



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 992**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07857724 .4**
96 Fecha de presentación : **17.12.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2126049**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.12.2009**

54 Título: **Anticuerpos frente a citomegalovirus humano (CMVH).**

30 Prioridad: **15.12.2006 PCT/EP2006/069780**
20.06.2007 EP 07110693

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.08.2011

73 Titular/es: **RIBOVAX BIOTECHNOLOGIES S.A.**
12, avenue des Morgines
1213 Petit-Lancy, Geneva, CH

72 Inventor/es: **Funaro, Ada;**
Gribaudo, Giorgio y
Landolfo, Santo

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 363 992 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 frente a citomegalovirus humano (CMVh)

5 Campo técnico

La invención se refiere a secuencias de anticuerpo novedosas aisladas de células B humanas que tienen actividades biológicas específicas para un virus que infecta células humanas.

10 Antecedentes de la invención

El citomegalovirus humano (CMVh) es un herpesvirus extendido, sumamente específico de especie, que provoca morbimortalidad significativa en individuos inmunosuprimidos o inmunológicamente inmaduros.

15 Varias revisiones recientes analizan la biología y manifestaciones clínicas de CMVh (Landolfo S *et al.*, 2003; Gandhi M y Khanna R, 2004; Soderberg-Naucler C, 2006a). Este patógeno viral infecta a la mayoría de la población en todo el mundo y se adquiere en la infancia, tras el contacto con un fluido corporal, puesto que el virus entra a través de células endoteliales y células epiteliales de los sistemas respiratorios o la parte superior del aparato digestivo, o a través del sistema genitourinario. La seropositividad a CMVh es más prevalente en países subdesarrollados o en zonas geográficas con menores ingresos.

20 Tras una infección primaria, CMVh puede persistir en células huésped específicas del linaje mieloide en un estado latente, replicándose y diseminándose en muchos tipos celulares diferentes (células hematopoyéticas, células epiteliales, células endoteliales o fibroblastos) y escapando del sistema inmunitario del huésped. La infección por CMVh es generalmente asintomática en personas sanas puesto que la infección por CMVh y su diseminación se mantiene bajo control por el sistema inmunitario, aunque raramente se logra la eliminación de CMVh total. De hecho, el virus CMVh ha desarrollado mecanismos eficaces que permiten que el genoma viral permanezca en sitios seleccionados en un estado latente.

25 Cualquier situación que debilite las funciones inmunitarias, tales como estados de estrés o tratamientos médicos específicos, pueden conducir a la reactivación de CMVh. Pueden producirse manifestaciones clínicas de CMVh (tales como retinitis, enterocolitis, neumonitis, gastritis o hepatitis) tras una infección primaria, reinfección o reactivación viral. Aproximadamente el 10% de los lactantes están infectados antes de los 6 meses de edad tras la transmisión procedente de sus madres a través de la placenta, durante el parto o mediante la lactancia.

30 El virión de CMVh consiste en una nucleocápsida icosaédrica que contiene un genoma de ADN bicatenario, de 230 kb de longitud, lineal. La expresión del genoma de CMVh está controlada por una cascada compleja de acontecimientos transcripcionales que conduce a la síntesis de más de 200 proteínas implicadas en una gran variedad de actividades biológicas implicadas en la infección, latencia y replicación viral (Britt W y Mach M, 1996).

35 Las proteínas estructurales forman la envuelta del virión que es extremadamente compleja y todavía no definida de manera completa. Incluye glicoproteínas que son homólogas de proteínas estructurales identificadas en otros herpesvirus y que pueden formar complejos proteicos unidos por puentes disulfuro dentro del virión: gC1 (que incluye sólo gB), gCII (que incluye gM y gN) y gCIII (que incluye gH, gL y gO). Los genes gB, gH y gN se han usado también para genotipar cepas de CMVh (Coquette A *et al.*, 2004; Dar L, 2007).

40 Las glicoproteínas gN y gM son las más abundantes y, junto con gH y gB, se ha mostrado que son esenciales para la interacción inicial entre la envuelta de CMVh y la superficie de la célula huésped, y en consecuencia para la producción de CMVh infeccioso. Por este motivo, compuestos que seleccionan como diana gB, gH, gN y/o gM pueden inhibir eficazmente la infección por CMVh bloqueando la entrada de viriones de CMVh circulantes en las células, tras la infección, reinfección o reactivación con CMVh.

45 El tratamiento de infecciones por CMVh es difícil debido a que hay muy pocas opciones terapéuticas disponibles. Los compuestos farmacológicos actualmente disponibles que inhiben la replicación viral (ganciclovir, cidofivir, foscamet, maribavir y otros fármacos en desarrollo) producen una mejora clínica significativa, pero pueden verse afectados por una escasa biodisponibilidad oral, baja potencia, la aparición de resistencia de CMVh (debido a mutaciones en las dianas virales) y toxicidades limitantes de la dosis (De Clercq E, 2003; Baldanti F y Gerna G, 2003; Gilbert C y Boivin G, 2005).

50 Se necesitan medios novedosos para prevenir y tratar la infección por CMVh, especialmente para individuos inmunocomprometidos, en situaciones de trasplante y en prevención prenatal. De hecho, CMVh es un patógeno oportunista clínicamente importante en pacientes con VIH y receptores de trasplantes de órganos, en los que contribuye a la pérdida del injerto independientemente del rechazo del injerto, dando como resultado morbimortalidad (Puius Y y Snyderman D, 2007). El creciente número de receptores de trasplantes de órganos sólidos y de médula ósea eleva la probabilidad de manifestaciones clínicas de CMVh, tales como retinitis por CMVh

(Wiegand T y Young L, 2006). Además, CMVh es la principal causa infecciosa de defectos de nacimiento (tales como pérdida de audición, desarrollo retardado o retraso mental) que se deben a una infección por CMVh perinatal o congénita transmitida por una madre infectada con CMVh (Griffiths P y Walter S, 2005).

5 Por tanto, es importante proporcionar fármacos para tratamientos universales específicos de CMVh profilácticos, preventivos, por ejemplo para la prevención de la enfermedad por CMVh en receptores de trasplantes (Hebart H y Einsele H, 2004; Kalil A *et al.*, 2005; Snyderman D, 2006), en pacientes que desarrollan neuropatologías relacionadas con CMVh (Griffiths P, 2004) o en embarazos de riesgo (Schleiss M, 2003), para prevenir la transmisión materno-filial y la infección por CMVh potencialmente mortal a fetos y neonatos.

10 Además, composiciones farmacéuticas frente a CMVh pueden ser útiles para el tratamiento de otras enfermedades más extendidas (tales como enfermedades cardiovasculares y autoinmunitarias, o algunos tipos de cáncer), en las que CMVh es un posible cofactor y/o puede reactivarse durante tratamientos inmunosupresores. Por ejemplo, CMVh es ahora un patógeno humano de importancia creciente para trastornos tales como complicaciones a largo plazo en
15 invasividad tumoral y evasión inmunitaria puesto que la infección por CMVh puede tener efectos oncomoduladores sobre la apoptosis, diferenciación y migración celular. En enfermedades autoinmunitarias o vasculares, la infección por CMVh puede alterar reacciones inmunitarias e inflamatorias (Cinatl J *et al.*, 2004; Soderberg-Naucler C, 2006b).

20 Un modo alternativo para prevenir la infección por CMVh es la vacunación, con el fin de proporcionar protección en una serie de poblaciones de pacientes de alto riesgo. Sin embargo, la correlación entre la vacunación y la respuesta inmunitaria resultante no se entiende completamente y la estrategia de vacuna frente a CMVh óptima (usando antígenos candidatos específicos o vacunas atenuadas vivas) parece depender de la población de pacientes que está seleccionándose para su protección. Por tanto, todavía están en evaluación estrategias de vacunación profiláctica (McLean G *et al.*, 2006; Schleiss M, 2005).

25 En vista de las presentes limitaciones de las estrategias farmacológicas para las infecciones por CMVh, el conocimiento cada vez mayor de la relación huésped-CMVh, y en particular sobre las respuestas inmunitarias específicas de CMVh, hace que las terapias inmunitarias sean buenas alternativas para sustituir, o complementar, las terapias existentes para el tratamiento satisfactorio de las complicaciones asociadas a CMVh (Gandhi M y Khanna R, 2004). Recientemente, se logró una protección a largo plazo frente al curso letal de la infección por CMVh en ratones inmunodeficientes transfiriendo células B de memoria específicas de virus, lo que sugiere que tales células pueden tener una utilidad terapéutica (Klenovsek K *et al.*, 2007).

30 Una alternativa más fácil a terapias a base de células puede ser inmunoterapia pasiva, que consiste en la administración a individuos de composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos terapéuticos con una actividad neutralizante definida frente a un antígeno humano o viral (por ejemplo CMVh).

35 Este enfoque terapéutico se ha diseñado basándose en las características biológicas y de unión a antígeno de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos dirigidos contra dianas terapéuticas humanas o virales (Dunman P y Nesin M, 2003; Keller M y Stiehm E, 2000). La inmunoterapia pasiva se ha introducido en la práctica clínica, expandiendo rápidamente las oportunidades para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades (incluyendo enfermedades infecciosas, enfermedades mediadas por el sistema inmunitario y cáncer). Este enfoque puede ser particularmente eficaz en pacientes cuyo sistema inmunitario no puede producir anticuerpos en las cantidades y/o con la especificidad requerida para bloquear y/o eliminar la molécula seleccionada como diana (Chatenoud L, 2005; Laffly E y Sodoyer R, 2005).

40 En el campo de la terapia de CMVh, este enfoque se realiza administrando por vía intravenosa preparaciones de inmunoglobulina humana que se obtienen agrupando plasma humano con altos títulos de anticuerpos anti-CMVh, y comercializadas para usos clínicos (con el nombre de Cytotect o CytoGam). Sin embargo, estos productos son sólo una solución parcialmente satisfactoria para bloquear la infección por CMVh. De hecho, este tratamiento se usa en pacientes inmunocomprometidos, principalmente para profilaxis y tratamiento preventivo en los que se administran conjuntamente a menudo agentes antivirales (Marasco W y Sui J, 2007; Nigro G *et al.*, 2005; Bonaros N *et al.*, 2004; Kocher A *et al.*, 2003; Kruger R *et al.*, 2003). Además, cuestiones de seguridad y escasez de tales preparaciones son un problema creciente, tal como se notifica en la bibliografía (Bayry J *et al.*, 2007; Hamrock D, 2006).

45 Anticuerpos recombinantes humanos que tienen alta afinidad por antígenos expresados en la envuelta de CMVh y que pueden neutralizar la infección representarían fármacos más apropiados para inmunización pasiva. De hecho, varias de las glicoproteínas de CMVh provocan fuertes respuestas inmunitarias en el huésped, incluyendo la producción de anticuerpos neutralizantes de virus, aún cuando la estequiometría de las proteínas de la envuelta es variable y puede alterarse para escapar de la respuesta inmunitaria del huésped. Se considera que esta respuesta es un componente clave de la inmunidad del huésped y representa un logro del desarrollo tanto de vacunas como de anticuerpos.

50 Anticuerpos monoclonales humanos son los anticuerpos más preferibles para aplicaciones clínicas, debido a las limitaciones intrínsecas de los anticuerpos monoclonales murinos. Sin embargo, el desarrollo de anticuerpos

humanos previamente identificados para el tratamiento de CMVh (Matsumoto Y *et al.*, 1986) se ha interrumpido puesto que no se observaron beneficios clínicos en estudios que evaluaron la eficacia de tales anticuerpos, por ejemplo, en trasplante de células madre hematopoyéticas (Boeckh M *et al.*, 2001), o en retinitis (Gilpin A *et al.*, 2003). Estos ensayos fracasados garantizan estudios adicionales dirigidos a seleccionar anticuerpos monoclonales humanos que neutralicen más eficazmente la más amplia variedad de cepas de CMVh. Finalmente, se describió una variedad de anticuerpos monoclonales humanos frente a CMV (Stenbakkers, P *et al.*, 1993). El tratamiento de infecciones por CMV se beneficiaría de tener composiciones farmacéuticas más potentes que comprendan anticuerpos monoclonales humanos que se purifican a partir de células B humanas mantenidas en cultivo o producidas como proteínas recombinantes que se expresan mediante una secuencia humana introducida en líneas celulares de mamífero.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona secuencias de anticuerpo novedosas que se unen a y neutralizan CMVh, y que pueden usarse para detectar, tratar, inhibir, prevenir y/o mejorar una infección por CMVh o una enfermedad relacionada con CMVh.

Se obtienen células B humanas de un individuo seropositivo para CMVh y se immortalizan. Se dividió esta población policlonal de células B humanas, immortalizadas para generar subcultivos que se sometieron a prueba para detectar la presencia de anticuerpos (inmunoglobulinas G, IgG) en el sobrenadante de cultivo celular que neutralizan la infectividad de CMVh *in vitro*. En particular, se determinaron el tipo de actividad neutralizante, el isotipo y la clonalidad para el anticuerpo secretado por el subcultivo denominado 26A1. El anticuerpo se ha purificado por afinidad a partir del sobrenadante de cultivo celular original y como un anticuerpo monoclonal humano recombinante, confirmando la actividad neutralizante específica de CMVh usando modelos *in vitro* para la infección por CMVh. Este anticuerpo puede usarse para caracterizar antígenos neutralizantes en la envuelta de CMVh.

Las secuencias de ADN que codifican para las regiones variables del anticuerpo secretado por el subcultivo 26A1 se amplificaron, se clonaron y se secuenciaron. Se analizaron las secuencias de proteína correspondientes para identificar las regiones determinantes de complementariedad (CDR) que son responsables de la actividad biológica específica de CMVh. Estas secuencias pueden usarse para producir proteínas que tienen propiedades neutralizantes y de unión específica a CMVh, en forma de anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos o cualquier otro formato de proteína funcional (por ejemplo péptido bioactivo, proteínas de fusión) usando tecnologías apropiadas para producir proteínas recombinantes.

Pueden prepararse composiciones que tienen utilidad terapéutica, profiláctica y/o de diagnóstico en el tratamiento de la infección por CMVh y trastornos relacionados con CMVh usando las proteínas de la invención, o bien como proteínas recombinantes o bien como anticuerpos naturales purificados a partir de cultivos celulares originados a partir del subcultivo 26A1. Tales composiciones pueden usarse para complementar o reemplazar tratamientos de CMVh actuales basados en compuestos antivirales y/o preparaciones de inmunoglobulinas (IVIg) intravenosas.

Se proporcionarán realizaciones adicionales de la presente invención en la siguiente descripción detallada.

Descripción de las figuras

Figura 1: (A) Representación esquemática del antígeno CG3 que se ha ensamblado y usado en un ELISA específico de a-gB tal como se describe en la bibliografía (Rothe M *et al.*, 2001). El antígeno CG3 de fusión entre cepas recombinante corresponde a una combinación del dominio antigénico 2 de gB (AD2; SEQ ID NO: 1 y 2) de las cepas AD169 (n.º de registro de SwissProt P06473; aminoácidos 27-84) y Towne (n.º de registro de SwissProt P13201; aminoácidos 27-84) de CMVh. La región AD2 contiene un sitio (aminoácidos 70-81, subrayados) que está conservado en diferentes cepas virales y se ha mostrado que lo reconocen anticuerpos neutralizantes (Qadri I *et al.*, 1992; Kropff B *et al.*, 1993). (B) Representación esquemática del antígeno gH incluido en la proteína de fusión gH(Ag)-GST usada para el ensayo de ELISA específico de gH. El antígeno recombinante gH(Ag)-GST corresponde a una fusión en marco entre la región amino terminal de gH (aminoácidos 16-144; SEQ ID NO: 3) de la cepa VR1814 de CMVh (Revello M *et al.*, 2001) y glutatión-S-transferasa (GST). El extremo amino terminal de gH contiene un sitio de unión a anticuerpo lineal (aminoácidos 34-43; subrayado) que lo reconocen anticuerpos neutralizantes (Urban M *et al.*, 1992).

Figura 2: Resumen del procedimiento de selección para identificar y caracterizar subcultivos (pocillos) que contienen anticuerpos de IgG que se unen a y neutralizan CMVh. Se obtuvieron los subcultivos immortalizando células B de un paciente con CMVh (CMV7) usando el procedimiento de immortalización basado en VEB dado a conocer en el documento PCT/EP2005/056871. Se seleccionaron directamente sobrenadantes de subcultivos (pocillos) que mostraban crecimiento celular significativo en el ensayo de microneutralización de CMVh. Se seleccionaron luego sobrenadantes que mostraban actividad neutralizante usando ELISA específico de gB y gH. El número de pocillos positivos para cada ensayo de selección se indica en los óvalos grises.

Figura 3: Actividad neutralizante de CMVh del anticuerpo de 26A1 natural, tal como se purifica mediante cromatografía de afinidad usando proteína A a partir del sobrenadante de un cultivo celular derivado del subcultivo 26A1 mantenido en medio libre de suero. Se realizó la curva de dosis-respuesta en el ensayo de neutralización de CMVh incluyendo o bien fibroblastos embrionarios humanos (HELFL) junto con la cepa AD169 de CMVh (1.000 UFP/reacción; CI50 0,82 µg/ml), o células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) junto con la cepa VR1814 de CMVh (1.000 UFP/reacción; CI50 0,67 µg/ml).

Figura 4: Actividad de unión específica de gH(Ag) (A) y específica del antígeno CG3 (B) de sobrenadantes que contienen IgG de subcultivos células B humanas inmortalizadas. Se realizó el ELISA usando sólo el medio de cultivo celular (medio, control negativo), o el sobrenadante de los subcultivos 26A1, 1F7 (identificados en las células inmortalizadas obtenidas del donante CMV5, tal como se describe en la solicitud de patente EP07111741), y 8C10 (identificado en las células inmortalizadas obtenidas del donante CMV7, tal como se describe en la presente solicitud de patente y en la solicitud de patente EP07115410). La línea de puntos representa el valor umbral (D.O. = 0,1) para considerar un subcultivo positivo.

Figura 5: (A) Alineación de la secuencia consenso de ADN (letra minúscula, 393 pares de bases) y proteína (letra mayúscula superior, 131 aminoácidos) de la región variable para la cadena pesada de la IgG de 26A1 (VH 26A1; SEQ ID NO.: 4 y 5). (B) Secuencia consenso de proteína para VH 26A1 con la indicación de las CDR pronosticadas (HCDR1, HCDR2 y HCDR3; subrayadas; SEQ ID NO.: 6, 7 y 8). Aminoácidos alternativos que estaban codificados por las secuencias de ADN clonadas en plásmido a partir de transformantes de *E. coli* aisladas se indican por debajo de la secuencia de proteína consenso.

Figura 6: (A) Alineación de la secuencia consenso de ADN (letra minúscula, 330 pares de bases) y proteína (letra mayúscula superior, 110 aminoácidos) de la región variable para la cadena ligera de la IgG de 26A1 (VL 26A1; SEQ ID NO.: 9 y 10). (B) Secuencia consenso de proteína para VL 26A1 con la indicación de las CDR pronosticadas de VL 26A1 (LCDR1, LCDR2 y LCDR3; subrayadas; SEQ ID NO.: 11, 12, y 13).

Figura 7: Alineación de la secuencia consenso de ADN (letra minúscula, 1449 pares de bases; SEQ ID NO.: 14) y proteína (letra mayúscula, 482 aminoácidos) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de 26A1 humano recombinante (SEQ ID NO.: 15). El sitio de escisión más probable para el péptido señal es entre las pos. 19 y 20 (VLS-QV), tal como se determina usando el programa de predicción en línea SignalP 3.0 (Bendtsen J *et al.*, 2004). La secuencia originalmente identificada en ADNc generado a partir de células en el subcultivo 26A1 está subrayada (véase la figura 5). Los aminoácidos 153-482 corresponden a la región constante de cadena pesada de IgG1 humana (n.º de registro de SwissProt P01857).

Figura 8: Alineación de la secuencia consenso de ADN (letra minúscula, 705 pares de bases; SEQ ID NO.: 16) y proteína (letra mayúscula, 234 aminoácidos) de la cadena pesada de IgG de 26A1 humana recombinante (SEQ ID NO.: 17). El sitio de escisión más probable para el péptido señal es entre las pos. 16 y 17 (CTG-SV), tal como se determina usando el programa de predicción en línea SignalP 3.0 (Bendtsen J *et al.*, 2004). La secuencia originalmente identificada en células a partir del subcultivo 26A1 está subrayada (véase la figura 5). Los aminoácidos 1-19 y 131-234 corresponden a 1-19 y 131-234 de la cadena lambda de Ig humana (n.º de registro de SwissProt Q8N355).

Figura 9: Actividad neutralizante de CMVh de anticuerpo de 26A1 humano recombinante en comparación con anticuerpo de 26A1 natural purificado con proteína A. La actividad se ha sometido a prueba usando células HELFL y la cepa de CMVh AD169 en un ensayo de microneutralización (A; 1000 UFP/reacción, 72 horas tras la infección) o en un ensayo de reducción de placas (B).

Figura 10: Actividad neutralizante de CMVh de anticuerpo monoclonal de 26A1 humano recombinante en comparación con anticuerpo de 26A1 natural purificado con proteína A. La actividad se ha sometido a prueba usando células humanas HUVEC y la cepa de CMVh VR1814 en un ensayo de microneutralización (A; 1000 UFP/reacción), o usando células humanas HELFL y la cepa de CMVh AL-1 en un ensayo de reducción de placas (B; 1000 UFP/reacción).

Descripción detallada de la invención

Los métodos descritos en el documento PCT/EP2005/056871 permiten la inmortalización eficaz de células B humanas específicas de isotipo obtenidas de un individuo, cuya sangre contiene anticuerpos que tienen actividades biológicas (por ejemplo, unión a y/o neutralización de una diana humana o viral), con el fin de obtener poblaciones policlonales de células que secreten anticuerpos que presenten tales actividades biológicas. Pueden realizarse entonces ensayos de selección extensos usando sobrenadantes de subcultivos obtenidos mediante estos métodos tras una única etapa de clonación a baja densidad celular (por ejemplo, 50, 20 células o menos por pocillo). De esta manera, es posible obtener poblaciones policlonales de células B inmortalizadas en las que puede caracterizarse un gran repertorio de subcultivos que secretan IgG y en consecuencia pueden identificarse varias IgG monoclonales humanas que tienen la especificidad de unión para antígenos y/o la actividad biológica deseadas.

En el presente caso, se obtuvo una población policlonal de células B humanas inmortalizadas, que secretan IgG a partir de la sangre de un paciente con CMVh cuyo suero presentaba, como actividad biológica, una fuerte actividad neutralizante de CMVh. La población policlonal se usó para generar, en una única etapa de subclonación a 20 células por pocillo y en condiciones de cultivo apropiadas, miles de subcultivos que contienen células B humanas inmortalizadas. Se sometió a prueba entonces la actividad biológica específica en el sobrenadante de cientos de cultivos celulares que crecían eficazmente con el fin de seleccionar los que presentaban la mayor actividad, y entonces se determinó el isotipo y, si era posible, el epítipo del anticuerpo secretado.

Uno de los subcultivos más prometedores, denominado 26A1, se usó tanto para purificar el anticuerpo humano natural a partir de cultivos a gran escala como para aislar el ADN que codificaba para tal anticuerpo a partir de las células B inmortalizadas. La secuencia de ADN se usó para producir el anticuerpo humano natural como un anticuerpo humano recombinante. El anticuerpo monoclonal de 26A1 humano recombinante y natural se usaron para realizar ensayos biológicos más extensos y para evaluar su posible utilidad en aplicaciones clínicas relacionadas con CMVh.

Los ejemplos muestran cómo el sobrenadante de cultivo celular, el anticuerpo humano natural y el anticuerpo humano recombinante presentan la misma actividad biológica determinada en el suero sanguíneo original y la población policlonal de células B humanas inmortalizadas por VEB. Estas pruebas confirman que los métodos descritos en el documento PCT/EP2005/056871 permiten la identificación, caracterización y la producción de anticuerpos monoclonales humanos biológicamente activos, específicos de isotipo, naturales y recombinantes. De hecho, el procedimiento completo de inmortalización celular y crecimiento en condiciones de cultivo celular proporciona acceso al repertorio de anticuerpos humanos de una manera rápida, eficaz y sencilla. Además, las células que resultan del procedimiento pueden congelarse y seleccionarse en un momento diferente, o en paralelo para diferentes actividades biológicas y/o antígenos.

En una realización, la presente invención proporciona proteínas según las reivindicaciones. En particular, comprenden una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de la HCDR3 (CDR3 de la región variable de la cadena pesada) del anticuerpo de 26A1 (SEQ ID NO.: 8). Junto con la HCDR1 y HCDR2 (SEQ ID NO.: 6 y SEQ ID NO.: 7), esta HCDR3 está incluida en la región variable de la cadena pesada del anticuerpo de 26A1 (VH 26A1; figura 5; SEQ ID NO.: 5). Esta secuencia está codificada por la secuencia de ADN (figura 5A; SEQ ID NO.: 4) que se amplificó y clonó usando células obtenidas del subcultivo original que secretaba el anticuerpo de 26A1. Por tanto, una proteína de la invención puede contener, junto con la HCDR3 del anticuerpo de 26A1 (SEQ ID NO.: 8), la secuencia de la HCDR1 (SEQ ID NO.: 6) y/o HCDR2 (SEQ ID NO.: 7) del anticuerpo de 26A1 (figura 5B). Una proteína de este tipo puede comprender una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia completa de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo de 26A1.

El anticuerpo de 26A1 también contiene una región variable de una cadena ligera para la que, usando el mismo enfoque, se han determinado (figura 6) las secuencias de ADN (SEQ ID NO.: 9) y de proteína (SEQ ID NO.: 10) junto con las LCDR específicas (SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12 y SEQ ID NO.: 13). Por tanto, una proteína de la invención comprende secuencias seleccionadas del grupo que consiste en LCDR únicas del anticuerpo de 26A1 (SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12 y SEQ ID NO.: 13), que pueden proporcionarse como una secuencia de proteína que comprende una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con VL 26A1 (figura 6B; SEQ ID NO.: 10). Esto se aplica en particular cuando un anticuerpo recombinante humano, que comprende tanto las secuencias VL 26A1 como VH 26A1 naturales como cadenas ligera y pesada (en la conformación natural de un complejo tetramérico que comprende dos cadenas ligeras y dos pesadas, o en una única proteína como variante recombinante del anticuerpo natural), si se desea.

Siempre que se indique un nivel de identidad, este nivel de identidad debe determinarse en la longitud completa de la secuencia relevante de la invención.

La HCDR3 del anticuerpo de 26A1 puede considerarse como característica de la parte de unión a antígeno de un anticuerpo humano específico que puede unirse a y neutralizar CMVh, tal como se muestra en los ejemplos. Aún cuando se requieren generalmente varias o todas las CDR de un anticuerpo para obtener una superficie de unión a antígeno, HCDR3 es la CDR que muestra las mayores diferencias entre anticuerpos no sólo con respecto a la secuencia sino también con respecto a la longitud. Tales diversidades son componentes fundamentales de las regiones de unión para el reconocimiento de esencialmente cualquier antígeno por el sistema inmunitario humoral (Xu y Davis, 2000; Barrios Y *et al.* 2004; Bond C *et al.*, 2003). Alternativamente, pueden ligarse entre sí combinaciones de CDR en proteínas muy cortas que conservan las propiedades de unión originales, tal como se revisó recientemente (Ladner R, 2007).

Por tanto, pueden generarse proteínas neutralizantes de CMVh usando la HCDR3 del anticuerpo de 26A1 como resto de unión a CMVh, en combinación o no con otras CDR del anticuerpo de 26A1, que pueden expresarse dentro de un entramado proteico de anticuerpo (Knappik A *et al.*, 2000), o dentro de un entramado proteico no relacionado con anticuerpos (Kiss C *et al.*, 2006).

5 La región variable de las cadenas pesada y ligera que forman el anticuerpo de 26A1 (o partes seleccionadas, tales como las HCDR y LCDR aisladas) pueden incluirse en cualquier otro formato de proteína para fragmentos de anticuerpos funcionales, tal como se describe en la bibliografía con diferentes nombres tales como Scfv (fragmento variable de cadena sencilla), Fab (heterodímero de cadena pesada/ligera variable), diacuerpo, peptacuerpo, VHH (dominio variable de cadena pesada de anticuerpo), cadenas ligeras o pesadas aisladas, anticuerpos biespecíficos y otras variantes de anticuerpos modificados por ingeniería genética para aplicaciones clínicas y no clínicas (Jain M *et al.*, 2007; Laffly E y Sodoyer R, 2005).

10 Pueden generarse anticuerpos alternativos usando las secuencias del anticuerpo de 26A1 a través de un procedimiento de intercambio de dominio variable de la cadena ligera (VL). De hecho, pueden generarse varios anticuerpos diferentes y someterse a prueba para determinar la actividad específica de CMVh usando un dominio variable de la cadena pesada sencilla VH (tal como la de 26A1) combinada con una biblioteca de dominios VL, con el fin de la determinación de combinaciones de VH/VL con propiedades mejoradas en cuanto a afinidad, estabilidad
15 y/o producción recombinante (Ohlin M *et al.*, 1996; Rojas G *et al.*, 2004; Watkins N *et al.*, 2004).

Enfoques novedosos para desarrollar nuevos péptidos bioactivos también mostraron la viabilidad de sintetizar péptidos derivados de CDR que contienen L-aminoácidos y/o D-aminoácidos, que mantienen la actividad original, y que pueden tener un perfil farmacológico más apropiado (Smith J *et al.*, 1995; Levi M *et al.*, 2000; Wijkhuisen A *et al.*, 2003).
20

Por tanto, la HCDR3 del anticuerpo de 26A1 así como secuencias sumamente similares a la HCDR3 del anticuerpo de 26A1, proteínas de fusión que la contienen y péptidos sintéticos derivados de las mismas (que contienen por ejemplo L-aminoácidos, D-aminoácidos, en la conformación normal o en la retroinversa), pueden someterse a prueba y usarse como proteínas neutralizantes y de unión a CMVh.
25

Además, se sabe que pueden modificarse anticuerpos en posiciones específicas con el fin de disponer de anticuerpos con características mejoradas, en particular para aplicaciones clínicas (tales como mejor perfil farmacocinético o superior afinidad para un antígeno). Estos cambios pueden realizarse en las CDR y/o el entramado del anticuerpo de 26A1 y la secuencia puede elegirse aplicando cualquiera de las tecnologías dedicadas para el diseño racional de anticuerpos que utilizan la maduración por afinidad y otros procesos (Kim S *et al.*, 2005; Jain M *et al.*, 2007).
30

Las proteínas de la invención pueden proporcionarse como anticuerpos en general, tales como anticuerpos monoclonales completamente humanos que tienen un isotipo específico. El isotipo IgG, por ejemplo, es el formato de anticuerpo de casi todos los anticuerpos terapéuticos aprobados (Laffly E y Sodoyer R, 2005). Sin embargo, se transfirieron partes de unión a antígeno aisladas de una IgG1 neutralizante de VIH sobre una secuencia de IgA humana y el anticuerpo resultante también puede inhibir la infección por VIH (Mantis N *et al.*, 2007).
35

La proteína de la invención puede proporcionarse también como fragmentos de anticuerpos, péptidos bioactivos o proteínas de fusión. Todas estas moléculas alternativas deben mantener, si no potenciar, las propiedades de neutralización y unión a CMVh originales que se determinaron para el anticuerpo de 26A1. En el caso de proteínas de fusión, las secuencias de proteínas heterólogas pueden ubicarse en la posición N o C terminal con respecto a la secuencia derivada de 26A1, sin afectar a la expresión correcta y la actividad biológica del resto específico de CMVh (por ejemplo un fragmento de anticuerpo).
40
45

La expresión "secuencia de proteína heteróloga" indica una secuencia de proteína que no está presente de manera natural en la posición N o C terminal con respecto al resto específico de CMVh (por ejemplo un fragmento de anticuerpo). La secuencia de ADN que codifica para esta secuencia de proteína se fusiona generalmente mediante tecnologías de ADN recombinante y comprende una secuencia que codifica para al menos 5 aminoácidos.
50

Una secuencia de proteína heteróloga de este tipo se elige generalmente para proporcionar propiedades adicionales al fragmento de anticuerpo específico de CMVh para usos terapéuticos y/o de diagnóstico específicos. Los ejemplos de tales propiedades adicionales incluyen: mejores medios para la detección o purificación, ligandos biológicos o restos de unión adicionales, o modificación postraduccional de una proteína de fusión (por ejemplo fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, sumoilación o escisión endoproteolítica).
55

Alternativamente (o adicionalmente a la fusión con una secuencia de proteína heteróloga), la actividad de una proteína de la invención puede mejorarse con la conjugación a diferentes compuestos tales como agentes terapéuticos, estabilizantes o de diagnóstico. Ejemplos de estos agentes son marcadores detectables (por ejemplo un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una toxina, un átomo de metal, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto bioluminiscente o una enzima) que pueden unirse usando polímeros o ligadores químicos. La actividad biológica específica de CMVh puede mejorarse mediante la fusión con otra proteína terapéutica, tal como una proteína o un polímero que altera el metabolismo y/o la estabilidad en aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico.
60
65

Se proporcionan en la bibliografía medios para elegir y diseñar restos proteicos, ligandos y ligadores apropiados, así como métodos y estrategias para la construcción, purificación, detección y uso de proteínas de fusión (Nilsson J *et al.*, 1997; "Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins" *Methods Enzymol.* Vol. 326-328, Academic Press, 2000; documento WO 01/77137) y están comúnmente disponibles en laboratorios clínicos y de investigación. Por ejemplo, la proteína de fusión puede contener secuencias reconocidas por anticuerpos comerciales (incluyendo etiquetas tales como etiquetas de polihistidina, FLAG, c-Myc o HA) que pueden facilitar la identificación *in vivo* y/o *in vitro* de la proteína de fusión, o su purificación.

Otras secuencias de proteína pueden identificarse mediante análisis de fluorescencia directa (como en el caso de la proteína fluorescente verde), o mediante enzimas o sustratos específicos (por ejemplo usando sitios proteolíticos). La estabilidad de anticuerpos específicos de CMVh, fragmentos de anticuerpos, péptidos bioactivos y proteínas de fusión pueden mejorarse con la fusión con una proteína portadora, tal como proteína de cubierta de fago (cp3 o cp8), proteína de unión a maltosa (MBP), albúmina sérica bovina (BSA) o glutatión-S-transferasa (GST).

El anticuerpo de 26A1 es un objeto principal de la invención y se ha caracterizado, dentro del sobrenadante de un subcultivo específico, como un anticuerpo monoclonal de IgG1 humana que se ha seleccionado debido a la capacidad de neutralizar CMVh. Esta propiedad se ha determinado mediante ensayos de neutralización *in vitro* usando sobrenadante de cultivo celular (tabla 1), y posteriormente como un anticuerpo monoclonal humano purificado con proteína A (figura 3) y recombinante (figura 9 y 10; SEQ ID NO.: 15 y 17).

El antígeno de CMVh específico que reconoce el anticuerpo de 26A1 no se ha determinado usando un panel de epítomos neutralizantes de CMVh conocidos en antígenos virales (véase la figura 1, 2 y 4). En consecuencia, este anticuerpo de IgG puede usarse para definir un epítomo neutralizante de CMVh y proteínas que se unen a tal antígeno (por ejemplo en forma de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, péptidos bioactivos, proteína de fusión o cualquier proteína natural/recombinante) que deben poder neutralizar una infección por CMVh reconociendo tal epítomo.

En el pasado, se han usado también ELISA o inmunotransferencia de tipo Western usando péptidos sintéticos o proteínas truncadas específicas de CMVh (Greijer A *et al.*, 1999; Ohlin M *et al.*, 1993) y de este modo se han definido anticuerpos dirigidos a CMVh según su antígeno, que es la glicoproteína H (documentos WO 94/16730, WO 94/09136, WO 92/11018), glicoproteína B (documentos EP248909, WO 93/21952) o glicoproteína M/glicoproteína N (Shimamura M *et al.*, 2006). Además, otros componentes del virión de CMVh no sólo afectan al tropismo viral sino que pueden ser dianas de anticuerpos neutralizantes de CMVh, como en el caso de pUL130 y pUL128 (Wang D y Shenk T, 2005). Por tanto, el antígeno/epítomo de CMVh reconocido por los anticuerpos de 26A1 puede identificarse mediante diferentes ensayos *in vitro* basados en la bibliografía mencionada anteriormente.

Una realización adicional de la presente invención es anticuerpo de IgG1 humana secretado por el subcultivo 26A1, que puede proporcionarse como un anticuerpo natural purificado con proteína A que puede unirse a y neutralizar CMVh. Este anticuerpo de IgG1 puede usarse para identificar proteínas de competición que pueden unirse a y neutralizar CMVh. Las proteínas pueden proporcionarse como anticuerpos humanos recombinantes y fragmentos de anticuerpos.

El mecanismo de la neutralización de CMVh, que está asociado con el epítomo viral reconocido por el anticuerpo de 26A1 y las otras proteínas definidas anteriormente, puede caracterizarse usando los ensayos disponibles para cepas y/o proteínas de CMVh estructurales específicas, tal como se muestra en la bibliografía usando paneles de sueros humanos (Navarro D *et al.*, 1997; Klein M *et al.*, 1999; Weber B *et al.*, 1993; Rasmussen L *et al.*, 1991; Marshall G *et al.*, 2000) o de anticuerpos monoclonales (Schoppel K *et al.*, 1996; Simpson J *et al.*, 1993; Gicklhorn D *et al.*, 2003).

Objetos adicionales de las invenciones son los ácidos nucleicos que codifican para cualquiera de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas de fusión, péptidos bioactivos o HCDR y LCDR aisladas definidas anteriormente. Los ejemplos proporcionan tales secuencias, en particular tal como codifican para las regiones variables completas de las cadenas pesada (SEQ ID NO.: 4) y ligera (SEQ ID NO.: 9) de 26A1 (figura 5A y 6A). Estas secuencias de ADN (partes seleccionadas, tales como las que codifican para las HCDR y LCDR específicas; figura 5 y 6) pueden transferirse en vectores para expresarlas en uno de los formatos alternativos para anticuerpos (por ejemplo completos, madurados por afinidad, o fragmentos de anticuerpos o injertados con CDR) o proteínas de fusión. Estos ácidos nucleicos pueden comprender una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO.: 4, con o sin una secuencia que comprende además una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO.: 9, dependiendo de si son necesarias secuencias a partir de sólo la cadena pesada de 26A1 o tanto la cadena pesada como ligera.

Cuando se desea un anticuerpo completamente humano, el anticuerpo debe comprender además una región constante de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE. Preferiblemente, la región constante de la cadena pesada es una IgA, IgG1 (como en el anticuerpo de 26A1 natural caracterizado a partir del subcultivo 26A1), IgG2 o IgG4 humana. Las secuencias de ácido nucleico que codifican para las regiones variables completas de las cadenas pesada y ligera de 26A1 se han

clonado y caracterizado por medio de reacciones de PCR y vectores que contienen los productos de PCR resultantes, que se han usado para transformar células de *E. coli*. Tales secuencias pueden transferirse (en parte o en su totalidad) a otro vector, en particular en el casete de expresión de un vector o de distintos vectores en los que están operativamente unidas a secuencias reguladoras apropiadas (por ejemplo promotores, terminadores de la transcripción).

El anticuerpo monoclonal de 26A1 humano, o cualquier otra secuencia proteica derivada de tal anticuerpo, puede expresarse como una proteína recombinante usando tales vectores para transformar las células huésped apropiadas. Las células huésped que comprenden los ácidos nucleicos de la invención pueden ser células huésped procariontas o eucariotas y deben permitir la secreción de la proteína recombinante deseada. Los métodos para producir tales proteínas incluyen cultivar células huésped transformadas con los vectores de expresión que comprenden sus secuencias codificantes en condiciones adecuadas para la expresión de proteínas y recuperar la proteína del cultivo de células huésped. Los vectores deben incluir un promotor, un sitio de unión a ribosomas (si es necesario), los codones de iniciación/terminación y la secuencia líder/de secreción, que pueden dirigir la expresión de un transcrito mono o bicistrónico para la proteína deseada. Los vectores deben permitir la expresión de la proteína recombinante en las células huésped procariontas o eucariotas. Puede aislarse entonces una línea celular sustancialmente enriquecida en tales células para proporcionar una línea celular estable.

Los ácidos nucleicos y las células huésped pueden usarse para producir una proteína de la invención aplicando tecnologías de ADN recombinante comunes. En resumen, las secuencias de ADN deseadas pueden extraerse o bien digiriendo el vector de clonación inicial con enzimas de restricción o amplificarse usando un vector de este tipo como molde para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los cebadores de PCR para amplificar específicamente regiones variables completas de las cadenas pesada y ligera o sólo partes de las mismas (por ejemplo la secuencia HCDR3). Estos fragmentos de ADN pueden transferirse entonces a vectores más apropiados para la expresión en células huésped procariontas o eucariotas, tal como se describe en libros y revisiones sobre cómo clonar y producir proteínas recombinantes, incluyendo títulos de la serie "A Practical Approach" publicada por Oxford Univ. Press ("DNA Cloning 2: Expression Systems", 1995; "DNA Cloning 4: Mammalian Systems", 1996; "Protein Expression", 1999; "Protein Purification Techniques", 2001).

Para huéspedes eucariotas (por ejemplo células de levaduras, insectos o mamíferos), pueden emplearse diferentes secuencias reguladoras de la transcripción y traducción, dependiendo de la naturaleza del huésped. Pueden derivarse de fuentes virales, tales como adenovirus, virus del papiloma bovino, virus de simios o similares, en los que las señales reguladoras están asociadas con un gen particular que tiene un alto nivel de expresión. Ejemplos son el promotor TK del virus del herpes, el promotor temprano de SV40, el promotor del gen gal4 de levaduras, etc. pueden seleccionarse señales reguladoras de la iniciación de la transcripción que permiten la activación y represión transitoria (o constitutiva) y la modulación de la expresión génica.

La secuencia que codifica para la proteína recombinante puede adaptarse y volverse a clonar para realizar modificaciones al nivel del ADN que sólo pueden determinarse, por ejemplo, usando software para seleccionar la secuencia de ADN en la que el uso de codones y los sitios de restricción son los más apropiados para clonar y expresar una proteína recombinante en células huésped y vectores específicos (Grote A *et al.*, 2005; Carton J *et al.*, 2007).

Durante etapas de clonación adicionales, pueden añadirse secuencias de proteína en relación con el formato de anticuerpo deseado (Scfv, Fab, fragmento de anticuerpo, anticuerpo completamente humano, etc.), o a la inserción, sustitución o eliminación de uno o más aminoácidos internos. Estas tecnologías pueden usarse también para la caracterización funcional y estructural adicional y la optimización de las propiedades terapéuticas de proteínas en general, y de anticuerpos en particular (Kim S *et al.*, 2005), o para generar vectores que permitan su administración *in vivo* estable (Fang J *et al.*, 2005). Por ejemplo, también pueden modificarse anticuerpos recombinantes al nivel de la estructura y/o actividad eligiendo una región Fc específica que va a fusionarse con las regiones variables (Furebring C *et al.*, 2002; Logtenberg T, 2007), generando fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla (Gilliland L *et al.*, 1996), y añadiendo secuencias peptídicas estabilizantes (documento WO 01/49713), polímeros o compuestos radioquímicos para modificar químicamente residuos (Chapman A *et al.*, 1999).

La secuencia de ADN que codifica para la proteína recombinante, una vez insertada en un vector de integración homóloga o no homóloga o episomal adecuado, puede introducirse en las células huésped apropiadas mediante cualquier medio adecuado (transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa, etc.) para transformarlas. Los factores importantes que han de considerarse cuando se seleccionan un vector particular incluyen: la facilidad con la que pueden reconocerse y seleccionarse células huésped que contienen el vector; el número de copias del vector que se desean; y si el vector puede "servir de lanzadera" entre células huésped de diferentes especies.

Las células que se han transformado de manera estable mediante el ADN introducido pueden seleccionarse introduciendo también uno o más marcadores que permiten la selección de células huésped que contienen el vector de expresión. El marcador puede proporcionar también fototrofia a un huésped auxotrófico, resistencia a biocidas,

por ejemplo antibióticos, o metales pesados tales como cobre, o similares, y puede escindirarse o reprimirse si es necesario. El gen marcador seleccionable o bien puede unirse directamente a las secuencias génicas de ADN que van a expresarse, o bien introducirse en la misma célula mediante cotransfección. También pueden ser necesarios elementos reguladores de la transcripción adicionales para lograr una expresión óptima.

Las células huésped pueden ser o bien procariotas o bien eucariotas. Entre las células huésped procariotas, las preferidas son *B. subtilis* y *E. coli*. Entre las células huésped eucariotas, las preferidas son células de levaduras, de insectos o de mamíferos. En particular, células tales como células humanas, de mono, de ratón, de insecto (que usan sistemas de expresión a base de baculovirus) y células de ovario de hámster chino (CHO) (tal como se muestra en los ejemplos), proporcionan modificaciones postraduccionales a moléculas proteicas, incluyendo plegamiento correcto o ciertas formas de glicosilación en sitios correctos. También células de levaduras pueden llevar a cabo modificaciones postraduccionales de péptidos incluyendo glicosilación. Existen varias estrategias de ADN recombinante que utilizan secuencias promotoras fuertes y alto número de copias de plásmidos que pueden utilizarse para la producción de las proteínas deseadas en levadura. La levadura reconoce secuencias líder en productos génicos clonados de mamífero y secreta péptidos que llevan secuencias líder (es decir, pre-péptidos).

Se conocen en la técnica líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) incluyendo, pero sin limitarse a, células de ovario de hámster chino (CHO), HeLa, de riñón de cría de hámster (BHK), de riñón de mono (COS), C127, 3T3, BHK, HEK 293, Per.C6, de melanoma de Bowes y de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo Hep G2) y otras varias líneas celulares. En el sistema de baculovirus, los materiales para expresión en células de insecto/baculovirus están comercialmente disponibles en forma de kit (por ejemplo comercializado por Invitrogen).

Para la producción a largo plazo, con alto rendimiento de un polipéptido recombinante, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden transformarse líneas celulares que expresan de manera estable el polipéptido de interés usando vectores de expresión que pueden contener orígenes de replicación virales y/o elementos de expresión endógena y un gen marcador seleccionable en el mismo o en un vector separado. Tras la introducción del vector, puede dejarse que crezcan las células durante uno o más días en un medio enriquecido antes de que se cambien a medio selectivo. El fin del marcador seleccionable es conferir resistencia para la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan de manera satisfactoria las secuencias introducidas. Pueden proliferar clones resistentes de células transformadas de manera estable usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo celular. Puede aislarse entonces una línea celular sustancialmente enriquecida en tales células para proporcionar una línea celular estable.

En el caso de inmunoglobulinas humanas completamente recombinantes, una etapa importante es la selección del isotipo específico y la región constante. Se describen ampliamente en la bibliografía vectores diseñados específicamente para expresar anticuerpos con el subtipo e isotipo deseado (por ejemplo, IgA, IgG1, IgG2 o IgG4 humana). Entonces, los anticuerpos completos o las proteínas de fusión pueden expresarse como proteínas recombinantes en organismos procariotas (por ejemplo *Escherichia coli*; Sorensen H y Mortensen K, 2005; Venturi M *et al.*, 2002), plantas (Ma J *et al.*, 2005) o células eucariotas, que permiten un alto nivel de expresión como células transformadas de manera estable o transitoria (Dinnis D y James D, 2005). Esto se requeriría en particular cuando la caracterización de los anticuerpos ha de hacerse usando ensayos más sofisticados, incluyendo ensayos *in vivo*, en los que la semivida del anticuerpo puede determinarse. Las células huésped pueden seleccionarse adicionalmente basándose en el nivel de expresión de la proteína recombinante.

Además, cuando se expresa la proteína, especialmente como un anticuerpo, en células huésped eucariotas (líneas celulares de mamíferos, en particular), se han diseñado diferentes vectores y sistemas de expresión para generar conjuntos estables de líneas celulares transfectadas (Aldrich T *et al.*, 2003; Bianchi A y McGrew J, 2003). Se ha logrado expresión estable, de alto nivel, optimizada de anticuerpos recombinantes (Schlatter S *et al.*, 2005), también debido a la optimización de las condiciones de cultivo celular (Grunberg J *et al.*, 2003; Yoon S *et al.*, 2004) y seleccionando o diseñando por ingeniería genética clones con niveles superiores de producción y secreción de anticuerpos (Bohm E *et al.*, 2004; Butler M, 2005;).

El anticuerpo, los fragmentos de anticuerpos, el péptido bioactivo, la proteína de fusión y cualquier otra proteína que se define anteriormente que puede unirse a y neutralizar CMVh puede purificarse usando las tecnologías bien establecidas que permiten el aislamiento de cualquier proteína recombinante o no recombinante del cultivo celular o de preparaciones sintéticas. Estas tecnologías deben proporcionar una cantidad suficiente de proteína (intervalo desde el microgramo hasta el miligramo) para realizar una caracterización y validación más extensa para usos terapéuticos, de diagnóstico y profilácticos relacionados con CMVh. Para este fin, las preparaciones de proteínas naturales o recombinantes pueden someterse a prueba en ensayos *in vitro* o *in vivo* (ensayos basados en células, tejido o bioquímicos, modelos de enfermedad establecidos en roedores o primates, métodos biofísicos para mediciones de afinidad, mapeo de epítomos, etc.), en particular usando cualquiera de los dados a conocer en los ejemplos o en la bibliografía para estudiar la patogénesis e inmunobiología de CMVh.

Los anticuerpos, como preparaciones purificadas a partir de sobrenadantes de células B humanas o expresadas como proteínas recombinantes, pueden validarse adicionalmente usando ensayos *in vitro* basados en células u órganos conocidos en la bibliografía (Eggers M *et al.* 1998; Lam V *et al.*, 2006; Reinhardt B *et al.*, 2003; Forthal D *et al.*, 2001; Goodrum F *et al.*, 2002). Además, pueden realizarse pruebas preclínicas relevantes en animales infectados por CMVh, en particular en modelos en los que pueden trasplantarse células huésped humanas (Barry P *et al.*, 2006; Gosselin J *et al.*, 2005; Thomsen M *et al.*, 2005).

La purificación de las proteínas recombinantes de la invención puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los métodos convencionales conocidos para este fin, es decir, cualquier procedimiento que implique extracción, precipitación, cromatografía o similar. En particular, los métodos para la purificación de anticuerpos pueden utilizar matrices de gel inmobilizadas contenidas dentro de una columna (Nisnevitch M y Firer M, 2001; Huse K *et al.*, 2002; Horenstein A *et al.*, 2003), aprovechando la fuerte afinidad de anticuerpos por sustratos tales como proteína A, proteína G o sustratos sintéticos (Verdolina A *et al.*, 2002; Roque A *et al.*, 2004), o por epítomos o antígenos específicos (Murray A *et al.*, 2002; Jensen L *et al.*, 2004). Tras lavar, la proteína se eluye del gel mediante un cambio en el pH o la fuerza iónica. Alternativamente, puede usarse HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución). La elución puede llevarse a cabo usando un disolvente a base de agua-acetonitrilo comúnmente empleado para la purificación de proteínas.

El anticuerpo, los fragmentos de anticuerpos, los péptidos bioactivos, las proteínas de fusión y cualquier otro compuesto definido anteriormente usando las secuencias de anticuerpo de 26A1 pueden usarse para detectar, tratar, inhibir, prevenir y/o mejorar la infección por CMVh. Para este fin, tales compuestos pueden usarse para preparar composiciones profilácticas, terapéuticas o de diagnóstico para el tratamiento de la infección por CMVh.

En particular, tales compuestos pueden usarse para preparar composiciones farmacéuticas; junto con cualquier portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones pueden comprender además cualquier agente profiláctico o terapéutico adicional, tal como vacunas, anticuerpo neutralizante de CMVh, preparaciones intravenosas de inmunoglobulinas, compuestos inmunomoduladores y/o compuestos antivirales. La bibliografía proporciona algunos ejemplos de tales compuestos que actúan sobre la replicación de CMVh (foscarnet, vanganciclovir, fomivirsen o ganciclovir) y ya sometidos a prueba en seres humanos, solos o en combinación con preparaciones intravenosas de inmunoglobulinas (De Clercq E, 2003; Nigro G *et al.*, 2005).

Además, la bibliografía reciente sugiere que pueden usarse anticuerpos monoclonales humanos para complementar (y reemplazar, si es posible) tratamientos presentes tales como preparaciones intravenosas de inmunoglobulinas y/o compuestos antivirales, dando la oportunidad de reducir la frecuencia y/o dosificación de tales composiciones farmacéuticas (Bayry J *et al.*, 2007).

Estas composiciones pueden comprender un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un péptido bioactivo, una proteína de fusión y cualquier otro compuesto definido anteriormente basándose en la secuencia y actividad de la secuencia de anticuerpo monoclonal de 26A1 humano. Las composiciones pueden comprender además un anticuerpo neutralizante de CMVh diferente, una preparación intravenosa de inmunoglobulinas (IVIg) y/o un compuesto antiviral. El anticuerpo neutralizante de CMVh diferente debe caracterizarse mediante un epítomo diferente, tal como los ya descritos en la bibliografía o en las solicitudes de patente EP07114782, EP07115410 y EP07111741 (10B7, 8C10 e IF7, respectivamente) que están asociados con gH, gB u otros antígenos de CMVh. De hecho, la bibliografía muestra muchos ejemplos en los que, cuando dos o más anticuerpos dirigidos a una diana viral o humana se combinan en una composición farmacéutica, la composición resultante puede tener una eficacia terapéutica mejorada debido no a un simple efecto aditivo sino a un efecto sinérgico específico (Logtenberg T, 2007).

Las composiciones que comprenden cualquiera de las proteínas (por ejemplo anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas de fusión, péptidos bioactivos) y de los ácidos nucleicos definidos anteriormente pueden usarse y administrarse a un individuo con un fin profiláctico, terapéutico o de diagnóstico relacionado con CMVh. Estas composiciones pueden administrarse como medios para la inmunización pasiva específica de CMVh que proporcionan compuestos terapéuticos (en particular anticuerpos terapéuticos o fragmentos de anticuerpos terapéuticos) que, seleccionando como diana viriones de CMVh, pueden inhibir la propagación del virus en el paciente tratado, y bloquear posiblemente el brote de una infección viral en la población.

Dependiendo del uso específico, la composición debe proporcionar el compuesto al sujeto humano (en particular una mujer embarazada u cualquier otro individuo que esté infectado por CMVh o se considere que corre riesgo de CMVh debido al contacto con un individuo infectado por CMVh) durante un periodo más largo o más corto de tiempo. Para este fin, la composición puede administrarse, en dosificaciones múltiples o individuales y/o usando dispositivos apropiados, a través de diferentes vías: por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía tópica, por vía mucosa, mediante un nebulizador o un inhalador, como gotas oculares, en materiales de matriz biodegradable y no biodegradable, o usando sistemas de administración de fármacos particulados. En particular, la composición puede permitir la administración tópica u ocular, lo que representa un enfoque útil dada la presencia de CMVh en las mucosas y el ojo. Además, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pueden ser eficaces cuando

se aplican por vía tópica a heridas (Streit M *et al.*, 2006), a la córnea (Brereton H *et al.*, 2005) o a la vagina (Castle P *et al.*, 2002).

Una composición farmacéutica de la invención debe proporcionar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto al sujeto que permita que el compuesto ejerza su actividad durante un periodo de tiempo suficiente. El efecto deseado es mejorar el estado del paciente con CMVh controlando la infección, reactivación y/o reinfección por CMVh, y reduciendo al menos algunas de las manifestaciones clínicas de la infección por CMVh, tales como retinitis o neumonitis (Landolfo S *et al.*, 2003). Por ejemplo, la composición debe administrarse en una cantidad eficaz de desde aproximadamente 0,005 hasta aproximadamente 50 mg/kg/de peso corporal, dependiendo de la vía de administración, el número de dosis administradas y el estado del individuo.

En el caso de composiciones que tienen usos de diagnóstico, el compuesto debe detectarse usando tecnologías comúnmente establecidas en los laboratorios clínicos y de investigación para detectar virus en muestras biológicas (por ejemplo ELISA u otros ensayos serológicos), o, cuando se administra a un sujeto *in vivo*, al menos 1, 2, 5, 10, 24, o más horas tras la administración. La detección de CMVh puede realizarse, usando las proteínas de la invención, en sustitución o asociada a los medios y procedimientos conocidos que se han establecido para monitorizar la infección por CMVh crónica o aguda en poblaciones en riesgo de huéspedes tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos, en los que existe una correlación entre los datos generados *in vitro* y el estado clínico (Gilbert G, 2002; Gerna G y Lilleri D, 2006; Lazzarotto T *et al.*, 2007).

Un método para el tratamiento, la profilaxis o el diagnóstico de CMVh, o de una enfermedad relacionada con CMVh puede comprender la administración de una proteína o de un ácido nucleico tal como se definió anteriormente. El método puede comprender además la administración de un anticuerpo neutralizante de CMVh diferente, una preparación intravenosa de inmunoglobulinas (IVIg) y/o un compuesto antiviral.

El uso y desarrollo clínico debe basarse en la farmacocinética y farmacodinámica del anticuerpo (Lobo E *et al.*, 2004; Arizono H *et al.*, 1994), los datos de seguridad preclínicos y clínicos (Tabrizi M y Riskos L, 2007) y la compatibilidad con los requisitos internacionales para la producción y el control de calidad de anticuerpos monoclonales que van a usarse para la terapia y el diagnóstico *in vivo* en seres humanos (Harris R *et al.* 2004).

Las proteínas de la invención pueden usarse también para la preparación de una composición para detectar, tratar, inhibir, prevenir y/o mejorar otras enfermedades más extendidas (tales como enfermedades cardiovasculares y autoinmunitarias, o algunos tipos de cáncer) que pueden definirse como relacionadas con CMVh o asociadas con CMVh. En estos estados, CMVh se considera un posible cofactor puesto que se sabe bien que este virus está asociado con procesos inflamatorios inmunológicos/celulares (estimulando la expresión de receptores de Fc, moléculas de adhesión celular, quimiocinas y citocinas), actividades autoinmunitarias (por ejemplo en aterosclerosis, reestenosis) y con alteraciones en las rutas de presentación de antígenos (inhibiendo la expresión del CMH clase I y II) que conducen a migración, diferenciación y apoptosis celular, por ejemplo en vasos sanguíneos y en células que proliferan de manera activa (Cinatl J *et al.*, 2004; Soderberg-Naucler C, 2006b).

Además, se ha encontrado que la infección por CMVh está asociada con la alteración del metabolismo celular (Munger J *et al.*, 2007), depresión (Phillips A *et al.*, 2007), o es un factor de riesgo para acontecimientos trombóticos (Fridlender Z *et al.*, 2007). Se han encontrado también reactivación de CMVh y complicaciones relacionadas en pacientes con cáncer (Sandherr M *et al.*, 2006; Han X, 2007) o pacientes afectados por enfermedades inflamatorias del tejido conjuntivo (Yoda Y *et al.*; 2006), y en general en pacientes en tratamientos inmunosupresores tales como corticosteroides (Yamashita M *et al.*, 2006), o quimioterapia y otros regímenes inmunosupresores a base de anticuerpos (O'Brien S *et al.*, 2006; Scheinberg P *et al.*, 2007).

La invención se describirá ahora por medio de los siguientes ejemplos, que no debe interpretarse de ningún modo que limitan la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de cultivos celulares que secretan anticuerpos monoclonales humanos que neutralizan la infectividad del CMVh

Materiales y métodos

Selección de donantes humanos que presentan anticuerpos de IgG que neutralizan CMVh en el suero sanguíneo

Estos ensayos específicos de CMVh se han realizado tal como se explica en el documento PCT/EP2005/056871 o en la bibliografía, tal como se resume a continuación.

Se detectaron los anticuerpos neutralizantes de CMVh según un ensayo de microneutralización de CMVh basándose en fibroblastos de pulmón embrionario humano (células HELF) y la cepa AD169 de CMVh (una cepa de

laboratorio de CMVh de la ATCC, cod. VR-538).

Los ensayos de microneutralización de CMVh también se realizaron con la cepa VR1814 de CMVh endoteliotrópica, un derivado de un aislado clínico recuperado de un frotis cervicouterino de una mujer embarazada (Revello M *et al.*, 2001), y células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Se obtuvieron estas células mediante tratamiento enzimático de venas de cordón umbilical y se cultivaron en medio de crecimiento endotelial (EGM-2, Cambrex Bio Science) complementado con suero bovino fetal al 2% (FBS), factor de crecimiento endotelial vascular recombinante humano (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), factor de crecimiento de insulina (IGF-1), hidrocortisona, ácido ascórbico, heparina, gentamicina y anfotericina B, (1 µg/ml cada uno). Se realizaron experimentos con células en el pase 2-6.

El uso de células HELF y HUVEC para estudiar la infección y replicación de CMVh usando cepas clínicas y de laboratorio se ha descrito en muchos artículos (Gerna G *et al.*, 2002). En el presente caso, las células se sembraron en placa (2,0-2.Sx10⁴/pocillo) en pocillos de fondo plano de una placa de 96 pocillos en 100 µl de medio de crecimiento, que contenía medio mínimo esencial (MEM; Gibco-BRL) con suero de ternero fetal al 10% (FCS), piruvato de sodio 1 mM (NaP) y GPS (glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml). Se cultivaron las células durante 24 horas a 37°C.

Se incubaron cincuenta µl de muestras que contenían anticuerpos (suero humano, sobrenadantes de cultivo celular, o de IgG recombinante o natural purificada con proteína A a las concentraciones indicadas) con la cepa de laboratorio AD169 de CMVh [500 unidades formadoras de placa (ufp) en 50 µl de MEM con FCS al 5%; el volumen total de la mezcla era de 100 µl] durante 1 hora a 37°C. Entonces se añadió la mezcla de preparación de anticuerpos y virus a monocapas de células HELF (para cepas AL-1 y AD169 de CMVh) o monocapas de células HUVEC (para VR1814 de CMVh) y se incubaron durante 1 hora. Se desechó el medio de crecimiento de las monocapas celulares y se reemplazó por la mezcla de anticuerpos-virus. Entonces se centrifugaron las placas a 2.000 g durante 30 minutos y se incubaron durante 90 minutos a 37°C en CO₂ al 5%. Se añadió medio de crecimiento (100 µl) y se mantuvieron los cultivos en el incubador durante otras 72 horas.

Se midió el efecto de los sobrenadantes de células B sobre la infectividad de CMVh tiñendo antígenos tempranos intermedios de CMVh (IEA, IE1 + IE2) mediante tinción con inmunoperoxidasa indirecta. Se fijaron las monocapas celulares con disolución de acetona/metanol (almacenada a -20°C) durante 1 minuto, entonces se lavaron con PBS. Se permeabilizaron las células en Triton X-100 al 0,1% en PBS con H₂O₂ al 1%, 5 minutos sobre hielo, entonces se lavaron con PBS. Se bloqueó la peroxidasa endógena con PBS con metanol al 50% y H₂O₂ al 0,6%, 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y entonces se lavó con PBS. Se añadieron cincuenta µl de agente de bloqueo de proteínas (Ultra Tech HRP 500-600 Test; sistema de detección universal de estreptavidina-biotina; PN IM2391) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y entonces se eliminaron mediante lavado con PBS. Se añadió anticuerpo de ratón anti-IEA de CMVh (clon E13; Argene Biosoft; ref. 11-003) a los pocillos durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar, se incubaron las células con 50 µl de anticuerpo secundario anti-IgG humana, conjugado con biotina (Ultra Tech HRP 500-600 Test; sistema de detección universal de estreptavidina-biotina; PN IM2391) o anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Ultratech HRP) durante 10 minutos. Se añadió sustrato DAB (Merck; n.º 1.02924.0001) en H₂O₂ al 0,1% durante 30-45 minutos a 20°C en la oscuridad y se detuvo la reacción mediante dilución con PBS. Se contaron los núcleos positivos para IEA bajo el microscopio.

Como control negativo, se usaron medio solo o sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpos de IgG irrelevantes. Como control positivo, se usó una preparación comercial de IgG humana, purificada a partir del suero de pacientes seropositivos para CMVh (Cytotect; Biotest), con diluciones progresivas, comenzando a 125 µg/ml. La positividad se definió como ≥ 40% de inhibición de células positivas para IEA en comparación con los pocillos de control negativo.

El criterio de valoración del 50% de inhibición calculado usando el método de Reed-Münch se considerará el título de neutralización (TN):

TN = dilución de anticuerpos recíproca [$>50\%$ de inhibición] x $[(\% \text{ de inhibición superior al } 50\% - 50\%)/(\% \text{ de inhibición superior al } 50\% - \% \text{ de inhibición inferior al } 50\%)]$

Selección de donantes humanos basándose en la presencia en el suero de IgG que se une a regiones de las glicoproteínas gB o gH de la envuelta de CMVh

Los ensayos de unión específicos de CMVh se han realizado tal como se resume en el documento PCT/EP2005/056871 o como se indica por el fabricante, y se han validado con una mezcla comercial de anticuerpos de IgG específicos para CMV (Cytotect; Biotest). Se sometió a prueba el suero en un ELISA específico para proteínas del virión de CMVh que se unen a IgG humana que está comercialmente disponible (BEIA-CMV IgG Quant; Bouty, cod. 21465) y un ELISA de IgG frente a gB (AD2) de CMVh, también comercialmente disponible (antígeno CG3 Biotest AG, cod. 807035; figura 1A).

En resumen, se colocaron tiras rompibles cubiertas con una mezcla de proteínas de CMVh inactivadas (derivadas de la cepa de laboratorio AD169) en microplacas y se incubaron con sobrenadantes de células B diluidos 1:81 (10 µl de sobrenadantes añadidos a 800 µl de diluyentes de muestra del sistema BEIA), y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras un ciclo de lavado, se añadió anticuerpo monoclonal anti-IgG humana
 5 previamente diluido conjugado con peroxidasa del rábano (100 µl) y se incubó la placa a temperatura ambiente durante otros 30 minutos. Tras un segundo ciclo de lavado, se añadió disolución de sustrato-TMB previamente diluida (100 µl) y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se detuvo la reacción usando la disolución de parada (100 µl/pocillo) y se midió la densidad óptica en bicromatismo a 450/620 nanómetros.

10 *Producción del cultivo de células B humanas inmortalizadas*

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un paciente recuperado de una infección aguda por CMVh (CMV7) seleccionado por la presencia de anticuerpos neutralizantes de CMVh en el suero. El proceso de inmortalización por VEB al que posteriormente se expusieron las PBMC del paciente CMV7 se ha
 15 realizado según las enseñanzas del documento PCT/EP2005/056871. En resumen, se purificaron PBMC de sangre periférica mediante centrifugación en gradiente de densidad convencional sobre Ficoll/Hypaque. Se aislaron células CD22-positivas a partir de PBMC recientes (>90% de pureza) con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CD22 humana mediante la técnica VarioMACS (Miltenyi Biotec Inc.) tal como describe el fabricante. Se estimularon las células purificadas con una combinación de CpG2006 (Coley, 1 µg/ml) e IL-2 (Roche, 200 U/ml). Tras una
 20 estimulación de 4 días, se lavaron las células con medio de cultivo nuevo (RPMI-1640) y se enriquecieron altamente las células B en células positivas para IgG con perlas recubiertas con anticuerpo anti-IgG humana usando la técnica VarioMACS (Miltenyi Biotec Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se suspendieron las células seleccionadas y estimuladas y se mantuvieron en medio de cultivo celular RPMI-1640
 25 complementado con FCS inactivado por calor al 10% (v/v) (suero de ternero fetal), piruvato de sodio 1 mM, estreptomycin 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml, en placas de 24 pocillos a 37°C y CO₂ al 5%. Se realizó la inmortalización por VEB usando sobrenadante de células B95.8 (1:1 v/v durante 16 horas).

Al final del proceso, se lavaron las células inmortalizadas con medio de cultivo nuevo (RPMI 1640 con suero de ternero fetal al 10%) y se pusieron en cultivo durante 3 semanas a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/ml en placas de
 30 24 pocillos con una capa alimentadora (PBMC alogénicas irradiadas sembradas a 5×10^5 células/pocillo), sin CpG2006 (y no con CPG2006 tal como se describe en el documento PCT/EP2006/069780 para el proceso comenzado a partir de PBMC obtenidas del donante CMV5).

35 *Selección de subcultivos de células B humanas inmortalizadas que secretan anticuerpos neutralizantes de CMVh*

Quince días tras la exposición al VEB, se confirmó la actividad neutralizante de CMVh en el cultivo celular policlonal, expandido, con el ensayo de microneutralización basado en AD169/HELFL descrito anteriormente. Entonces, se sembraron las células a 20 células/pocillo sobre PBMC (50000/pocillo) alogénicas, irradiadas (30 Gy), en 100 µl de
 40 IMDM con FCS al 10% y aminoácidos no esenciales (AANE, diluidos 1X a partir de una disolución madre comercial 100X; EuroClone) en ausencia de CpG2006 e IL-2. Se generó un total de 4224 subcultivos y, tras dos semanas, se añadieron 50 µl del mismo medio. Tras 1-2 semanas adicionales de cultivo, se sometieron a prueba en paralelo los sobrenadantes de cultivos celulares que presentaban células en crecimiento y agregadas usando el ensayo de neutralización de CMVh basado en células HELFL y la cepa AD169 de CMVh.

Se sometieron a prueba los sobrenadantes de cultivos celulares que presentaban actividad neutralizante de CMVh usando los ELISA para detectar la unión de IgG humana a regiones de la glicoproteína de la envuelta de CMVh gB,
 45 o las proteínas de CMVh totales descritas anteriormente.

Alternativamente, se generaron antígenos basados en gB o gH como proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa (GST). En el caso del antígeno gB(Ag)-GST, se fusionó la región inmunodominante de gB de la cepa C194 de CMVh con GST (BioDesign, nº de cat. R18102; purificado por afinidad sobre GS-4B Sepharose, 1 mg/ml). En el caso del antígeno gH(Ag)-GST, se clonó el fragmento de la glicoproteína gH de la cepa VR1814 de CMVh mediante PCR, se fusionó con el gen de GST, se produjo en *E. coli* y se purificó a partir del lisado celular bacteriano basándose en la
 55 afinidad de GST. El antígeno gH(Ag)-GST recombinante corresponde a una fusión en marco entre la región amino-terminal de gH (aminoácidos 16-144; figura 1B) de la cepa VR1814 de CMVh y GST. Como control negativo se usó GST sola.

Estos ELISA se realizaron aplicando un protocolo de ELISA común en un formato de 96 pocillos con modificaciones menores. En resumen, se diluye el antígeno a 2 µg/ml en PBS y se usaron 50 µl de esta disolución de proteína (que contenía 100 ng de la proteína de fusión expresada en bacterias) para recubrir placas de poliestireno EIA (Nunc; n.º de cat. 469949). El recubrimiento de las placas para ELISA se realizó durante la noche a 4°C, entonces, tras eliminar la disolución de proteínas, se lavaron las placas cuatro veces con 150 µl de tampón de lavado (PBS que contenía un 0,05% de Tween 20). Se realizó un tratamiento para bloquear la unión no específica dosificando entonces 100 µl de

PBS que contenía un 1% de leche en cada pocillo durante 1 hora a 37°C. Tras cuatro ciclos de lavado con 150 µl de tampón de lavado, se incubaron 50 µl de sobrenadantes de cultivos celulares en cada pocillo durante 2 horas a 37°C, usando 50 µl/pocillo del medio de cultivo celular como control negativo. Tras cuatro ciclos de lavado, se dosificaron 50 µl del anticuerpo secundario [anticuerpo de cabra anti-IgG humana (específico de Fc) conjugado con peroxidasa del rábano; diluido 1:30.000 en tampón de lavado; Sigma, n.º de cat. A0170] en cada pocillo y se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras cuatro ciclos de lavado adicionales, se desarrolló la reacción enzimática añadiendo 50 µl de sustrato-TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina; Sigma, n.º de cat. T0440) en cada pocillo durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción cromogénica dosificando 100 µl de disolución de parada (ácido sulfúrico 1 N) en cada pocillo y se leyó la densidad óptica a 450 nm.

Resultados

Se obtuvieron PBMC humanas de un paciente con CMVh (CMV7) que presentaba un título de neutralización de CMVh significativo en suero (50% de neutralización a una dilución de 1:105), junto con una fuerte reactividad en un ELISA (positivo a una dilución de 1:64, una muestra se considera positiva para la presencia de IgG anti-gB a diluciones de 1/4 o superiores) basándose en la unión a los dominios AD2 de la glicoproteína B, uno de los antígenos de CMVh mejor caracterizados por provocar anticuerpos neutralizantes en suero (Qadri I *et al.*, 1992; Kropff B *et al.*, 1993), y se clonó dentro el antígeno CG3 (figura 1A). Además, los sueros de CMV7 fueron positivos en otro ELISA usando las proteínas del virión de CMVh totales, en el que se midió una actividad de 74 UA/ml (una muestra se considera positiva en cuanto a la presencia de IgG anti-CMVh cuando el resultado es al menos de 10 UA/ml).

Se usaron B células del paciente CMV7 para generar un cultivo de células policlonales, inmortalizadas altamente enriquecido en células B que secretan IgG usando el método de inmortalización basado en VEB dado a conocer en los documentos PCT/EP2005/056871 y PCT/EP2006/069780. En comparación con este último documento, que describe la selección de anticuerpos anti-CMVh a partir de otro donante (CMV5), se prepararon los subcultivos a partir de la población policlonal, en masa original, de células inmortalizadas en ausencia de CpG2006 y en primer lugar se seleccionaron los sobrenadantes para determinar la presencia de anticuerpos que neutralizaran la infectividad de CMVh mediante el ensayo de microneutralización, y sólo más tarde para detectar anticuerpos que se unan a los antígenos de CMVh seleccionados.

Se aplicó el ensayo de microneutralización de CMVh sólo a subcultivos que demostraron crecer activamente con agrupamientos de células a las 3 semanas de cultivo. En primer lugar, se examinaron los sobrenadantes de los 324 pocillos en el ensayo de neutralización de CMVh, de entre éstos, se encontró que 20 sobrenadantes reducían la infectividad de la cepa AD169 de CMVh en al menos el 40%. Cuando se caracterizaron las actividades de unión a CMVh en estos pocillos, sólo se encontraron dos positivos para gB (o bien como antígeno CG3 o bien como una proteína de fusión de gB(Ag)-GST), ninguno para gH (como una proteína de fusión de gH(Ag)-GST; figura 1B) y 18 pocillos para ninguna de ellas (figura 2).

Debido al bajo número de células inicialmente sembradas en cada pocillo (20 células/pocillo), cada subcultivo que presentaba actividad neutralizante de CMVh posiblemente producirá anticuerpos monoclonales (es decir, secretados por células originadas mediante clonación por una única célula inmortalizada, específica), especialmente dada la baja frecuencia de células en la población de células policlonales, inmortalizadas, que se espera que crezcan y secreten IgG neutralizante de CMVh. Se diseñaron actividades experimentales adicionales para confirmar esta suposición.

Ejemplo 2: Caracterización del anticuerpo de 26A1

Materiales y métodos

Expansión y caracterización del subcultivo 26A1

Se expandieron las células del subcultivo 26A1 original sobre PBMC alogénicas irradiadas en medio IMDM (con FCS al 10% y AANE), y se confirmó la actividad neutralizante de CMVh al menos dos veces durante esta etapa de expansión usando el ensayo de microneutralización de CMVh, tal como se describe en el ejemplo 1 (véase la tabla 1).

Se determinó la cantidad de anticuerpo secretado por el subcultivo 26A1 a las 24, 48 y 72 horas usando un kit de ELISA para IgG humana cuantitativo comercial (Immunotek; cod. 0801182; Zeptometrix Corp.) según las instrucciones del fabricante. Se determinó la subclase del anticuerpo de 26A1 usando un ensayo comercial (kit combinado de ELISA para subclase de IgG humana PeliClass; cod. n.º RDI-M1551 cib, RDI Divison of Fitzgerald Industries Intl.).

Se expandió gradualmente el cultivo celular sembrando las células contenidas en 1 pocillo de una placa de 96 pocillos ($\approx 1 \times 10^5$) en un pocillo de una placa de 48 pocillos sobre PBMC alogénicas irradiadas en IMDM con FCS al

5%. Tras 5-7 días, se expandieron las células en un pocillo de una placa de 24 pocillos en ausencia de capa alimentadora, en IMDM con PCS al 5%. Entonces, se sembraron en placa células (5×10^5 /ml) en una placa de 6 pocillos en ausencia de capa alimentadora en IMDM al 50% e hibridoma-SFM al 50% (Gibco, cod. 12045-084) con FCS al 2,5%. Se cultivaron las células en estas condiciones durante al menos una semana. Entonces se lavaron las células en crecimiento exponencial y se cultivaron en frascos T75 en hibridoma-SFM a una concentración que oscilaba entre 5×10^5 y 10^6 /ml. Se recogió el sobrenadante de cultivo celular, se cuantificó IgG y se purificó en columnas de proteína A, se dializó frente a tampón PBS y se filtró ($0,2 \mu\text{M}$).

Caracterización del anticuerpo secretado por el subcultivo 26A1

Se describieron los ensayos de ELISA basados en gH, basados en gB y de BEIA-CMV en el ejemplo 1 (figuras 1 y 2). El ensayo de VHS se realizó según la bibliografía (Laquerre S *et al.*, 1998).

El ensayo de reducción de placas de CMVh se realizó usando la cepa AD169 de CMVh. En resumen, se diluyó el virus hasta 1000 UFP/reacción. Se mezclaron cantidades iguales (0,1 ml) de virus y cada anticuerpo o sobrenadante de cultivo celular y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se añadieron las mezclas a monocapas de células HELF (en placas de 24 pocillos) y se dejaron adsorber durante 1 hora a 37°C . Entonces se retiró la mezcla de anticuerpos-virus, y se añadió recubrimiento de metilcelulosa al 1%-MEM-FCS al 2% a las células infectadas. Las placas se contarán como una medida de la infectividad en el día 10 ó 12 tras la infección.

Se sometió a prueba el sobrenadante de cultivo celular de 26A1 en inmunofluorescencia sobre células HUVEC o HELF no infectadas. En resumen, se sembraron células (7×10^4 /ml) en cubreobjetos de vidrio recubiertos de gelatina en placas de 24 pocillos en MEM con FCS al 10% y entonces se hicieron crecer hasta semiconfluencia. Entonces, se lavaron las células dos veces con PBS caliente, se fijaron con una mezcla enfriada previamente (a -20°C) del 50% de acetona/50% de metanol durante 1 minuto a temperatura ambiente (TA) y entonces se lavaron con PBS. Se permeabilizaron las células fijadas con Triton X-100 al 0,2% en PBS durante 20 minutos sobre hielo, se lavaron con PBS y se incubaron durante 15 minutos a TA con una disolución de bloqueo (PBS con FCS al 2%). Alternativamente, no se permeabilizaron las células fijadas para determinar la capacidad de los anticuerpos para reconocer componentes de la superficie celular. En este caso, se lavaron las células fijadas con PBS, se incubaron durante 15 minutos a TA con una disolución de bloqueo (PBS con FCS al 2%) y se incubaron con sobrenadante de cultivo celular de 26A1 ($80 \mu\text{l}$), durante 2 horas a 37°C . Entonces se lavaron las células con PBS caliente (3 veces) y se incubaron con $80 \mu\text{l}$ de F(ab')₂ de conejo anti-IgG humana conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch), para seguir la tinción de IgG humana como color verde. Se diluyeron los anticuerpos secundarios 1:50 en PBS con Tween 80 al 0,05% y se añadieron a las células durante 1 hora a 37°C en la oscuridad. Entonces, se lavaron las células con PBS caliente (3 veces) y se sometieron a contratinción con yoduro de propidio ($0,25 \mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS; Sigma). Se montaron los cubreobjetos sobre un portaobjetos de microscopio usando el medio de montaje (Vector Laboratories). Se registraron imágenes con un microscopio de barrido láser confocal invertido Fluoview-IX70 de Olympus.

Caracterización de la secuencia de ADN/proteína de IgG de 26A1 y expresión recombinante

Se usó una alícuota del cultivo celular, que resultó de la expansión del cultivo celular 26A1 inicial, para secuenciar las regiones variables de la cadena pesada (VH) y la cadena ligera (VL) del anticuerpo de 26A1 según la tecnología establecida por Fusion Antibodies Ltd. Se usaron sedimentos de células congeladas (que contenían al menos 50.000 células) para extraer el ARN total. Se produjo el ADNc correspondiente mediante transcripción inversa con un cebador de oligo(dT). Se configuraron las reacciones de PCR para amplificar la región VH usando una mezcla de cebadores específicos de IgG, y la región VL con una mezcla de cebadores de Igk/ λ . Se clonaron los productos de PCR de las dos reacciones de amplificación usando un sitio de restricción *Eco RI* en un vector de secuenciación (pCR2.1; Invitrogen) y se usaron para transformar células *E. coli* TOP10.

Se recogieron al menos diez colonias seleccionadas obtenidas de las dos transformaciones y se analizaron mediante secuenciación. Se alinearon las secuencias de ADN resultantes y se tradujeron en secuencia de proteína generando una secuencia de proteína y de ADN consenso para VH 26A1 (SEQ ID NO.: 4 y SEQ ID NO.: 5, respectivamente) y VL 26A1 (SEQ ID NO.: 9 y SEQ ID NO.: 10, respectivamente). Se compararon las secuencias de proteína VH 26A1 y de VL 26A1 y se alinearon con secuencias presentes en bases de datos en el dominio público (usando las bases de datos GenomeQuest, GeneSeq y EBI). Se pronosticaron las CDR que caracterizaban las secuencias de proteína de VH 26A1 (SEQ ID NO.: 5, 7, y 8) y VL 26A1 (SEQ ID NO.: 11, 12, y 13) mediante la base de datos de IMGT (Giudicelli V *et al.*, 2004).

Se expresó anticuerpo monoclonal de 26A1 humano recombinante en células eucariota clonando las secuencias de región variable de la cadena ligera y pesada de 26A1 consenso en el mismo vector de expresión, que ya contenía las regiones constantes correspondientes (para la cadena pesada de IgG1 humana y la cadena lambda de Ig humana), y un vector de promotor doble que permite la expresión de ambas cadenas de anticuerpo. Se confirmó la secuencia completa del anticuerpo monoclonal de 26A1 humano recombinante en el vector mediante secuenciación de ADN y se usó para transfectar de manera transitoria células CHO DG44 (Derouazi M *et al.*, 2006) que se adaptaron para crecer en un cultivo en suspensión libre de suero y se sembraron a 1×10^6 células por ml en un

frasco centrifugador de 125 ml. Se realizó la transfección con una mezcla de 300 µg de vector de expresión con 900 µg de poli(etilénimina) de 25 kDa. Se incubaron las células a 37°C en CO₂ al 5% durante 6 días en el frasco centrifugador antes de recogerse los medios. Se purificó el anticuerpo recombinante usando una columna de proteína G en una unidad de cromatografía Akta Prime siguiendo el programa convencional del fabricante.

5

Resultados

Entre los subcultivos que contenían células en crecimiento y que secretaban IgG, los sobrenadantes de cultivo celular de algunos de ellos contenían anticuerpos que neutralizan la infección por CMVh pero no presentaban una unión significativa a los antígenos recombinantes específicos gB y gH sometidos a prueba mediante ELISA (figura 1 y 2). En particular, el subcultivo 26A1, que secreta una IgG1, mostraba la actividad de neutralización más fuerte y más reproducible de CMVh, y se eligió para una caracterización molecular y biológica más detallada.

10

Se confirmó la unión de la IgG presente en el sobrenadante del subcultivo 26A1 a CMVh usando un ELISA que contenía una mezcla de proteínas de CMVh (BEIA-CMV). Al mismo tiempo, este sobrenadante mostró una actividad neutralizante de CMVh significativa frente a diferentes cepas de CMVh en dos sistemas de célula huésped humanos (tal como se muestra en la tabla 1). Esta actividad no se observó cuando se usó el sobrenadante en un ensayo de neutralización específico de VHS.

15

Además, el subcultivo 26A1 se ha expandido y subclonado adicionalmente a 10 células/pocillo para confirmar su monoclonalidad en cuanto a la expresión de IgG1 humana, neutralizante de CMVh. De hecho, entre los pocillos que muestran crecimiento celular, todos presentaban una actividad neutralizante que oscilaba entre el 50 y el 98% en el ensayo basado en AD169 original, confirmando los resultados obtenidos con el subcultivo 26A1 original.

20

Se usaron las células en el subcultivo 26A1 original para aumentar a escala la producción de IgG, generando cultivos progresivamente más grandes a partir de los cuales pudiera purificarse IgG y someterse a prueba en ensayos de CMVh. Se generaron cultivos más grandes expandiendo gradualmente el cultivo 26A1 y eliminando algunos requisitos para el crecimiento en cultivo celular (tal como la capa alimentadora, suero de ternero fetal). Usando este enfoque, se demostró que cultivos celulares más grandes generados a partir de subcultivo 26A1 original secretan IgG1 a una concentración de aproximadamente 16 µg/ml/10⁶ células. Estos cultivos más grandes mostraron un tiempo de duplicación de 4 días, incluso en ausencia de capa alimentadora, y se mantuvo la actividad neutralizante de CMVh en cultivo durante más de 2 meses.

25

Se repitieron los ensayos de neutralización de CMVh con el anticuerpo de 26A1, en forma de IgG humana purificada mediante cromatografía de afinidad a partir de un cultivo celular grande. Se sometió a prueba IgG de 26A1 en experimentos de respuesta a la dosis para evaluar la concentración requerida para lograr el 50% de inhibición (concentración inhibidora 50, o CI50) de la infectividad del CMVh, usando dos ensayos con diferentes combinaciones de cepas de CMVh y células diana humanas. Los resultados mostraron que la potente actividad neutralizante de la IgG de 26A1 natural purificada con proteína A no es ni de tipo celular ni específica de la cepa viral, y puede evaluarse cuantitativamente que proporciona valores de CI50 de aproximadamente 1 µg/ml y un efecto neutralizante próximo al 100% en ambos ensayos (figura 3).

35

Al comparar la actividad neutralizante de la IgG de 26A1 natural purificada con proteína A con la de una preparación comercial de IgG hiperinmune (IVIg) frente a CMVh (Cytotect, Biotest) frente al aislado clínico en células HUVEC, la CI50 de 26A1 es 25 veces inferior a la requerida para esta preparación comercial, demostrando la potente actividad neutralizante del anticuerpo de 26A1.

45

Con el fin de excluir que la actividad neutralizante presente en el sobrenadante del subcultivo 26A1 se deba a la unión a una molécula de la superficie celular, se sometió a prueba el sobrenadante en inmunofluorescencia con células HELF o HUVEC no infectadas. Este ensayo mostró que la IgG1 producida por el cultivo 26A1 no se une a las células humanas no infectadas. Cuando se somete a prueba el mismo sobrenadante celular en ELISA frente a antígenos de CMVh relevantes, el anticuerpo no se une a tales proteínas (figura 4), indicando que posiblemente el anticuerpo de 26A1 reconoce otro antígeno indeterminado sobre la envuelta de CMVh induciendo la producción de anticuerpos neutralizantes.

50

Se confirmó adicionalmente la monoclonalidad del anticuerpo neutralizante de CMVh secretado en los cultivos celulares derivados de 26A1 mediante secuenciación de productos de PCR específicos de IgG obtenidos de este cultivo celular. Se prepararon sedimentos celulares para la extracción de ARN y la transcripción inversa usando células originadas a partir del subcultivo 26A1. Entonces se usó el ADNc resultante para amplificar las secuencias de VH y VL usando cebadores específicos para las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de IgG humana, respectivamente. Entonces se clonaron en plásmidos los productos de PCR que se usaron para transformar células bacterianas. Se recogieron al azar transformantes bacterianos y se usaron para secuenciar los productos de PCR clonados. Todos los clones mostraron la misma secuencia de ADN, aparte de diferencias menores debidas posiblemente a error inducido por la PCR, permitiendo la determinación de secuencias consenso y CDR para las regiones variables de la cadena pesada (figura 5) y cadena ligera (figura 6) del anticuerpo monoclonal

65

de 26A1 humano.

Las secuencias que codifican para las regiones VH y VL del anticuerpo de 26A1 pueden volver a clonarse en vectores de expresión para la expresión apropiada de regiones variables de 26A1 como un fragmento de anticuerpo (Fab o ScFv) o dentro de un anticuerpo recombinante, completamente humano que tiene un isotipo y subclase específicos (por ejemplo IgA, IgG1 o IgG4). Estos anticuerpos recombinantes pueden entonces someterse a prueba para confirmar la actividad neutralizante de CMVh específica en los ensayos apropiados.

Se produjo el anticuerpo monoclonal de 26A1 humano en células eucariotas como una IgG1 humana recombinante clonando el ADN que codifica para la cadena pesada (figura 7) y cadena ligera (figura 8) en un vector de expresión apropiado que se ha usado para transfectar células CHO en experimentos de expresión transitoria. Se purificó mediante afinidad el anticuerpo monoclonal de 26A1 humano recombinante mediante sobrenadantes de cultivo celular y se sometió a prueba en diferentes ensayos para determinar la neutralización de CMVh. Se realizaron las pruebas con el sistema celular AD169/HELFL en un ensayo tanto de microneutralización como de reducción de placas. El anticuerpo monoclonal de 26A1 humano recombinante neutralizó eficazmente la infectividad de CMVh de una manera comparable con el anticuerpo de 26A1 natural purificado con proteína A con una CI50 calculada de aproximadamente 1 µg/ml (figura 9). Las pruebas se continuaron también en ensayos de neutralización y reducción de placas basándose en diferentes combinaciones de cepas de CMVh y células diana, confirmando todas ellas la eficacia comparable del anticuerpo monoclonal de 26A1 tanto natural como recombinante (figura 10).

Por tanto, el anticuerpo de 26A1, en forma de anticuerpo monoclonal o bien natural o bien recombinante, es un anticuerpo que puede usarse para el tratamiento clínico de la infección por CMVh y de una infección relacionada con CMVh.

Cepa de CMVh	Línea celular humana	Inhibición de la infección por CMVh usando sobrenadante del cultivo celular 26A1 ^a
AD169 ^b	HELFL	++++
VR1814 ^c	HELFL	++
AL-1 ^d	HELFL	+++
VR1814 ^c	HUVEC	++++

^a +, ++, +++, y ++++ corresponden al 20-40%, 41-60%, 61-80% y más del 80% de inhibición de la infección por CMVh, respectivamente
^b cepa de laboratorio de CMVh (de la ATCC, código VR-538)
^c un derivado endoteliotrópico de un aislado clínico recuperado de un frotis cervicouterino de una mujer embarazada infectada con CMVh (Revello M *et al.*, 2001)
^d derivado de un aislado clínico recuperado de un líquido de lavado broncoalveolar de un receptor de trasplante de pulmón infectado con CMVh (Luganini A *et al.*, no publicado)

BIBLIOGRAFÍA

- Aldrich T *et al.*, (2003). *Biotechnol Prog.* 19: 1433-8.
- Arizono H *et al.*, (1994). *Arzneimittelforschung.* 44: 909-13.
- Baldanti F y Gerna G, (2003). *J Antimicrob Chemother.* 52: 324-30.
- Barrios Y *et al.*, (2004). *J Mol Recognit.* 17: 332-8.
- Barry P *et al.*, (2006). *ILAR J.* 47: 49-64.
- Bayry J *et al.*; (2007). *Nat Clin Pract Neurology.* 3:120-1.
- Bendtsen J *et al.*, (2004). *J Mol Biol.* 340: 783-95.
- Bianchi A y McGrew J (2003). *Biotechnol Bioeng.* 84 : 439-44.
- Boeckh M *et al.*, (2001). *Biol. Blood Marrow Transplant.* 7: 343-351.
- Bohm E *et al.*, (2004). *Biotechnol Bioeng.* 88: 699-706.
- Bonaros N *et al.*, (2004). *Transplantation.* 77: 890-7.

- Bond C *et al.*, (2003). *J Mol Biol.* 332: 643-55.
- 5 Brereton H *et al.*, (2005). *Br J Ophthalmol.* 89: 1205-9.
- Britt W y Mach M, (1996). *Intervirology.* 39: 401-12.
- Butler M, (2005). *Appl Microbiol Biotechnol.* 68: 283-91.
- 10 Carton J *et al.*, (2007). *Protein Expr Purif.* 55: 279-86.
- Castle P *et al.*, (2002). *J Reprod Immunol.* 56: 61-76.
- Chapman A *et al.*, (1999). *Nat Biotechnol.* 17: 780-3.
- 15 Chatenoud L, (2005). *Methods Mol Med.* 109: 297-328.
- Cinatl J *et al.*, (2004). *FEMS Microbiol Rev.* 28: 59-77.
- 20 Coaquette A *et al.*, (2004). *Clin Infect Dis.* 39: 155-61.
- Dar L, (2007). *Indian J Med Res.* 126: 99-100.
- De Clercq E, (2003). *J Antimicrob Chemother.* 51: 1079-83.
- 25 Derouazi M *et al.*, (2006). *Biochem Biophys Res Commun.* 340: 1069-77.
- Dinnis D y James D, (2005). *Biotechnol Bioeng.* 91: 180-9.
- 30 Dunman P y Nesin M, (2003). *Curr Opin Pharmacol.* 3: 486-96.
- Eggers M *et al.*, (1998). *J Med Virol.* 56: 351-8.
- Fang J *et al.*, (2005). *Nat Biotechnol.* 23: 584-90.
- 35 Forthal D *et al.*, (2001). *Transpl Infect Dis.* 3 (Supl. 2):31-4.
- Fridlender Z *et al.*, (2007). *Amer J Med Sci.* 334: 111-4.
- 40 Furebring C *et al.*, (2002). *Mol Immunol.* 38: 833-40.
- Gandhi M y Khanna R, (2004). *Lancet Infect Dis.* 4: 725-38.
- 45 Gerna G *et al.*, (2002). *J Clin Microbiol.* 40: 233-8.
- Gerna G y Lilleri D, (2006). *Herpes.* 13: 4-11.
- Gicklhorn D *et al.*, (2003). *J Gen Virol.* 84: 1859-62.
- 50 Gilbert G, (2002). *Med J Aust.* 176: 229-36.
- Gilbert C y Boivin G, (2005). *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 873-83.
- 55 Gilliland L *et al.*, (1996). *Tissue Antigens.* 47: 1-20.
- Gilpin A *et al.*, (2003). *Control Clin Trials.* 24: 92-8.
- Giudicelli V *et al.*, (2006). *Nucleic Acids Res.* 34: D781-4.
- 60 Goodrum F *et al.*, (2002). *PNAS.* 99: 16255-60.
- Gosselin J *et al.*, (2005). *J Immunol.* 174: 1587-93.
- 65 Greijer A *et al.*, (1999). *J Clin Microbiol.* 37: 179-88.

- Griffiths P, (2004). *Herpes*. 11 (Supl. 2): 95A-104A.
- Griffiths P y Walter S, (2005). *Curr Opin Infect Dis*. 18: 241-5.
- 5 Grote A *et al.*, (2005). *Nucleic Acids Res*. 33: W526-31.
- Grunberg J *et al.*, (2003). *Biotechniques*. 34: 968-72.
- 10 Hamrock D, (2006). *Int Immunopharmacology*. 6: 535-42.
- Han X, (2007). *J Clin Microb*. 45: 1126-32.
- Harris R *et al.*, (2004). *Drug Development Research*. 61: 137-154.
- 15 Hebart H y Einsele H, (2004). *Hum Immunol*. 65: 432-6.
- Horenstein A *et al.*, (2003). *J Immunol Methods*. 275: 99-112.
- 20 Huse K *et al.*, (2002). *J Biochem Biophys Methods*. 51: 217-31.
- Jain M *et al.*, (2007). *Trends Biotechnol*. 25: 307-16.
- Jensen L *et al.*, (2004). *J Immunol Methods*. 284: 45-54.
- 25 Kalil A *et al.*, (2005). *Ann Intern Med*. 143: 870-80.
- Keller M y Stiehm E, (2000). *Clin Microbiol Rev*. 13: 602-14.
- 30 Kim S *et al.*, (2005). *Mol Cells*. 20: 17-29.
- Kiss C *et al.*, (2006). *Nucleic Acids Res*. 34: e132.
- Klein M *et al.*, (1999). *J Virol*. 73: 878-86.
- 35 Klenovsek K *et al.*, (2007). *Blood*. 110: 3472-9.
- Knappik A *et al.*, (2000). *J Mol Biol*. 296: 57-86.
- 40 Kocher A *et al.*, (2003). *J Heart Lung Transpl*. 22: 250-7.
- Kropff B *et al.*, (1993). *J Med Virol*. 39: 187-95.
- Kruger R *et al.*, (2003). *J Heart Lung Transpl*. 22: 754-63.
- 45 Ladner R, (2007). *Nature Biotechnol*. 25: 875-77.
- Laffly E y Sodoyer R, (2005). *Hum Antibodies*. 14: 33-55.
- 50 Lam V *et al.*, (2006). *Biotechnol Bioeng*. 93: 1029-39.
- Landolfo S *et al.*, (2003). *Pharmacol Ther*. 98: 269-97.
- Laquerre S *et al.*, (1998). *J Virol*. 72 : 6119-6130.
- 55 Lazzarotto T *et al.*, (2007). *J. Clin Vir*. Doi :10.1016/j.jcv.2007.10.015.
- Levi M *et al.*, (2000). *AIDS Res Hum Retroviruses*. 16: 59-65.
- 60 Lobo E *et al.*, (2004). *J Pharm Sci*. 93: 2645-68.
- Logtenberg T, (2007). *Trends Biotechnol*. 25: 390-4.
- Ma J *et al.*, (2005). *Vaccine*. 23: 1814-8.
- 65

- Mantis N *et al.*, (2007). *J Immunol.* 179: 3144-52.
- McLean G *et al.*, (2006). *Mol Immunol.* 43: 2012-22.
- 5 Marasco W y Sui J, (2007). *Nat Biotechnol.* 25: 1421-34.
- Marshall G *et al.*, (2000). *Viral Immunol.* 13: 329-41.
- Matsumoto Y *et al.*, (1986). *Bioch Biophys Res Commun.* 137: 273-280.
- 10 Munger J *et al.*, (2007). *PLoS Pathogens.* 2: 1165-1175.
- Murray A *et al.*, (2002). *J Chromatogr Sci.* 40: 343-9.
- 15 Nilsson J *et al.*, (1997). *Protein Expr Purif.* 11: 1-16.
- Navarro D *et al.*, (1997). *J Med Virol.* 52: 451-9.
- Nigro G *et al.*, (2005). *N Engl J Med.* 353: 1350-62.
- 20 Nilsson J *et al.*, (1997). *Protein Expr Purif.* 11: 1-16.
- Nisnevitch M y Firer M, (2001). *J Biochem Biophys Methods.* 49: 467-80.
- 25 O'Brien S *et al.*, (2006). *Clin Lymphoma Myeloma.* 7: 125-30.
- Ohlin M *et al.*, (1993). *J Virol.* 67: 703-10.
- Phillips A *et al.*, (2007). *Brain Behav Immun.* Doi :10.1016/j.bbi.2007.06.012.
- 30 Puius Y y Snyderman D, (2007). *Curr Opin Infect Dis.* 20: 419-24.
- Qadri I *et al.*, (1992). *J Gen Virol.* 73: 2913-21.
- 35 Rasmussen L *et al.*, (1991). *J Infect Dis.* 164: 835-42.
- Reinhardt B *et al.*, (2003). *J Virol Methods.* 109: 1-9.
- Revello M *et al.*, (2001). *J Infect Dis.* 184: 1078-81.
- 40 Rojas G *et al.*, (2004). *J Immunol Methods.* 293: 71-83.
- Roque A *et al.*, (2004). *Biotechnol Prog.* 20 : 639-5.
- 45 Rothe M *et al.*, (2001). *J Med Virol.* 65: 719-29.
- Sandherr M *et al.*, (2006). *Ann Oncol.* 17: 1051-9.
- Scheinberg P *et al.*, (2007) *Blood.* 109: 3219-24.
- 50 Schlatter S *et al.*, (2005). *Biotechnol Prog.* 21: 122-33.
- Schleiss M, (2003). *Herpes.* 10: 4-11.
- 55 Schleiss M, (2005). *Herpes.* 12: 66-75.
- Schoppel K *et al.*, (1996). *Virology.* 216: 133-45.
- Schrader J y McLean G, (2007). *Immunol Lett.* 112: 58-60.
- 60 Shimamura M *et al.*, (2006). *J Virol.* 80: 4591-600.
- Simpson J *et al.*, (1993). *J Virol.* 67: 489-96.
- 65 Smith J *et al.*, (1995). *J Biol Chem.* 270: 30486-30490.

- Snydman D, (2006). Rev Med Virol. 16: 289-95.
- 5 Soderberg-Naucler C, (2006a). Crit Rev Immunol. 26: 231-64.
- Soderberg-Naucler C, (2006b). J Intern Med. 259: 219-46.
- Sorensen H y Mortensen K, (2005). Microb Cell Fact. 4: 1.
- 10 Stenbakkers, P. *et al.*, (1993). Human antibodies and Hybridomas. 4: 166-173.
- Streit M *et al.*, (2006). Int Wound J. 3: 171-9.
- 15 Tabrizi M y Riskos L, (2007). Drug Disc Today. 12: 540-7.
- Thomsen M *et al.*, (2005). Tissue Antigens. 66: 73-82.
- Urban M *et al.*, (1992). J Virol. 66: 1303-11.
- 20 Venturi M *et al.*, (2002). J Mol Biol. 315: 1-8.
- Verdoliva A *et al.*, (2002). J Immunol Methods. 271: 77-8.
- Xu J y Davis M, (2000). Immunity. 13: 37-45.
- 25 Wang D y Shenk T, (2005). Proc Natl Acad Sci U S A. 102: 18153-8.
- Wang X *et al.*, (2005). Nature Med. 11: 515-521.
- 30 Watkins N *et al.*, (2004). Tissue Antigens. 63: 345-54.
- Weber B *et al.*, (1993). Clin Investig. 71: 270-6.
- 35 Wiegand T y Young L, (2006). Int Ophthalmol Clin. 46: 91-110.
- Wijkhuisen A *et al.*, (2003). Eur J Pharmacol. 468: 175-82.
- Yamashita M *et al.*, (2006). Clin Exp Rheumatol. 24: 649-55.
- 40 Yoda Y *et al.*, (2006). Mod Rheumatol. 16: 137-42.
- Yoon S *et al.*, (2004). Biotechnol Prog. 20: 1683-8.

LISTA DE SECUENCIAS

- 45 <110> Ribovax Biotechnologies SA
- <120> ANTICUERPOS FRENTE A CITOMEGALOVIRUS HUMANO (CMVh)
- 50 <130> PAF08_wo_Acmv_gX
- <150> Documento PCT/EP06/069780
- <151> 15-12-2006
- 55 <150> Documento EP07110693
- <151> 20-06-2007
- 60 <160> 17
- <170> PatentIn versión 3.3
- 65 <210> 1

<211> 58

<212> PRT

5 <213> Citomegalovirus humano

<400> 1

Ser Thr Ser His Ala Thr Ser Ser Thr His Asn Gly Ser His Thr Ser
1 5 10 15

Arg Thr Thr Ser Ala Gln Thr Arg Ser Val Tyr Ser Gln His Val Thr
20 25 30

Ser Ser Glu Ala Val Ser His Arg Ala Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr
35 40 45

Thr Leu Lys Tyr Gly Asp Val Val Gly Val
50 55

10 <210> 2

<211> 58

15 <212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 2

20

Ser Thr Arg Gly Thr Ser Ala Thr His Ser His His Ser Ser His Thr
1 5 10 15

Thr Ser Ala Ala His Ser Arg Ser Gly Ser Val Ser Gln Arg Val Thr
20 25 30

Ser Ser Gln Thr Val Ser His Gly Val Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr
35 40 45

Thr Leu Lys Tyr Gly Asp Val Val Gly Val
50 55

<210> 3

25 <211> 129

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

30

<400> 3

Leu Leu Ser His Leu Pro Ser Gln Arg Tyr Gly Ala Asp Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 Glu Ala Leu Asp Pro His Ala Phe His Leu Leu Leu Asn Thr Tyr Gly
 20 25 30
 Arg Pro Ile Arg Phe Leu Arg Glu Asn Thr Thr Gln Cys Thr Tyr Asn
 35 40 45
 Ser Ser Leu Arg Asn Ser Thr Val Val Arg Glu Asn Ala Ile Ser Phe
 50 55 60
 Asn Phe Phe Gln Ser Tyr Asn Gln Tyr Tyr Val Phe His Met Pro Arg
 65 70 75 80
 Cys Leu Phe Ala Gly Pro Leu Ala Glu Gln Phe Leu Asn Gln Val Asp
 85 90 95
 Leu Thr Glu Thr Leu Glu Arg Tyr Gln Gln Arg Leu Asn Thr Tyr Ala
 100 105 110
 Leu Val Ser Lys Asp Leu Ala Ser Tyr Arg Ser Phe Pro Gln Gln Leu
 115 120 125

Lys

<210> 4

5 <211> 393

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 4

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
atatgcactg tctctggtgg ctccgtcagc agtggtggtg actactggac ctggatccgc      120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggtct gggtacatcc attccagtgg gaatatcttc      180
tacaaccgtt cctcaagagc tcgactgacc ttatcaatgg acacgtctaa gaaccaattc      240
ttcctgaagt tgacctctgt gactgccgcg gacacggccg tatattactg tgcgagagtc      300
tatcataagg atttttagt agtaccaggt gctttcccct ttgaattctg gttcgacccc      360
tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc tca                                     393
  
```

15 <210> 5

<211> 131

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

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

Thr Leu Ser Leu Ile Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
 20 25 30

Gly Asp Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Gly Tyr Ile His Ser Ser Gly Asn Ile Phe Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Leu Ser Met Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Val Tyr His Lys Asp Phe Val Val Val Pro Gly Ala Phe
 100 105 110

Pro Phe Glu Phe Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 115 120 125

Val Ser Ser
 130

5

<210> 6

<211> 10

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

15

Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr
 1 5 10

<210> 7

<211> 7

20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 7

Ile His Ser Ser Gly Asn Ile
 1 5

<210> 8

5 <211> 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 8

Ala Arg Val Tyr His Lys Asp Phe Val Val Val Pro Gly Ala Phe Pro
 1 5 10 15

Phe Glu Phe Trp Phe Asp Pro
 20

15 <210> 9

<211> 330

<212> ADN

20

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

tcctatgtgc tgactcagcc accctcggcg tcagtgggccc caggacagac ggccaggatt	60
gccctgcggg ggaacgagat tggaagtaag agtgtccact ggtaccagca gaagccaggc	120
caggccccctg tgctggtcgt ccatgatgac agcgaccggc cctcagggat ccctgaccga	180
ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg	240
gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtggta gtgatcatca tgtggtattc	300
ggcggagggg ccaagctgac cgtcctaggt	330

25

<210> 10

<211> 110

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

35

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

<210> 11

5 <211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 11

Glu Ile Gly Ser Lys Ser
 1 5

15 <210> 12

<211> 3

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

Asp Asp Ser
 1

25 <210> 13

<211> 12

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 13

Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp His His Val Val
1 5 10

- <210> 14
- 5 <211> 1449
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> Cadena pesada de IgG1 de 26A1 recombinante
- 15 <400> 14

atgaacatac tgtggagcat gtcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag	60
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cacagaccct gtcccata	120
tgactgtct ctggtggctc cgtcagcagt ggtggtgact actggacctg gatccgccag	180
caccagggga agggcctgga gtggcttggg tacatccatt ccagtgggaa tatcttctac	240
aaaccgtccc tcaagagtcg actgacctta tcaatggaca cgtctaagaa ccaattcttc	300
ctgaagttga cctctgtgac tgccgcggac acggccgtat attactgtgc gagagtctat	360
cataaggatt ttgtagtagt accaggtgct tccccctttg aattctggtt cgaccctgg	420
ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca ggatccgcct ccaccaaggg cccatcggtc	480
tccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg	540
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc	600
ggcgtgcaca ctttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg	660
gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag	720
cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca	780
tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttctt cttccccca	840
aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgctt ggtggtggac	900
gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat	960
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgggt ggtcagcgtc	1020
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac	1080
aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaggggca gccccgagaa	1140
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg	1200
acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg	1260
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc	1320
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	1380
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg	1440
ggtaaataga	1449

<210> 15

5 <211> 482

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Cadena pesada de IgG1 de 26A1 recombinante

15

<400> 15

Met Asn Ile Leu Trp Ser Met Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Ile Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val
 35 40 45

Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Tyr Ile His Ser Ser Gly Asn Ile Phe Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Leu Ser Met Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Tyr His Lys Asp Phe Val Val Val Pro
 115 120 125

Gly Ala Phe Pro Phe Glu Phe Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
 130 135 140

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 145 150 155 160

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 165 170 175

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 180 185 190

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

<211> 705
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Cadena ligera de IgG1 de 26A1 recombinante
 <400> 16

```

    atggcctgga ccgttctcct cctcggcctc ctctctcact gcacaggttc tgtgacctcc 60
    tatgtgctga ctcagccacc ctcggtgtca gtggccccag gacagacggc caggattccc 120
    tgtgggggga acgagattgg aagtaagagt gtccactggt accagcagaa gccaggccag 180
    gcccctgtgc tggtcgtcca tgatgacagc gaccggccct cagggatccc tgaccgattc 240
    tctggctcca actctgggaa cacggccacc ctgaccatca gcagggtcga agccggggat 300
    gagggcgact attactgtca ggtgtgggat agtggtagtg atcatcatgt ggtattcggc 360
    ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggctg ccccctcggc cactctgttc 420
    ccgccctcct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tgggtgtgtct cataagtgac 480
    ttctacccgg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caaggcggga 540
    gtggagacca ccacaccctc caaacaaga acacaaga acgcggccag cagctatctg 600
    agcctgacgc ctgagcagtg gaagtccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa 660
    gggagcaccg tggagaagac agtggcccct acagaatggt catag 705
  
```

15 <210> 17
 <211> 234
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Cadena ligera de IgG1 de 26A1 recombinante
 <400> 17

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

 Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val
 85 90 95
 Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly
 100 105 110
 Ser Asp His His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 115 120 125
 Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 130 135 140
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 165 170 175
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 180 185 190
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 195 200 205
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 210 215 220
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230

REIVINDICACIONES

1. Proteína que comprende una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 7, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12 y SEQ ID NO.: 13.
2. Proteína según la reivindicación 1, comprendiendo dicha proteína una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO.: 5 y una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO.: 10.
3. Proteína según la reivindicación 1 ó 2, siendo dicha proteína un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un péptido bioactivo o una proteína de fusión.
4. Proteína según la reivindicación 3, en la que dicho anticuerpo es un anticuerpo recombinante humano.
5. Proteína según la reivindicación 4, en la que dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de proteína al menos el 90% idéntica a SEQ ID NO.: 15, y una cadena ligera que tiene una secuencia de proteína al menos el 90% idéntica a SEQ ID NO.: 17.
6. Proteína según la reivindicación 3, en la que dicho fragmento de anticuerpo es un heterodímero de cadena pesada/ligera variable, o un fragmento variable de cadena sencilla.
7. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, uniéndose dicha proteína y neutralizando citomegalovirus humano (CMVh).
8. Ácido nucleico que codifica para una proteína según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
9. Vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 8.
10. Célula huésped procariota o eucariota que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9.
11. Célula huésped según la reivindicación 10, secretando dichas células una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
12. Uso de un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, o de una célula huésped según la reivindicación 10 u 11, para producir una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
13. Uso de una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la preparación de una composición para detectar, tratar, inhibir, prevenir y/o mejorar una infección por CMVh o una enfermedad relacionada con CMVh.
14. Composición terapéutica, profiláctica o de diagnóstico para una infección por CMVh o para una enfermedad relacionada con CMVh, que comprende una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9.
15. Composición según la reivindicación 14, siendo la composición para administración ocular o tópica.
16. Composición según la reivindicación 14 ó 15, que comprende además un anticuerpo neutralizante de CMVh diferente, una preparación intravenosa de inmunoglobulinas y/o un compuesto antiviral.
17. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, para su uso en el tratamiento, la profilaxis o el diagnóstico de una infección por CMVh, o de una enfermedad relacionada con CMVh.

Fig. 1

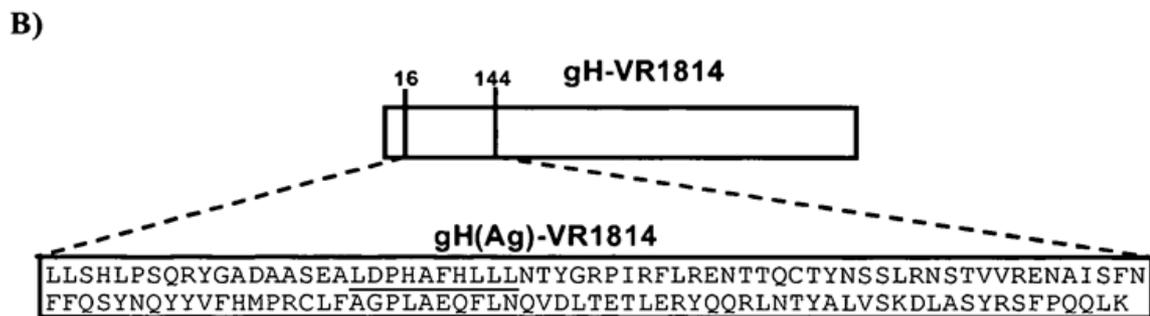
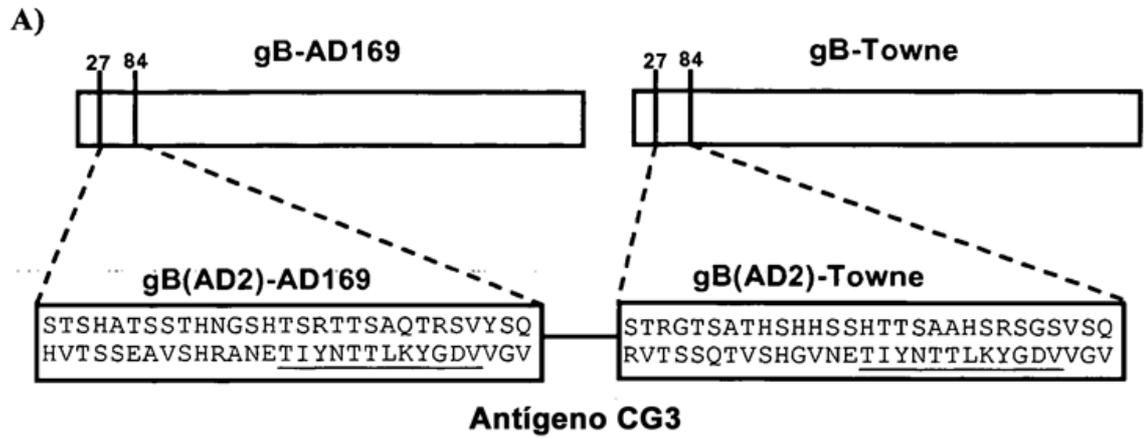


Fig. 2

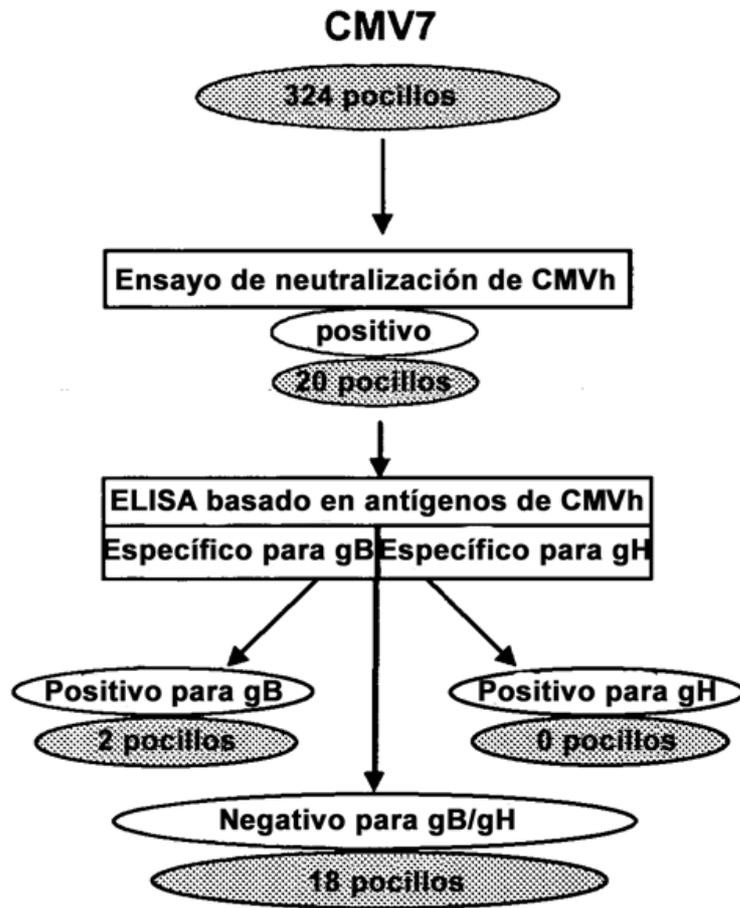


Fig. 3

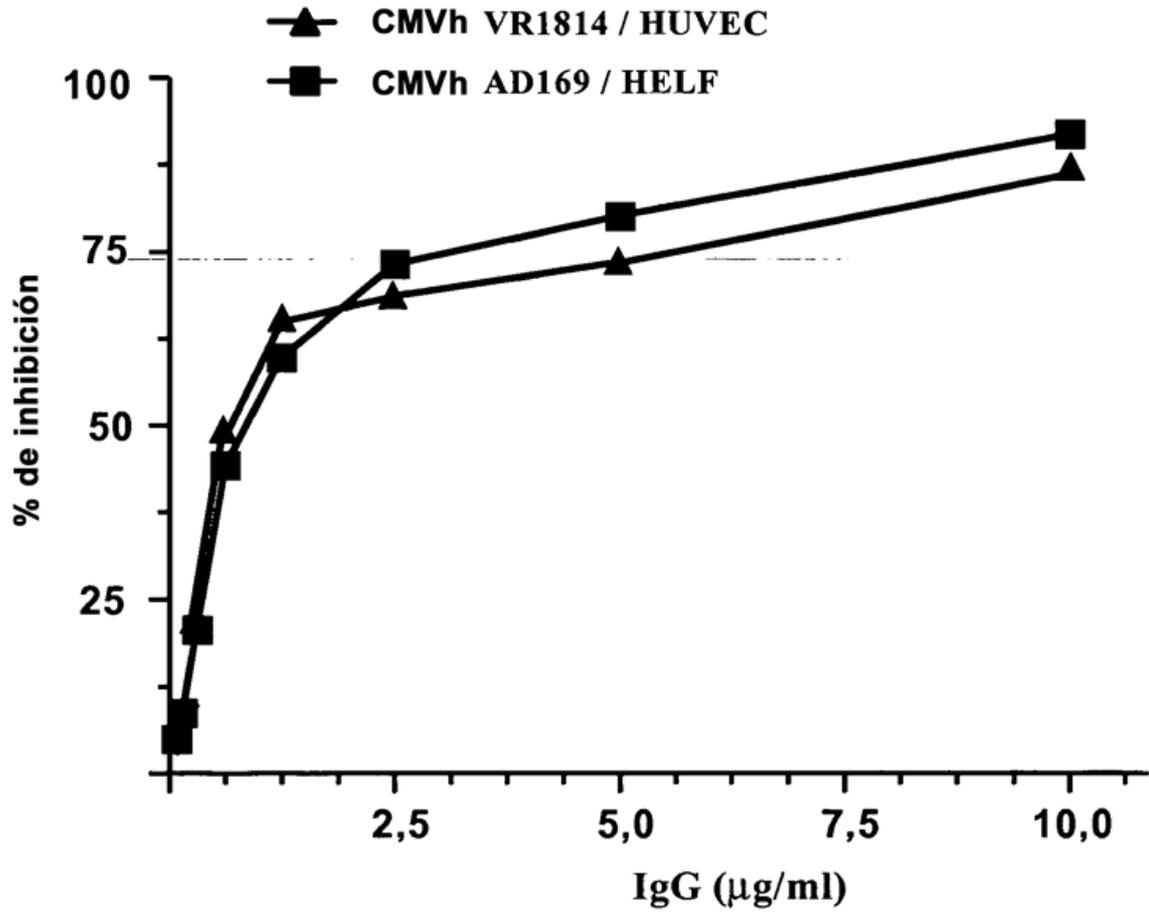
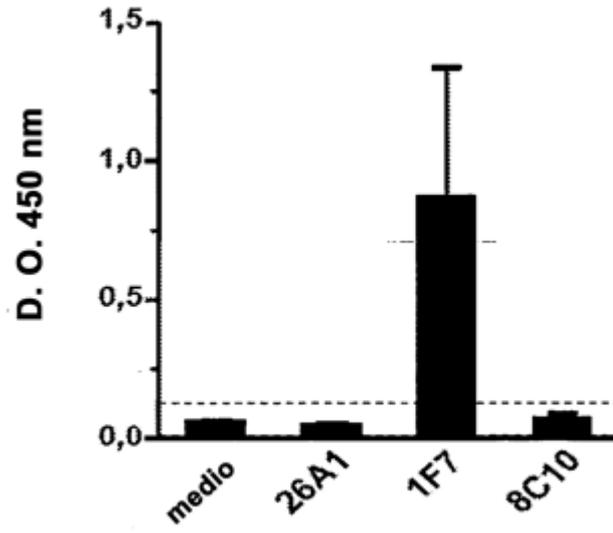


Fig. 4

A)



B)

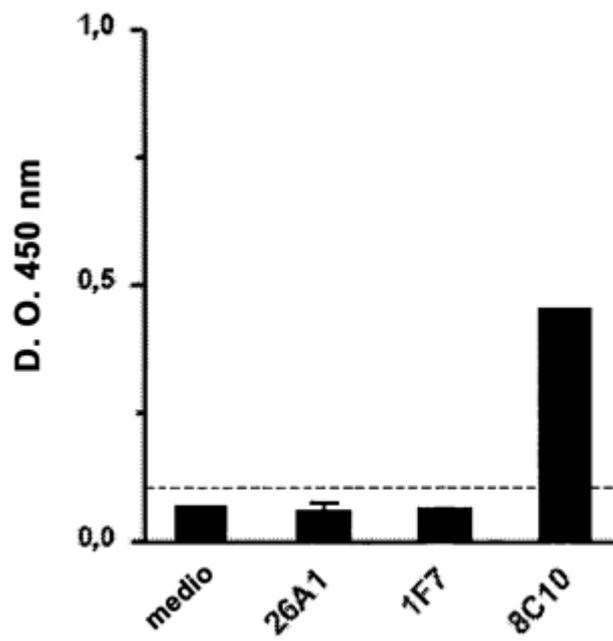


Fig. 5

A)

```

                10                               20
    . . . . . | . . . . . |
    Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L
    cagggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctc

                30                               40
    . . . . . | . . . . . |
    I C T V S G G S V S S G G D Y W T W I R
    atatgcactgtctctggtggctccgtcagcagtggtggtgactactggacctggatccgc

                50                               60
    . . . . . | . . . . . |
    Q H P G K G L E W L G Y I H S S G N I F
    cagcaccaggggaagggcctggagtggttggtacatccattccagtgggaatatcttc

                70                               80
    . . . . . | . . . . . |
    Y N P S L K S R L T L S M D T S K N Q F
    tacaaccgctccctcaagagtcgactgaccttatcaatggacacgtctaagaaccaattc

                90                               100
    . . . . . | . . . . . |
    F L K L T S V T A A D T A V Y Y C A R V
    ttctgaagttgacctctgtgactgccgaggacacggccgtatattactgtgagagagtc

                110                              120
    . . . . . | . . . . . |
    Y H K D F V V V P G A F P F E F W F D P
    tatcataaggatthttgtagtagtaccaggtgctttcccctttgaattctggttcgacccc

                130
    . . . . . |
    W G Q G T L V T V S S
    tggggccaggggaaccctgggtcaccgtctcctca
  
```

B)

```

                10      20      30      40      50      60
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|
    VH 26A1 QVQLQESG PGLVKPSQ TSLICTVSGGSVSSGGDYWTWIRQHPGKGLEWLG YIHSSGNIF
                T                HCDR1                E                V V                HCDR2

                70      80      90      100     110     120
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|
    VH 26A1 YNPSLKSRLT L SM DTSKNQFFLKLTSVTAADTAVYYCARVYHKDFV VVPGAFFPEFWFDP
                L T A                G                S                HCDR3

                130
    .....|
    VH 26A1 WGQGT LVT VSS
                R
  
```

Fig. 6

A)

```

                10                                20
      . . . . .
      S Y V L T Q P P S V S V A P G Q T A R I
      |
      tcctatgtgctgactcagccaccctcggtgtcagtggtggccccaggacagacggccaggatt

                30                                40
      . . . . .
      P C G G N E I G S K S V H W Y Q Q K P G
      |
      gccctgcgggggaacgagattggaagtaagagtgtccactggtaccagcagaagccaggc

                50                                60
      . . . . .
      Q A P V L V V H D D S D R P S G I P D R
      |
      caggcccctgtgctggtcgtccatgatgacagcgaccggccctcagggatccctgaccga

                70                                80
      . . . . .
      F S G S N S G N T A T L T I S R V E A G
      |
      ttctctggctccaactctgggaacacggccaccctgaccatcagcagggtcgaagccggg

                90                                100
      . . . . .
      D E A D Y Y C Q V W D S G S D H H V V F
      |
      gatgaggccgactattactgtcaggtgtgggatagtggtagtgatcatcatgtggtattc

                110
      . . . . .
      G G G T K L T V L G
      |
      ggcggagggaccaagctgaccgtcctaggt
  
```

B)

```

                10      20      30      40      50      60
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|
      VL 26A1 SYVLTQPPSVSVAPGQTARIPCGGNEIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVHDDSDRPSGIPDR
                LCDR1                                LCDR2

                70      80      90      100     110
      .....|.....|.....|.....|.....|
      VL 26A1 FSGNSNGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSGSDHHVVFGGGTKLTVLG
                LCDR3
  
```

Fig. 7

```

atgaacatactgtggagcatgctcctgctgggaggcagctcccagatgggtcctgtcccag 20
M N I L W S M L L L V A A P R W V L S Q
gtgcagctgcaggagtcggggcccaggactgggtaagccttcacagaccctgtccctcata 40
V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L I
tgcaactgtctctgggtggctccgtcagcagtggtgggactactggacctggatccgccag 60
C T V S G G S V S S G G D Y W T W I R Q
caccaggggaaggcctggagtggttgggtacatccattccagtggaataatcttctac 80
H P G K G L E W L G Y I H S S G N I F Y
aaccgctccctcaagagtcgactgaccttatcaatggacacgtctaagaaccaattcttc 100
N P S L K S R L T L S M D T S K N Q F F
ctgaagttgacctctgtgactgcccgggacacggccgtatattactgtgcgagagtctat 120
L K L T S V T A A D T A V Y Y C A R V Y
cataaggatthttgtagtagtaccagggtgttcccctttgaattctggttcgaccctgg 140
H K D F V V V P G A F P F E F W F D P W
ggccagggaaaccctggtcaccgtctcctcaggatccgcctccaccaagggcccatcggtc 160
G Q G T L V T V S S G S A S T K G P S V
ttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacacagcggccctgggtgctctg 180
F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L
gtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggtggaactcaggcgccttgaccagc 200
V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S
ggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtg 220
G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
gtgaccgtgcctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaag 240
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K
cccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagccaaatcttgtgacaaaactcacaca 260
P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T
tgcccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcttcccccca 280
C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P
aaacccaagacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtgggtggac 300
K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D
gtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcat 320
V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H
aatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtagacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtc 340
N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V
ctcaccgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgaagggtctccaac 360
L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N
aaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaa 380
K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E
ccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctg 400
P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L
acctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggg 420
T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G
cagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttcttc 440
Q P E N N Y K T P T P V L D S D G S F F
ctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc 460
L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C
tccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccg 480
S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
ggtaaatga
G K terminación 482

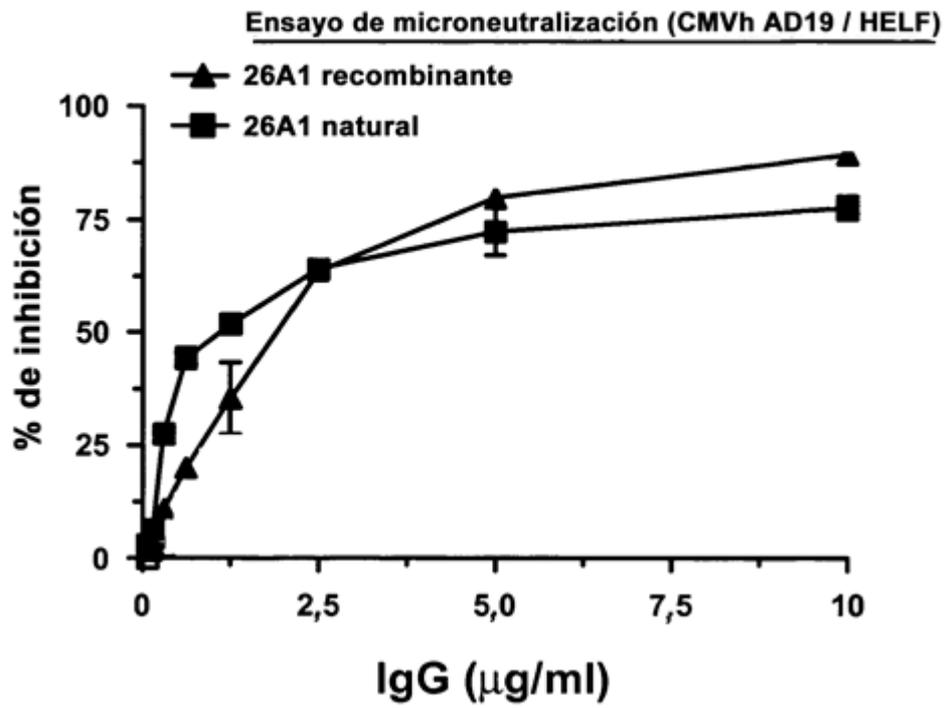
```

Fig. 8

atggcctggaccggttctcctcctcggcctcctctctcactgcacaggttctgtgacctcc 20
 M A W T V L L L G L L S H C T G S V T S
 tatgtgctgactcagccaccctcgggtgtcagtggcccaggacagacggccaggattccc 40
 Y V L T Q P P S V S V A P G Q T A R I P
 tgtggggggaacgagattggaagtaagagtgtccactggtaccagcagaagccaggccag 60
 C G G N E I G S K S V H W Y Q Q K P G Q
 gccctgtgctggctcgtccatgatgacagcgaccggcctcagggatccctgaccgattc 80
 A P V L V V H D D S D R P S G I P D R F
 tctggctccaactctgggaacacggccaccctgaccatcagcagggtcgaagccggggat 100
 S G S N S G N T A T L T I S R V E A G D
 gaggccgactattactgtcaggtgtgggatagtggtagtgatcatcatgtggtattcggc 120
 E A D Y Y C Q V W D S G S D H H V V F G
 ggagggaccaagctgaccgtcctaggtcagcccaagggtgcccctcggtcactctgttc 140
 G G T K L T V L G Q P K A A P S V T L F
 ccgccctcctctgaggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgac 160
 P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D
 ttctaccgggagccgtgacagtggtcctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcggga 180
 F Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G
 gtggagaccaccacaccctccaacaaagcaacaacaagtacgcgccagcagctatctg 200
 V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L
 agcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccagggtcacgcatgaa 220
 S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E
 gggagcaccgtggagaagacagtggtcccctacagaatgttcatag 234
 G S T V E K T V A P T E C S terminación

Fig. 9

A)



B)

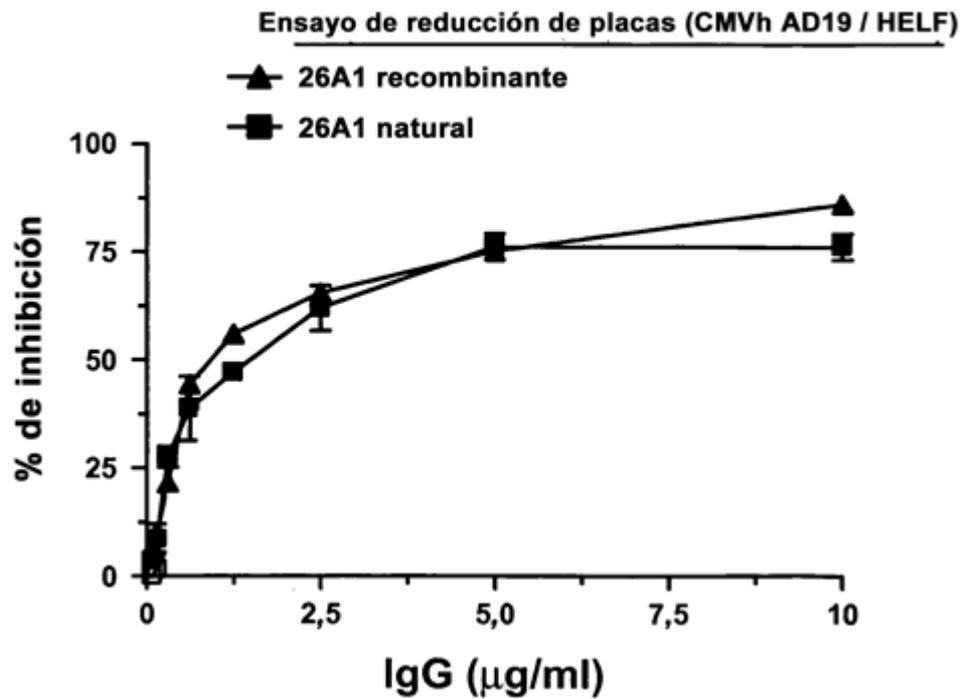
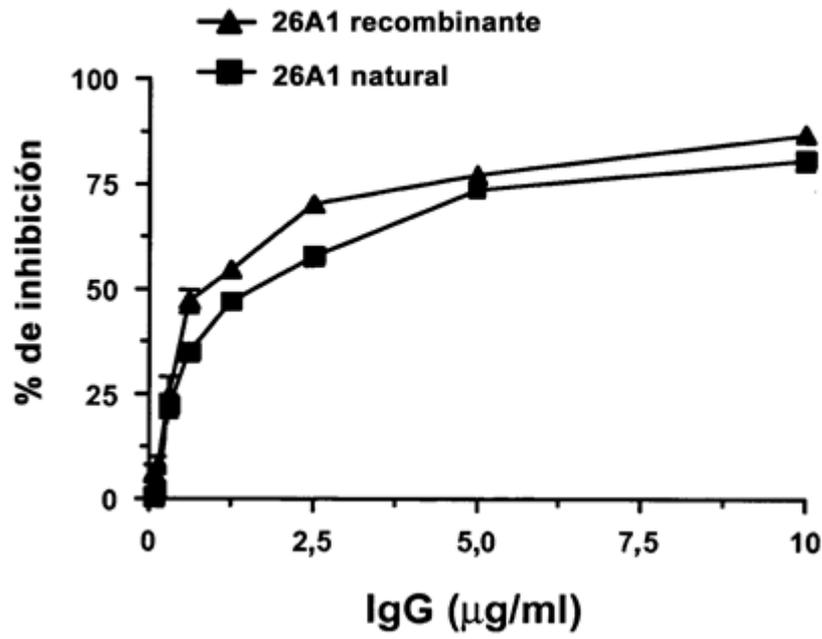


Fig. 10

A) Ensayo de microneutralización (CMVh VR1814 / HUVEC)



B) Ensayo de reducción de placas (CMVh AL-1 / HELF)

