 113, 114 y 115 respectivamente y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera como se expone en las SEQ ID NOs: 116, 117 y 118 respectivamente.
- 25
13. Uso del anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el ácido nucleico de la reivindicación 4 o 5, o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la infección por hCMV.
- 30
14. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el ácido nucleico de la reivindicación 4 o 5, o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para su uso en el tratamiento de la infección por hCMV.
- 35
15. Un método para producir el anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende (i) cultivar la célula de la reivindicación 7 y (ii) aislar el anticuerpo o fragmento.

Figura 1

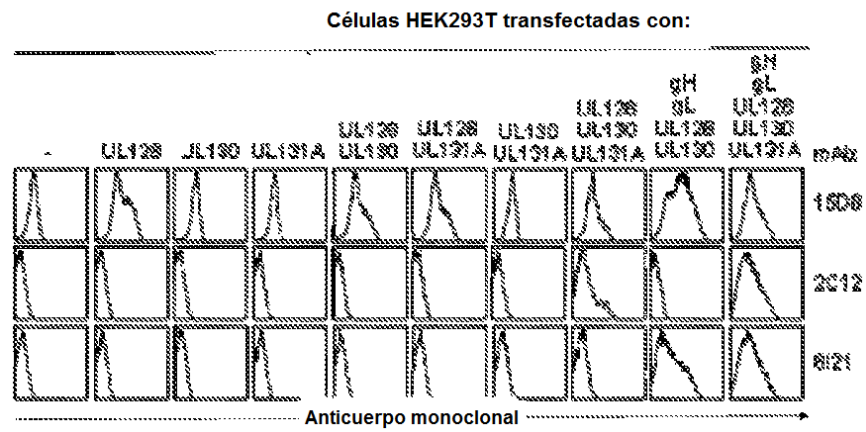


Figura 2

A

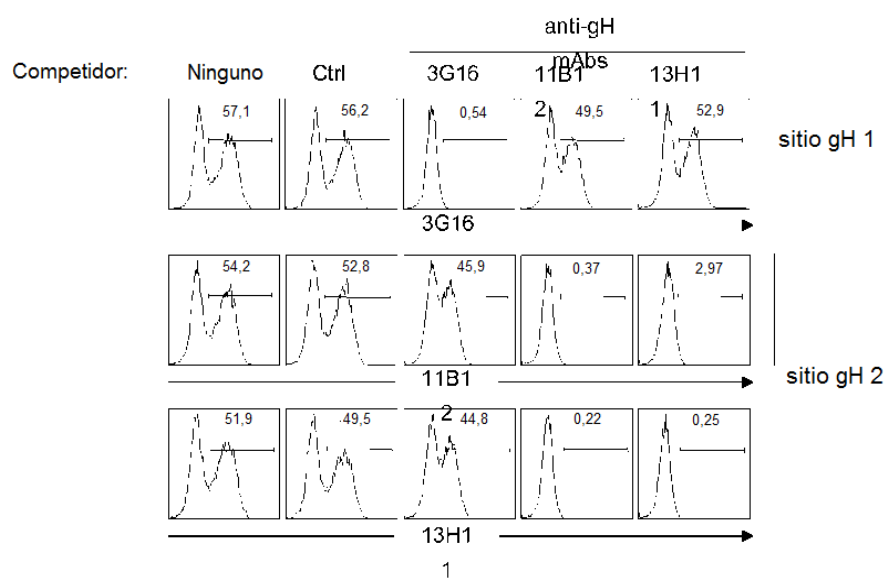
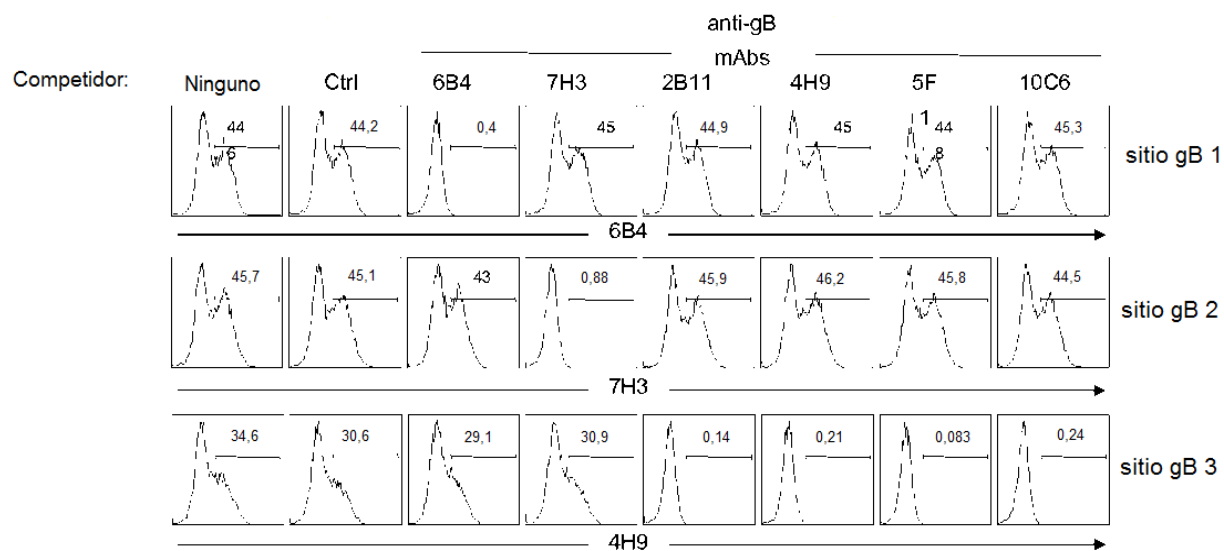
**B**

Figura 3

