

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 761**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C07K 16/10** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)  
**A61K 39/42** (2006.01)  
**A61P 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01914657 .0**  
96 Fecha de presentación: **01.03.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1259547**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.11.2002**

54 Título: **Anticuerpos recombinantes de alta potencia y método para producción de los mismos**

30 Prioridad:  
**01.03.2000 US 186252 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2012**

73 Titular/es:  
**MEDIMMUNE, LLC (50.0%)**  
**One MedImmune Way**  
**Gaithersburg, MD 20878 y**  
**APPLIED MOLECULAR EVOLUTION, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:  
**YOUNG, JAMES, F.;**  
**KOENIG, SCOTT;**  
**JOHNSON, LESLIE, S.;**  
**HUSE, WILLIAM, D.;**  
**WU, HERREN y**  
**WATKINS, JEFFRY, D.**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 390 761 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 recombinantes de alta potencia y método para producción de los mismos.

**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere a anticuerpos de alta potencia, métodos de aumento de la potencia de los anticuerpos y uso de anticuerpos de este tipo para prevención y tratamiento de enfermedades.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Han sido desarrollados, y están siéndolo actualmente, anticuerpos para la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades, especialmente las causadas por microorganismos infecciosos, tales como los virus.

10 Un enfoque ha consistido en el desarrollo de anticuerpos, especialmente anticuerpos monoclonales neutralizantes, algunos de ellos con alta actividad específica de neutralización. Un inconveniente de este enfoque ha sido la necesidad de producir anticuerpos humanos en lugar de los de ratón o rata y minimizar con ello el desarrollo de respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón o anti-rata, lo cual da potencialmente como resultado una patología inmune adicional.

15 Un enfoque alternativo ha sido la producción de anticuerpos quiméricos humano-murino en los cuales los genes que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de ratón se han acoplado a los genes para regiones constantes de cadena pesada y ligera humanas a fin de producir anticuerpos quiméricos, o híbridos. Por ejemplo, un anticuerpo anti-RSV humanizado ha sido preparado y está siendo comercializado actualmente. [Véase: Johnson, Patente U.S. No. 5.824.307].

20 En algunos casos, se han injertado regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de ratón en regiones constantes y de entramado humanas en las cuales se han insertado algunos de los aminoácidos de entramado de ratón (aminoácidos en la región variable del anticuerpo pero fuera de las CDRs) en sustitución de los aminoácidos posicionados correspondientemente de un anticuerpo humano de la misma especificidad a fin de proporcionar un anticuerpo denominado "humanizado". [Véase, por ejemplo, Queen, Patentes U.S. No. 5.693.761 y 5.693.762]. Sin embargo, tales anticuerpos contienen regiones CDR de ratón intactas y han alcanzado una eficacia desigual, exhibiendo a menudo afinidades no mayores que  $10^7$  a  $10^8$  M<sup>-1</sup>.

25 WO 9.833.919 describe el anticuerpo humanizado Vitaxin® y anticuerpos injertados afines basados en LM609 monoclonal de ratón.

30 La producción de anticuerpos de alta potencia (es decir anticuerpos con alta actividad biológica, tal como actividad neutralizante de antígeno), con inclusión de anticuerpos con afinidad ultraelevada para el antígeno diana, sería deseable desde el punto de vista tanto de la capacidad neutralizante de un anticuerpo de este tipo como desde los aspectos más prácticos de requerir menor cantidad de anticuerpo a fin de conseguir un grado deseable de eficacia clínica, reduciendo con ello los costes de utilización.

35 La afinidad de los anticuerpos se mide por la constante de fijación del anticuerpo a un antígeno particular, y dicha constante de fijación se calcula a menudo por la ratio de la constante de velocidad para la formación del complejo anticuerpo-antígeno (a la que se hace referencia como el valor "k<sub>on</sub>") a la constante de velocidad para la disociación de dicho complejo (el valor "k<sub>off</sub>"). De acuerdo con la presente invención, se ha determinado que la potencia de un anticuerpo es una función del valor k<sub>on</sub>, con indiferencia de la especificidad. La presente invención proporciona así una solución a los problemas de conseguir una alta potencia de anticuerpo en el sentido de que cuanto mayor es el valor k<sub>on</sub>, tanto mayor es la potencia del anticuerpo, proporcionando con ello anticuerpos de alta potencia y un método para producción de los mismos.

**BREVE SUMARIO DE LA INVENCION**

45 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporcionan anticuerpos de alta potencia de acuerdo con la reivindicación 1 útiles en el tratamiento y/o la prevención en una enfermedad. En otro aspecto, la potencia de un anticuerpo aumenta al aumentar la constante de velocidad para la formación del complejo antígeno-anticuerpo (el valor "k<sub>on</sub>").

50 En un aspecto, la presente invención se refiere a anticuerpos de alta potencia, distintos de Vitaxin, que incluyen porciones inmunológicamente activas, fragmentos, o segmentos de los mismos, que tienen un k<sub>on</sub> de al menos 2,5 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, con prevalencia al menos aproximadamente 5 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 7,5 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Tales anticuerpos pueden tener también afinidad alta (al menos aproximadamente 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a anticuerpos neutralizantes de alta potencia, que incluyen porciones, fragmentos, o segmentos inmunológicamente activos de los mismos que tienen un k<sub>on</sub> de al menos 2,5 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, con preferencia al menos aproximadamente 5 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, y de modo muy preferible al menos

aproximadamente  $7,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Tales anticuerpos pueden tener también afinidad alta (al menos aproximadamente  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ).

Se describen también métodos para aumentar la potencia de anticuerpos neutralizantes por aumento del valor  $k_{on}$  con respecto a un antígeno dado sin cambiar el epítipo al que se fija el anticuerpo.

- 5 Se describe también un medio de cribado de anticuerpos respecto a propiedades que aseguren alta potencia con respecto a un antígeno deseado, siendo dicha potencia al menos 2 a 10 veces mayor que la de los anticuerpos conocidos.

10 Más específicamente, es un objeto de la presente invención producir anticuerpos que tienen valores  $k_{on}$  al menos tan altos como  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , preferiblemente al menos  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , y muy preferiblemente al menos tan altos como  $7,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Es también un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos de alta afinidad y alta potencia que tienen especificidad alta para la proteína F de un virus respiratorio sincitial (RSV) causante de infección del sistema respiratorio.

15 En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos que tienen sustancialmente las regiones de entramado (FR) de cadena variable del anticuerpo descrito en la Figura 1 (con la misma especificidad que este anticuerpo) pero en los cuales las estructuras polipeptídicas contienen una o más diferencias de aminoácido en una o más de las CDRs (o regiones determinantes de la complementariedad) de los mismos. En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención diferirán del anticuerpo de las Figuras 1 ó 2 (en lo sucesivo, la "estructura básica" o "estructura de referencia") únicamente en las secuencias de una o más de las CDRs, que  
20 incluyen L1, L2, L3, H1, H2, y H3. Una secuencia preferida se muestra en la Figura 3.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar composiciones que comprenden los anticuerpos descritos en esta memoria en donde dichos anticuerpos están suspendidos en un vehículo, diluyente o excipiente farmacológicamente aceptable.

25 Es otro objeto adicional de la presente invención proporcionar composiciones y medicamentos para uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades, tales como las causadas por virus, especialmente el virus respiratorio sincitial, en donde las composiciones y medicamentos comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que contiene un anticuerpo como se describe en esta memoria.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo monoclonal de afinidad alta cuya potencia puede ser aumentada por los métodos de la presente invención. Para propósitos de referencia, este anticuerpo es la secuencia de anticuerpo MEDI-493 descrita en Johnson et al., J. Infect. Dis., 176:1215-1224 (1997). En este caso, las regiones CDR están subrayadas, mientras que los residuos no subrayados forman las regiones de entramado de las regiones variables de cada estructura de polipéptido. En esta estructura, las CDRs se derivan de un anticuerpo de ratón, mientras que las regiones de  
35 entramado se derivan de un anticuerpo humano. Las regiones constantes (no representadas) se derivan también de un anticuerpo humano. La Figura 1A muestra la región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 1) y la Figura 1B muestra la región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 2) de las cadenas ligera y pesada, respectivamente.

40 La Figura 2 muestra las regiones variables de la cadena pesada y ligera para una secuencia de polipéptido básica o de referencia diferente. De nuevo, las regiones CDR están subrayadas. Esta secuencia difiere de la Figura 1 en los cuatro primeros residuos de la CDR L1 de la cadena ligera, el residuo 103 de la cadena ligera y el residuo 112 de la cadena pesada. La totalidad de las estructuras Fab neutralizantes de alta potencia de la presente invención (estructuras CDR representadas en la Tabla 2) utilizan la secuencias de entramados de esta estructura de referencia o básica. Fig. 2A muestra las regiones variables de la cadena ligera (SEQ ID NO: 3) y Fig. 2B muestra las regiones variables de la cadena pesada (SEQ ID NO: 4).

45 La Figura 3 muestra las regiones variables de la cadena pesada (SEQ ID NO: 36) y de la cadena ligera (SEQ ID NO: 35) de una realización preferida de la presente invención. Este anticuerpo preferido tiene varias CDRs de  $k_{on}$  alto (o CDRs de alta potencia) presentes, que dan lugar a constantes de velocidad de asociación (es decir,  $k_{on}$ ) mayores que el anticuerpo básico o de referencia de la Figura 2, y por consiguiente mayor potencia. Este anticuerpo preferido tiene las mismas secuencias de aminoácidos de entramado que la secuencia de la Figura 2 y, para los propósitos de  
50 la presente exposición, se designa como "clon 15" en las Tablas 2 y 3, más adelante. Estas secuencias son generadas fácilmente por métodos descritos en esta memoria, todos los cuales son fácilmente conocidos para los expertos en la técnica. Las constantes cinéticas se midieron de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1 y la potencia se determinó como se describe en el Ejemplo 2.

55 La Figura 4 muestra un diagrama esquemático del uso del fago M13 para generación de fragmentos Fab de acuerdo con la presente invención y la utilización de una secuencia marcadora de histidina (6 residuos histidina) a fin de facilitar la purificación.

La Figura 5 muestra un diagrama esquemático para el procedimiento de cribado utilizado para los anticuerpos de la presente invención. "SPE" se refiere a un ELISA de un solo punto. "H3-3F4" es una designación para el clon 4 de las Tablas 2 y 3.

#### SUMARIO DETALLADO DE LA INVENCION

- 5 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporcionan anticuerpos de alta potencia de acuerdo con la reivindicación 1 útiles en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades. En otro aspecto, la potencia del anticuerpo se incrementa por aumento de la constante de velocidad para la formación del complejo antígeno-anticuerpo, a la que se hace referencia como el valor "k<sub>on</sub>", por reemplazamiento de secuencias CDR de dicho anticuerpo con secuencias CDR de alta potencia en su lugar.
- 10 En un aspecto, la presente invención se refiere a anticuerpos de alta potencia, distintos de vitaxin, que incluyen porciones, fragmentos, o segmentos inmunológicamente activos de dichos anticuerpos de alta potencia, que tienen un k<sub>on</sub> de al menos  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , con preferencia al menos aproximadamente  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , y de modo muy preferible al menos aproximadamente  $7,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Tales anticuerpos pueden tener también una afinidad alta (al menos aproximadamente  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ).
- 15 En un aspecto, la presente invención se refiere a anticuerpos neutralizantes de alta potencia, que incluyen porciones, fragmentos o segmentos inmunológicamente activos de los mismos, que tienen un k<sub>on</sub> de al menos  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , con preferencia al menos aproximadamente  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , y de modo muy preferible al menos aproximadamente  $7,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Tales anticuerpos pueden tener también una afinidad alta (al menos aproximadamente  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ).
- 20 Se describen también métodos de producción de anticuerpos, neutralizantes o no neutralizantes, que tienen alta potencia, o actividad biológica, teniendo preferiblemente una afinidad de al menos aproximadamente  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , y teniendo un k<sub>on</sub> de al menos aproximadamente  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , con preferencia al menos aproximadamente  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , y de modo muy preferible al menos aproximadamente  $7,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .
- 25 Con la aparición de los métodos de biología molecular y la tecnología de DNA recombinante, es ahora posible producir anticuerpos, con inclusión de fragmentos activos de los mismos, por medios recombinantes y generar con ello secuencias génicas que codifican las secuencias específicas de aminoácidos encontradas en la estructura polipeptídica de los anticuerpos. Esto ha permitido la producción fácil de anticuerpos que tienen secuencias características de anticuerpos neutralizantes de diferentes especies químicas y fuentes.
- 30 Con indiferencia del modo de construcción de los mismos, los anticuerpos tienen una estructura tridimensional global similar indicada usualmente como L<sub>2</sub>H<sub>2</sub> en donde la molécula comprende comúnmente 2 cadenas ligeras (L) de aminoácidos y 2 cadenas pesadas (H) de aminoácidos. Ambas cadenas tienen regiones capaces de interactuar con una diana antigénica estructuralmente complementaria. Se hace referencia a las regiones que interactúan con la diana como regiones "variables" o "V", y se caracterizan por diferencias en la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de especificidad antigénica diferentes.
- 35 Las regiones variables de las cadenas H o L contienen la secuencia de aminoácidos capaces de fijarse específicamente a dianas antigénicas. Dentro de estas secuencias existen secuencias más pequeñas designadas "hipervariables" debido a su extremada variabilidad entre anticuerpos de especificidad diferente. Tales regiones hipervariables se denominan "regiones determinantes de la complementariedad" o regiones "CDR". Estas regiones CDR dan cuenta de la especificidad básica del anticuerpo para una estructura determinante particular del antígeno.
- 40 Las CDRs representan tramos no contiguos de aminoácidos dentro de las regiones variables, pero se ha encontrado que las localizaciones posicionales de estas secuencias críticas de aminoácidos dentro de las regiones variables de cadena pesada y ligera tienen localizaciones similares dentro de las secuencias de aminoácidos de la estructura de las inmunoglobulinas. Las cadenas pesada y ligera variables de todos los anticuerpos tienen cada una 3 regiones CDR, no siendo contiguas ninguna de ellas a las otras (denominadas L1, L2, L3, H1, H2, H3) para las cadenas ligera y pesada respectivas. Las regiones CDR aceptadas han sido descritas por Kabat et al, J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977). El esquema de numeración se muestra en las Figuras 1-3, donde las CDRs están subrayadas y los números siguen el esquema de Kabat.
- 45 En todas las especies de mamífero, los polipéptidos de los anticuerpos contienen regiones constantes (es decir, altamente conservadas) y variables que comprenden ambas CDRs y las denominadas "regiones de entramado", constituidas las últimas por secuencias de aminoácidos dentro de la región variable pero fuera de las CDRs.
- 50 Entre las propiedades utilizadas comúnmente para caracterizar un anticuerpo, o fragmento del mismo, se encuentran la especificidad y afinidad del anticuerpo. La especificidad se refiere al ligando particular, o estructura antigénica, a la que se fija fuertemente, o muy fuertemente, el anticuerpo. La afinidad hace referencia a una medida cuantitativa de la fuerza de fijación del anticuerpo a un ligando particular y se da en términos de una "constante de afinidad". Tales constantes de afinidad pueden ser determinadas como constantes de asociación o disociación y representan la ratio de las concentraciones de equilibrio del ligando libre y el anticuerpo libre respecto al complejo anticuerpo-ligando. Como se utiliza en esta memoria, la afinidad se dará como una constante de asociación.
- 55

Tales constantes son medidas comúnmente por la cinética de la formación del complejo antígeno-anticuerpo, designándose la constante de velocidad de asociación para formar el complejo como  $k_{on}$ , y designándose la constante de velocidad de disociación como  $k_{off}$ . La medida de tales constantes está plenamente dentro de las aptitudes de los expertos en la técnica. El anticuerpo y el antígeno respectivo se combinan para formar un complejo como sigue:

5



Aquí, la constante de afinidad se da como una constante de asociación y representa por tanto:

$$K_a = \frac{[\text{Ab-Ag}]}{[\text{Ab}] [\text{Ag}]}$$

10

donde  $K_a$  = la constante de asociación (o afinidad), mientras que los corchetes indican concentración molar de la especie encerrada entre ellos. Para una serie dada de condiciones tales como temperatura, presión y fuerza iónica, la ratio de la concentración del complejo al producto de las concentraciones de las especies reaccionantes es constante. Con tal que no se alcancen condiciones de saturación para el anticuerpo o el antígeno (ligando), un cambio en la concentración de cualquiera de las especies de fijación alterará la concentración del complejo (Ab-Ag) en una cantidad dictada por la ecuación anterior (puesto que  $K_a$  es constante). Dicha interacción opera de acuerdo con la ley de acción de las masas.

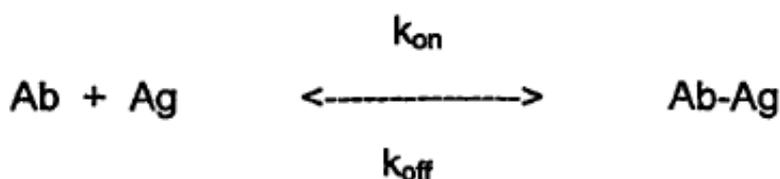
15

Adicionalmente, esta interrelación depende de las concentraciones y no de la cantidad absoluta de las especies químicas presentes, por lo que el volumen global es también relevante para cualquier medida de afinidad. Así, si la reacción tiene lugar en la mitad del volumen, se formará una cantidad dos veces mayor de complejo debido a que cada especie reaccionante (Ab y Ag) está presente ahora a una concentración doble, y se formará por tanto una cantidad de complejo cuatro veces mayor. Inversamente, la dilución puede reducir notablemente la concentración del complejo Ab-Ag. En general, las cinéticas de la interacción antígeno-anticuerpo son bien conocidas por los expertos en la técnica.

20

Dicha reacción anticuerpo-antígeno puede describirse cinéticamente como un equilibrio dinámico en el que la constante de afinidad puede medirse como una ratio de las constantes de velocidad individuales para formación y disociación del complejo:

25



30

Así pues, el valor  $k_{on}$  es la constante de velocidad, o velocidad de reacción específica, de la reacción directa, o de formación del complejo, medida en unidades:  $M^{-1} s^{-1}$ . El valor  $k_{off}$  es la constante de velocidad, o velocidad de reacción específica, para la disociación del complejo Ab-Ag y se mide en unidades de  $s^{-1}$ .

Los valores de  $k_{on}$  para los anticuerpos, y fragmentos activos de los mismos, de la presente invención se midieron utilizando el protocolo y equipo BIAcore como se describe en los Ejemplos.

35

De acuerdo con lo que antecede, la presente invención se refiere a anticuerpos neutralizantes de alta potencia, con inclusión de porciones, fragmentos y/o segmentos inmunológicamente activos de los mismos, que tienen un  $k_{on}$  de al menos  $2,5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , teniendo con preferencia al menos aproximadamente  $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , y de modo muy preferible al menos aproximadamente  $7,5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ .

40

Como se utiliza en esta memoria, los términos "porción", "segmento", y "fragmento", cuando se utilizan en relación con polipéptidos, hacen referencia a una secuencia continua de residuos, tales como residuos de aminoácidos, secuencia que forma un subconjunto de una secuencia mayor. Por ejemplo, si un polipéptido se sometiera a

tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas comunes, tales como tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína, etc., los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarían porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido de partida. Tales proteinasas se utilizan comúnmente para generar fragmentos de anticuerpos, tales como los descritos en esta memoria, aunque fragmentos de este tipo pueden generarse más fácilmente ahora por clonación o síntesis directa del polipéptido particular que se desea producir.

Los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos de alta potencia, que exhiben generalmente valores  $k_{on}$  altos. Para los propósitos de la presente exposición, el término "potencia alta" hace referencia a una potencia reflejada por una  $CE_{50}$  (o concentración eficaz que da lugar al menos a una reducción de 50% en el valor  $DO_{450}$  en el ensayo de microneutralización descrito más adelante) inferior a aproximadamente 3 nM (nanomolar o  $10^{-9}$  molar). Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden ser neutralizantes (causantes de la destrucción de la especie diana, tal como un virus, y que reducen con ello la carga viral). Un anticuerpo no neutralizante para un uso puede ser neutralizante para un uso diferente.

Los anticuerpos de alta potencia pueden tener especificidad para determinantes antigénicos encontrados en los microbios y son capaces de neutralizar dichos microbios por fijación a los mismos. De acuerdo con la presente invención, tales microbios son en la mayoría de los casos virus, bacterias u hongos, especialmente organismos que causan enfermedad respiratoria y muy preferiblemente virus. Un ejemplo específico, utilizado en los ejemplos de esta memoria, es el virus respiratorio sincitial (RSV); otro ejemplo es el virus de la parainfluenza (PIV).

Los anticuerpos de alta potencia pueden tener también especificidad para antígenos exhibidos en las superficies de las células del cáncer (pero generalmente no incluirán anticuerpos, tales como vitaxin, que son no neutralizantes. (Véase: Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 95:6037-6042 (1998)).

Los anticuerpos de alta potencia pueden tener también especificidad para sustancias químicas tales como sustancias tóxicas, o toxinas, o para los productos de toxinas, que incluyen, pero sin carácter limitante, productos producidos por el metabolismo de un organismo de tal o tales toxinas. Por ejemplo, los anticuerpos de alta potencia de la presente invención pueden ser útiles en la anulación, o mejora de cualquier otro modo, de los efectos de drogas adictivas, tales como la cocaína.

Los anticuerpos de alta potencia de la presente invención pueden tener también afinidad alta para el antígeno F de RSV, y, donde se exhibe dicha afinidad alta, la constante de afinidad ( $K_a$ ) de tales anticuerpos es al menos aproximadamente  $10^9 M^{-1}$ , con preferencia al menos aproximadamente  $10^{10} M^{-1}$ , y de modo muy preferible al menos aproximadamente  $10^{11} M^{-1}$ .

Los anticuerpos de la presente invención exhiben potencia alta cuando se mide en el ensayo de microneutralización descrito en el Ejemplo 2. En dicho ensayo, la potencia alta se mide por el valor  $CE_{50}$  y tiene comúnmente un valor  $CE_{50}$  menor que aproximadamente 3,0 nM (nanomolar o  $10^{-9}$  M), y de modo muy preferible menor que aproximadamente 1,0 nM. En general, cuanto menor es el valor  $CE_{50}$ , tanto mayor es la potencia, o actividad biológica.

Los anticuerpos de alta potencia de la presente invención exhiben dicha potencia elevada debido a sus altos valores  $k_{on}$ , que está determinada por las secuencias de aminoácidos que constituyen las regiones de entramado (FR) y regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Estos anticuerpos, o fragmentos activos de los mismos, tienen regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de alta potencia, dentro de sus secuencias de aminoácidos. Los anticuerpos neutralizantes de alta potencia de la presente invención pueden comprender al menos 2 CDRs de alta potencia, o 3 CDRs de alta potencia, o incluso 4 CDRs de alta potencia o 5 CDRs de alta potencia, y pueden comprender incluso 6 CDRs de alta potencia. Por supuesto, en el último caso, la totalidad de las 6 CDRs del anticuerpo, o fragmentos activos del mismo, son CDRs de alta potencia. De acuerdo con ello, tales anticuerpos neutralizantes de alta potencia de la presente invención tienen CDRs de alta potencia que están constituidas por una de cada una de las CDRs de cadena ligera L1 (CDR L1), L2 (CDR L2), y L3 (CDR L3) y CDRs de cadena pesada H1 (CDR H1), H2 (CDR H2) y H3 (CDR H3).

En realizaciones específicas de tales anticuerpos de alta potencia, dichas CDRs de alta potencia tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo constituido por SEQ ID NO: 11, 12, 13, 56 o 59 para CDR L1, SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 57, 58 DTFRLAS y DTFYLSS para CDR L2, SEQ ID NO: 23 para CDR L3, SEQ ID NO: 24 y 25 para CDR H1, SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 55 y DIWWDGKKSYPNLSLKS para CDR H2, SEQ ID NO: 31, 32, 33 y 34 para CDR H3.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos neutralizantes de alta potencia de la presente invención comprenden cadenas variables pesada y ligera con secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo constituido por SEQ ID NO: 35 y 36.

Un proceso para producir un anticuerpo de alta potencia puede comprender:

- (a) producir un anticuerpo recombinante, con inclusión de fragmentos inmunológicamente activos del mismo, que comprende regiones constantes de cadena pesada y ligera derivadas de un anticuerpo de mamífero y

regiones variables de cadena pesada y ligera que contienen una o más regiones de entramado y/o regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) que tienen secuencias de aminoácidos preseleccionadas;

(b) cribar dichos anticuerpos recombinantes respecto a  $k_{on}$  altos cuando dicho anticuerpo reacciona *in vitro* con un antígeno seleccionado; y

5 (c) seleccionar anticuerpos con dicho  $k_{on}$  alto.

Los anticuerpos producidos de acuerdo con el proceso arriba descrito darán comúnmente constantes de afinidad altas y valores  $k_{on}$  altos, produciendo los últimos alta actividad biológica, o potencia. En realizaciones específicas, los anticuerpos de alta potencia producidos de acuerdo con la presente invención tienen comúnmente un  $k_{on}$  de al menos aproximadamente  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , con preferencia al menos aproximadamente  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , y de modo muy preferible al menos aproximadamente  $7,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

En una realización, los procesos descritos en esta memoria producen un anticuerpo de alta potencia en el cual las secuencias de aminoácidos preseleccionadas que producen un  $k_{on}$  alto (y la alta potencia resultante) están presentes, o bien a la vez en la región de entramado y al menos en dos o tres regiones CDR, quizás en la totalidad de las 6 regiones CDR, del anticuerpo o están restringidas exclusivamente a regiones CDR.

15 En otra realización, las secuencias de aminoácidos preseleccionadas que producen un  $k_{on}$  alto están presentes o bien a la vez en la región de entramado y al menos en 3 regiones CDR del anticuerpo o están restringidas exclusivamente a regiones CDR.

En una realización adicional, las secuencias de aminoácidos preseleccionadas que producen un  $k_{on}$  alto están presentes o bien a la vez en la región de entramado y en al menos 4 regiones CDR del anticuerpo o están restringidas exclusivamente a regiones CDR.

Adicionalmente, los anticuerpos producidos por los procesos descritos en esta memoria pueden ser anticuerpos tetrámeros completos, que tienen la estructura  $\text{H}_2\text{L}_2$ , o pueden ser fragmentos de tales estructuras de anticuerpo, con inclusión de anticuerpos monocatenarios o fragmentos tales como Fab o fragmentos  $\text{F}(\text{ab})_2'$ .

25 De acuerdo con la presente invención, el antígeno para el cual son específicos los anticuerpos es expresado por el virus respiratorio sincitial (RSV).

Un proceso para producir un anticuerpo de alta potencia puede comprender producir un anticuerpo recombinante que comprende la región constante de cadena pesada y ligera derivada de un anticuerpo de mamífero y regiones variables de cadena pesada y ligera que contienen regiones de entramado y/o regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en las cuales al menos una CDR es una CDR de  $k_{on}$  alto (o de alta potencia) que tiene una secuencia de aminoácidos no encontrada en la naturaleza y en donde la presencia de dicha CDR da como resultado un  $k_{on}$  alto.

En realizaciones específicas, el anticuerpo recombinante de  $k_{on}$  alto comprende al menos 2 CDRs de  $k_{on}$  alto, posiblemente 3 CDRs de  $k_{on}$  alto, e incluso 4 CDRs de valor  $k_{on}$  alto, y tantas como 5 ó 6 CDRs de  $k_{on}$  alto. La presencia de tales secuencias CDR da como resultado que el anticuerpo, o fragmento, exhiba un  $k_{on}$  alto, y por consiguiente una potencia alta.

En otras realizaciones, la alta constante de asociación arriba mencionada de los anticuerpos producidos por los métodos de la invención es al menos aproximadamente  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , con preferencia al menos aproximadamente  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , y de modo muy preferible al menos aproximadamente  $7,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Un proceso para producir un anticuerpo de alta potencia puede comprender:

40 (a) producir un anticuerpo recombinante, con inclusión de fragmentos inmunológicamente activos del mismo, que comprende regiones constantes de cadena pesada y ligera derivadas de un anticuerpo de mamífero y regiones variables de cadena pesada y ligera que contienen una o más regiones de entramado y/o regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) que tienen secuencias de aminoácidos preseleccionadas;

45 (b) cribar dichos anticuerpos recombinantes tanto respecto a afinidad alta como a  $k_{on}$  alto cuando dicho anticuerpo reacciona *in vitro* con un antígeno seleccionado; y

(c) seleccionar anticuerpos que tengan a la vez afinidad alta y  $k_{on}$  alto.

Los procesos descritos en esta memoria producen anticuerpos de alta potencia que tienen a la vez afinidad alta y  $k_{on}$  alto en donde la constante de afinidad es al menos  $10^9 \text{ M}^{-1}$  y  $k_{on}$  es al menos  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , especialmente donde dicha afinidad es al menos  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  y dicho  $k_{on}$  es al menos  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , muy especialmente donde dicha constante de afinidad es al menos  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  y dicho  $k_{on}$  es al menos  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , teniendo las realizaciones más preferidas afinidad y  $k_{on}$  muy altos, especialmente en los cuales dicha afinidad es al menos  $10^9 \text{ M}^{-1}$  y dicho  $k_{on}$  es al menos  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , y muy especialmente en los cuales la constante de afinidad es al menos  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , y  $k_{on}$  es al

menos  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , siendo una realización muy especialmente preferida una que produce un anticuerpo de alta potencia en el que la constante de afinidad es al menos  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ , y el  $k_{\text{on}}$  es al menos  $7,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Debe entenderse también que, cuando se busca también afinidad alta, cualquier combinación de los valores arriba mencionados de afinidad ( $K_a$ ) y asociación cinética ( $k_{\text{on}}$ ) está dentro de la presente invención.

5 Estas realizaciones incluyen también procesos en los cuales la secuencia de aminoácidos preseleccionada que produce un  $k_{\text{on}}$  alto está presente a la vez en la región de entramado y las regiones CDR, o sólo en las regiones CDR, y en los cuales tales secuencias, seleccionadas de SEQ ID NO: 11 a 34 y 55 a 58, están presentes en 1, 2, 3, 4, 5, o la totalidad de las 6 regiones CDR, donde la secuencia CDR individual se selecciona de las secuencias individuales descritas en esta memoria. Los métodos para hacer esto están plenamente dentro de la habilidad de los  
10 expertos en la técnica y no se expondrán con mayor detalle en esta memoria.

Los métodos descritos en esta memoria no se limitan a producir exclusivamente nuevos anticuerpos de afinidad alta que son específicos para un antígeno particular y que se han producido sin tener en cuenta moléculas y estructuras inmunógenas ya existentes. Así pues, los métodos descritos en esta memoria proporcionan un medio para modificaciones seleccionadas de las estructuras de moléculas de anticuerpos conocidas, produciendo con ello  
15 aumentos en el  $k_{\text{on}}$  de dichos anticuerpos y la actividad biológica incrementada concomitante. Esto se consigue por incorporación selectiva de las secuencias CDR de alta potencia descritas en esta memoria.

En realizaciones separadas de la presente invención, el anticuerpo cuya potencia debe incrementarse tendrá una constante de afinidad inicial y/o final de al menos  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , con preferencia al menos aproximadamente  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , y de modo muy preferible al menos aproximadamente  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ .

20 Los anticuerpos producidos de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria tendrán constantes  $k_{\text{on}}$  mayores después de los cambios de aminoácidos para producir las secuencias de alta potencia de la invención y como resultado de dichos cambios de aminoácidos, especialmente en los cuales el valor  $k_{\text{on}}$  después de dichos cambios de aminoácidos es al menos  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , especialmente al menos aproximadamente  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , y de modo muy especial al menos aproximadamente  $7,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (con indiferencia de la constante de afinidad particular)  
25 ( $K_a$ ).

En la aplicación de los métodos descritos en esta memoria debe entenderse que los cambios arriba mencionados en la secuencia de aminoácidos utilizados para aumentar la potencia de un anticuerpo, o fragmentos activos del mismo, o el uso de secuencias seleccionadas de aminoácidos para producir anticuerpos de alta potencia, o fragmentos  
30 activos de alta potencia de los mismos, alcanzan dicha alta potencia, o potencia incrementada, por la producción de valores  $k_{\text{on}}$  altos. Dado que la constante de afinidad es una ratio numérica de  $k_{\text{on}}$  a  $k_{\text{off}}$ , un  $k_{\text{on}}$  incrementado puede dar como resultado afinidad incrementada si el valor  $k_{\text{off}}$  no cambia en el mismo factor. Así pues, las potencias elevadas de los anticuerpos producidos de acuerdo con los presentes métodos son función del valor de  $k_{\text{on}}$  y no del valor de  $K_a$  (la constante de afinidad). Por ejemplo, el uso de secuencias de aminoácidos seleccionadas en las CDRs de una molécula de anticuerpo puede dar como resultado un aumento apreciable en ambas constantes de velocidad  
35 de asociación ( $k_{\text{on}}$ ) y disociación ( $k_{\text{off}}$ ) y, si ambas constantes aumentan según el mismo factor, el resultado es una potencia alta, o mayor (debido al  $k_{\text{on}}$  mayor), pero sin ningún aumento resultante en  $K_a$  (dado que la ratio de  $k_{\text{on}}$  a  $k_{\text{off}}$  es la misma). Inversamente, en los casos en que el uso de tales secuencias de aminoácidos preseleccionadas dentro de las CDRs de un anticuerpo de alta potencia da como resultado un  $k_{\text{off}}$  reducido y sin aumento alguno de  $k_{\text{on}}$ , el resultado es un anticuerpo, o fragmento activo del mismo, con mayor afinidad pero con poco o ningún  
40 aumento de potencia. Así pues, se ha encontrado que se produce poco o ningún cambio de potencia en los casos en que cambia únicamente el valor  $k_{\text{off}}$  (dado que  $K_a$  es la ratio de  $k_{\text{on}}$  a  $k_{\text{off}}$ ) pero  $k_{\text{on}}$  se mantiene constante a pesar de un cambio numérico en  $K_a$ .

De acuerdo con la presente invención, están disponibles varios métodos convenientes para la medida de la potencia de los anticuerpos, o fragmentos activos de los mismos, tales como fragmentos Fab. Un método de este tipo utiliza  
45 el modelo de la rata del algodón, detalles del cual se exponen en los ejemplos proporcionados más adelante. Otro es el ensayo de microneutralización (véase el Ejemplo 2).

Así mismo de acuerdo con la presente invención, se proporcionan composiciones y medicamentos para prevención o tratamiento de una enfermedad que comprenden una cantidad terapéutica (o profilácticamente) eficaz de un anticuerpo de alta potencia, o fragmento activo del mismo, que tiene una secuencia polipeptídica como se describe  
50 en esta memoria o producido de acuerdo con los métodos expuestos en esta memoria. En una realización preferida, la enfermedad está causada por un virus respiratorio sincitial y el virus de la parainfluenza.

Los anticuerpos neutralizantes de alta potencia de la presente invención se obtienen por generación de secuencias génicas de anticuerpos apropiadas, es decir, secuencias de aminoácidos, por disposición de las secuencias de nucleótidos apropiadas y expresión de éstas en una línea de células adecuada. Cualesquiera secuencias de nucleótidos deseadas pueden producirse utilizando el método de la mutagénesis basada en codones, como se describe, por ejemplo, en las patentes U.S. Núms. 5.264.563 y 5.523.388. Tales procedimientos permiten la producción de cualesquiera y la totalidad de frecuencias de residuos de aminoácidos en cualesquiera posiciones deseadas de codones dentro de un oligonucleótido. Esto puede incluir sustituciones completamente aleatorias de cualquiera de los 20 aminoácidos en una posición deseada o en cualquier subconjunto específico de éstas.  
55

Alternativamente, este proceso puede llevarse a cabo de tal manera que se consiga un aminoácido particular en una localización deseada dentro de una cadena de aminoácidos, tal como las nuevas secuencias CDR de acuerdo con la invención. En suma, la secuencia de nucleótidos apropiada para expresar cualquier secuencia de aminoácidos deseada puede conseguirse fácilmente y utilizando tales procedimientos pueden reproducirse las nuevas secuencias CDR de la presente invención. Esto da como resultado la posibilidad de sintetizar polipéptidos, tales como anticuerpos, con cualquier secuencia de aminoácidos deseada. Por ejemplo, es posible ahora determinar las secuencias de aminoácidos de cualesquiera dominios deseados de un anticuerpo de elección y, opcionalmente, preparar cadenas homólogas que tienen uno o más aminoácidos reemplazados por otros aminoácidos deseados, a fin de obtener una gama de análogos sustituidos.

En la aplicación de tales métodos, debe apreciarse que debido a degeneración del código genético, métodos tales como la síntesis aleatoria de oligonucleótidos y la síntesis parcial de oligonucleótidos degenerados incorporarán redundancias para codones que especifiquen un residuo de aminoácido particular en una posición particular, aunque dichos métodos pueden utilizarse para proporcionar un conjunto maestro de todas las secuencias de aminoácidos posibles y cribar éstas respecto a función óptima como estructuras de anticuerpos o para otros propósitos. Tales métodos se describen en Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378-6382 (1990) y Devlin et al., Science 249:404-406 (1990). Alternativamente, tales secuencias de anticuerpos pueden sintetizarse químicamente o generarse por otras vías bien conocidas por los expertos en la técnica.

De acuerdo con la invención descrita en esta memoria, pueden generarse variantes de anticuerpos mejoradas combinando en una sola estructura polipeptídica, una, dos o más secuencias CDR nuevas como las descritas en esta memoria (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 11-34), demostrándose que cada una de ellas da independientemente como resultado potencia o actividad biológica incrementadas. De esta manera, pueden combinarse varias secuencias nuevas de aminoácidos en un solo anticuerpo, en la misma o diferentes CDRs, para producir anticuerpos con niveles deseables de actividad biológica. Tales niveles deseables serán a menudo resultado de la producción de anticuerpos cuyos valores  $k_{on}$  son al menos aproximadamente  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

A modo de ejemplo no limitante, pueden emplearse 3 secuencias CDR nuevas de este tipo y los anticuerpos resultantes cribarse respecto a potencia, o actividad biológica, utilizando o bien el protocolo de la rata del algodón o el protocolo de microneutralización descritos en esta memoria, donde dicho anticuerpo demuestra afinidad alta para una estructura antigénica particular, tal como el antígeno F de RSV. El resultado global sería por tanto un proceso iterativo de combinación de diversas sustituciones simples de aminoácidos y cribado de los anticuerpos resultantes para afinidad antigénica y potencia en una modalidad de paso a paso, asegurándose de este modo que se incrementa la potencia sin sacrificio de un valor deseablemente alto, o al menos un valor mínimo, para la afinidad.

Utilizando las nuevas secuencias y métodos descritos en esta memoria, un enfoque de este tipo podría evitar el tiempo y el gasto de la generación y cribado de todas las permutaciones y combinaciones posibles de estructuras de anticuerpo en un esfuerzo para encontrar el anticuerpo con la eficacia máxima. Inversamente, la aleatorización completa de una sola CDR de 10 residuos de aminoácidos generaría más de 10 trillones de variantes, un número virtualmente imposible de cribar.

Este método iterativo puede utilizarse para generar reemplazamientos dobles y triples de aminoácidos en un proceso gradual a fin de estrechar la búsqueda para anticuerpos que tengan afinidad mayor.

Inversamente, debe apreciarse que no todas las localizaciones dentro de las secuencias de los diferentes dominios de anticuerpo pueden ser iguales. Las sustituciones de cualquier clase en una localización particular pueden ser favorables o perjudiciales. Adicionalmente, las sustituciones de ciertas clases de aminoácidos en ciertas localizaciones pueden representar análogamente un punto a favor o un punto desfavorable en lo que respecta a afinidad. Por ejemplo, puede no ser necesario probar todos los aminoácidos hidrófobos posibles en una posición dada. Es posible que cualquier aminoácido hidrófobo se comporte igualmente bien. Inversamente, un aminoácido de carácter ácido o básico en una localización dada puede proporcionar grandes fluctuaciones en la afinidad medida. Por consiguiente es necesario también aprender las "reglas" de la realización de tales sustituciones, pero la determinación de dichas "reglas" no requiere el estudio de todas las combinaciones y sustituciones posibles. Pueden hacerse evidentes tendencias después de examinar un número de sustituciones menor que el máximo.

De acuerdo con la presente invención, tales reglas determinan los cambios de aminoácidos que deben hacerse en las regiones CDR de los anticuerpos, o las secuencias de aminoácidos que tienen que prepararse en polipéptidos de anticuerpos totalmente nuevos y sintéticos, a fin de conseguir afinidades altas. No obstante, se ha descubierto ahora que, si bien la afinidad alta es a menudo una propiedad de los anticuerpos útil en aplicaciones terapéuticas, tales anticuerpos no siempre tienen una potencia suficiente para aportar utilidad práctica en dichos usos.

Como ya se ha descrito, la afinidad se mide por la ratio de las constantes  $k_{on}$  y  $k_{off}$ . Por ejemplo, un  $k_{on}$  de  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y un  $k_{off}$  de  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  se combinarían para dar una constante de afinidad de  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  (véanse los valores en la Tabla 3). Sin embargo, los anticuerpos que exhiben dicha afinidad alta pueden carecer a pesar de ello de la potencia requerida para hacerlos agentes terapéuticos útiles. De acuerdo con la presente invención, la potencia de los anticuerpos depende del valor de la velocidad  $k_{on}$  para la reacción de fijación del anticuerpo. Así, un anticuerpo, con

indiferencia de la afinidad para el antígeno respectivo, exhibirá un aumento de potencia (tal como actividad de neutralización) en el caso de que dicho anticuerpo tenga un valor  $k_{on}$  más alto, con indiferencia de  $K_a$  o  $k_{off}$ .

De acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, la potencia incrementada de un anticuerpo existente, con indiferencia de su afinidad para el antígeno, se consigue por cambios selectivos en uno o más de los aminoácidos presentes en una o más de las regiones CDR de dicho anticuerpo, por lo cual dichos cambios de aminoácidos tienen el efecto de producir un aumento en el valor  $k_{on}$  para dicho anticuerpo, preferiblemente con un aumento en la afinidad del anticuerpo. Una potencia mayor puede conseguirse con un valor  $k_{on}$  más alto aun cuando la afinidad se mantenga igual o se reduzca ligeramente. Un anticuerpo de este tipo se produce muy ventajosamente por síntesis de las cadenas de polipéptido requeridas por vía de la síntesis en células modificadas convenientemente por ingeniería genética que tienen incorporadas en ellas las secuencias de nucleótidos apropiadas que codifican las cadenas de polipéptido requeridas que contienen los segmentos CDR alterados. Asimismo de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, un nuevo anticuerpo que tenga un nivel deseable de potencia, o actividad biológica, puede prepararse *de novo* por incorporación de aminoácidos seleccionados en localizaciones seleccionadas dentro de las regiones CDR de dichas cadenas polipeptídicas del anticuerpo utilizando células modificadas por ingeniería genética como se describe en esta memoria o totalmente por síntesis química de las cadenas polipeptídicas requeridas con formación subsiguiente de los enlaces disulfuro necesarios.

A este respecto, debe tenerse claramente en cuenta que los anticuerpos producidos de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria pueden ser anticuerpos que posean estructuras tetrámeras, dímeras o monómeras. Así, el término "anticuerpo" como se utiliza en esta memoria incluye moléculas de anticuerpo tetrámeras enteras, como se encuentran comúnmente en la naturaleza, así como porciones y fragmentos de los mismos, con inclusión de  $L_2H_2$ , LH, Fab,  $F(ab')_2$ , y otros fragmentos, siendo el único requisito de tales estructuras que las mismas retengan actividad biológica como se mide por los ensayos y protocolos descritos en esta memoria.

De acuerdo con lo que antecede, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos monoclonales de afinidad alta. Tales anticuerpos, sin embargo son monoclonales únicamente en el sentido de que los mismos pueden derivarse de un clon de un solo tipo de célula. Sin embargo, esto no debe entenderse como limitante de los mismos a un origen particular. Tales anticuerpos pueden producirse fácilmente en células que comúnmente no producen anticuerpos, tales como células CHO o COS. Adicionalmente, tales anticuerpos pueden producirse en otros tipos de células, especialmente células de mamífero o incluso células de plantas, por modificación mediante ingeniería genética de dichas células para expresar y ensamblar las cadenas ligera y pesada del polipéptido que forman el producto anticuerpo. Adicionalmente, tales cadenas pueden sintetizarse químicamente pero, dado que las mismas deberían ser específicas para un determinante antigénico dado, constituirían todavía anticuerpos "monoclonales" en el sentido en que se utiliza dicho término. Así, como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que el término anticuerpo monoclonal denota más la especificidad y pureza de las moléculas de anticuerpo producidas por los métodos descritos en esta memoria que el mero mecanismo utilizado para producción de dichos anticuerpos.

Asimismo, como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que el término potencia describe la dependencia del efecto del anticuerpo, cuando se utiliza para su propósito propuesto, de la concentración de dicho anticuerpo. Así, potencia significa actividad biológica con respecto a un antígeno dado. A modo de ejemplo no limitante, la potencia, o actividad biológica, o efecto biológico, se mide para un anticuerpo anti-RSV, por el procedimiento de la rata del algodón o el procedimiento de microneutralización, como se describe en la sección de Métodos.

Inversamente, la afinidad de un anticuerpo para el antígeno es simplemente una medida matemática de la ratio de  $k_{on}$  a  $k_{off}$ .

Adicionalmente, las afinidades ( $K_a$ ) de los anticuerpos producidos de acuerdo con el método descrito en esta memoria estarán comprendidas típicamente en el entorno de  $10^{10} M^{-1}$ . Este entorno puede, por ejemplo, ser del orden de 10 veces mayor o menor, de  $10^{10} M^{-1}$  o ser más de 10 veces mayor que  $10^{10} M^{-1}$ , o puede ser incluso numéricamente igual a  $10^{10} M^{-1}$ . La afinidad del anticuerpo para el antígeno es proporcional al valor de esta constante (es decir, cuanto mayor es la constante, tanto mayor es la afinidad debida a la mayor concentración del complejo – véase la ecuación para la constante de afinidad). Dicha constante se mide por metodología cinética estándar para reacciones de anticuerpos (como se describe en el Ejemplo 1).

En una realización, los anticuerpos producidos de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria (distintos del caso en que el término "anticuerpo" significa una porción, fragmento o segmento activo(a), todos los cuales, para los propósitos de la presente exposición, se considera que están incluidos dentro del significado del término anticuerpo) comprenderán comúnmente una región constante de mamífero, preferiblemente humana, y una región variable comprendiendo dicha región variable regiones de entramado de cadena pesada y ligera y CDRs de cadena pesada y ligera, en donde las regiones de entramado de cadena pesada y ligera tienen secuencias características de un anticuerpo de mamífero, preferiblemente un anticuerpo humano, y en donde las secuencias CDR son similares a las de un anticuerpo de cualquier especie distinta de un humano, preferiblemente un ratón. En el caso en que las secuencias de aminoácidos de entramado son características de las de un animal no humano, el último es preferiblemente un ratón.

En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano en el que el anticuerpo tiene un valor  $k_{on}$  como se describe en esta memoria para proporcionar potencia mejorada.

Adicionalmente, los anticuerpos producidos de acuerdo con la presente invención fijarán comúnmente el mismo epítoto que antes de aplicar los métodos descritos en esta memoria para aumentar el valor  $k_{on}$ . Así, después de aplicar los métodos descritos en esta memoria, el anticuerpo tendrá secuencias CDR similares, pero no idénticas, a las secuencias CDR antes de la aplicación de los métodos expuestos en esta memoria, en el sentido de que al menos una de las CDRs de dicho anticuerpo contendrá una secuencia de aminoácidos de alta potencia, tal como una seleccionada de SEQ ID NO: 11-34, 55-59, DIWWDGKHSYNPSLKS, DTFRLAS y DTFYLSS si el anticuerpo va a utilizarse para neutralizar un virus tal como RSV.

En línea con lo anterior, y con objeto de describir mejor las secuencias expuestas de acuerdo con la invención con respecto a un anticuerpo humanizado contra RSV, una secuencia básica o secuencia de inicio de regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo, o fragmento del mismo, cuya potencia debe aumentarse, se muestran en Figura 1A (región variable de cadena ligera - SEQ ID NO: 1) y Figura 1B (región variable de cadena pesada - SEQ ID NO: 2) o un fragmento Fab de un anticuerpo de este tipo (por ejemplo, las secuencias de Figura 2A (región variable de cadena ligera - SEQ ID NO: 3) y Figura 2B (región variable de cadena pesada - SEQ ID NO: 4). Asimismo de acuerdo con la invención, aminoácidos específicos diferentes de los de estas secuencias de inicio se generaron por métodos recombinantes partiendo de secuencias de nucleótidos preparadas diseñadas para generar dichas secuencias de aminoácidos cuando se expresan en células recombinantes. Los productos de dichas células son los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Alternativamente, tales anticuerpos pueden producirse sin el uso de una célula modificada por ingeniería genética o recombinante por medios de síntesis bien conocidos en la técnica.

En una realización de la presente invención, la potencia se incrementa utilizando un anticuerpo neutralizante contra el virus respiratorio sincitial (RV) que tiene una constante de afinidad de al menos  $10^9 M^{-1}$ , y preferiblemente al menos  $10^{10} M^{-1}$  (para el antígeno F del mismo) por aumento del valor  $k_{on}$  hasta al menos  $2,5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ . Los aminoácidos presentes en las CDRs de un fragmento Fab de este tipo se muestran en la Tabla 3 (por ejemplo, el clon 5).

En general, el método utilizado para determinar la afinidad y las constantes cinéticas de los anticuerpos antes y después de la aplicación de los métodos de la invención para aumentar el valor  $k_{on}$ , consistió en generar secuencias de nucleótidos para los genes que expresan las cadenas de anticuerpos deseadas (de acuerdo con la presente invención) e insertar éstas en vectores que se utilizaron luego para transformar células COS-1 por protocolos estándar. Las células se dejaron crecer en pocillos y el sobrenadante se muestreó y se midió respecto a fijación de antígeno utilizando técnicas estándar ELISA. Estos polinucleótidos se diseñaron de tal manera que proporcionarían uno o más reemplazamientos de aminoácidos en las CDRs que pudieran cribarse luego respecto a valores  $k_{on}$  incrementados, combinándose selectivamente los reemplazamientos favorables (aquellos que producían valores  $k_{on}$  incrementados) para afinidad incrementada. Éstos se criban subsiguientemente respecto a afinidad de fijación para el antígeno respectivo, tal como el antígeno F de RSV frente a la estructura básica o de referencia, determinándose con ello que no se producía en ningún caso un cambio importante de afinidad como resultado del aumento en los valores  $k_{on}$ .

En realizaciones específicas, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado que comprende una constante de afinidad de al menos  $10^9 M^{-1}$ , preferiblemente al menos  $10^{10} M^{-1}$  y muy preferiblemente al menos  $10^{11} M^{-1}$ , y en donde  $k_{on}$  es al menos aproximadamente  $2,5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , con preferencia al menos aproximadamente  $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , y muy preferiblemente al menos  $7,5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$  (con inclusión de todas las combinaciones de los mismos).

También de acuerdo con la presente invención, un anticuerpo aislado de este tipo puede ser cualquier clase de anticuerpo ya conocido o recién sintetizado y nuevo. Así, los anticuerpos producidos de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria incluirán un anticuerpo seleccionado del grupo constituido por anticuerpos de mamífero existentes naturalmente, anticuerpos humanos existentes naturalmente, anticuerpos de ratón existentes naturalmente, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos quiméricos (que tienen regiones constantes de un anticuerpo de una especie y regiones variables de un anticuerpo de una especie diferente), anticuerpos injertados en CDR (que tienen las regiones CDR de un anticuerpo de una especie y las regiones constantes y, posiblemente, regiones de entramado de un anticuerpo de una especie diferente), anticuerpos humanizados (en los cuales aminoácidos seleccionados, de las regiones variables de entramado y/o las regiones CDR, han sido alterados de manera que son similares a un anticuerpo humano a pesar de que tales secuencias se derivan en gran parte de una especie diferente, tal como un ratón), preferiblemente anticuerpos humanizados de ratón, anticuerpos alterados de mamífero, preferiblemente ratón, muy preferiblemente humanos) en los cuales los aminoácidos seleccionados de un anticuerpo existente se han alterado en algún punto de la cadena polipeptídica, comúnmente por las técnicas de ingeniería genética, a fin de proporcionar estructuras de anticuerpo similares a las estructuras de anticuerpo en las que se basan los mismos), y anticuerpos nuevos totalmente sintéticos, no existiendo estos últimos con anterioridad en la naturaleza.

Se describen también métodos de aumento de la potencia de uno de los tipos de anticuerpos mencionados anteriormente (descritos con anterioridad) que comprenden cambiar selectivamente los aminoácidos dentro de las

regiones variables del anticuerpo a fin de aumentar el valor  $k_{on}$  medido de dicho anticuerpo con respecto a un antígeno particular. Por supuesto, el valor  $k_{on}$  puede ser diferente para el mismo anticuerpo después de los mismos cambios de aminoácidos en los que se mide la reacción utilizando un antígeno o determinante antigénico diferente. Sin embargo, en tales casos, las afinidades cambiarán también probablemente a medida que cambia la identidad del determinante antigénico.

Asimismo de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, los cambios de aminoácidos introducidos en las secuencias de los polipéptidos de tales anticuerpos se limitan preferiblemente a las porciones CDR de las regiones variables de los anticuerpos aunque éstas podrían implicar también cambios en las regiones de entramado.

Aunque las secuencias CDR más ventajosas se identifican comúnmente por cribado de clones modificados de anticuerpos cuya potencia debe aumentarse por los métodos descritos en esta memoria, una vez que tales clones de alta potencia han sido identificados, el anticuerpo resultante se produce muy ventajosamente después por síntesis de las cadenas polipeptídicas pesada y ligera apropiadas en células adecuadas animales o vegetales después de introducción en dichas células de vectores adecuados que contienen las secuencias de DNA apropiadas correspondientes a las secuencias deseadas de aminoácidos, aprovechando la ventaja del código genético para diseñar las secuencias nucleotídicas requeridas. Como consecuencia de este enfoque, pueden producirse inicialmente anticuerpos totalmente nuevos con alta potencia utilizando las identidades de secuencia de aminoácidos sugeridas por los métodos descritos en esta memoria sin necesidad de seleccionar secuencias de anticuerpos ya existentes para modificación. Así pues, los métodos descritos en esta memoria facilitan la producción de anticuerpos de alta potencia con una estructura completamente nueva en el sentido de que sus secuencias CDR son CDRs de alta potencia como se determina por los métodos descritos en esta memoria a fin de aumentar deliberadamente los valores  $k_{on}$  de tales anticuerpos y sin destruir la especificidad y afinidad de dichos anticuerpos para la diana antigénica propuesta.

En una realización de los métodos descritos en esta memoria, se modifica un anticuerpo ya existente para aumentar la potencia del mismo por aumento del valor  $k_{on}$ . En una realización preferida, el anticuerpo es uno con afinidades altas, v.g., al menos aproximadamente  $10^9 M^{-1}$  o  $10^{10} M^{-1}$ . El anticuerpo se sintetiza, utilizando clones o células animales o vegetales modificadas genéticamente, a fin de introducir cambios de aminoácidos en las cadenas polipeptídicas pesada y/o ligera de dicho anticuerpo, preferiblemente de tal manera que dichos cambios de anticuerpo se introducen en las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de dichas cadenas polipeptídicas, para aumentar el valor  $k_{on}$  para la fijación de dicho anticuerpo a un antígeno particular con aumento concomitante en la potencia del anticuerpo. Así, los métodos descritos en esta memoria se utilizan ventajosamente para producir una molécula de anticuerpo en la cual el valor  $k_{on}$  de dicho anticuerpo después de los cambios de aminoácidos en su secuencia, preferiblemente las regiones variables de dicha secuencia, muy preferiblemente las porciones CDR, es mayor que el valor  $k_{on}$  exhibido por dicho anticuerpo antes de dichos cambios de aminoácidos cuando los valores  $k_{on}$  se miden con respecto al mismo antígeno.

En general, en el caso en que los métodos descritos en esta memoria se aplican a anticuerpos conocidos, el  $k_{on}$  de dichos anticuerpos se incrementará al menos en 2 veces, preferiblemente al menos 5 veces, y muy preferiblemente al menos 10 veces. Más específicamente, el valor  $k_{on}$  de dicho anticuerpo se incrementa hasta al menos aproximadamente  $2,5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , incrementándose preferiblemente hasta al menos  $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , y muy preferiblemente al menos  $7,5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ .

Dado que los métodos descritos en esta memoria son igualmente eficaces para el diseño de nuevos anticuerpos recombinantes de alta potencia desconocidos con anterioridad, se da a conocer también un método de producción de un anticuerpo que tiene un valor  $k_{on}$  de al menos  $2,5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , que comprende preparar un anticuerpo cuyas secuencias polipeptídicas contienen aminoácidos seleccionados en localizaciones seleccionadas, especialmente dentro de las secuencias CDR, seguido por cribado de dichos anticuerpos buscando aquéllos que tengan un valor  $k_{on}$  de al menos  $2,5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , o un valor  $k_{on}$  de al menos  $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$  o incluso  $7,5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ . Tales anticuerpos serán resultado de la presencia de una o más de las CDRs de alta potencia que se describen en esta memoria. Tales anticuerpos se criban fácilmente respecto a valores  $k_{on}$  altos.

Los métodos descritos en esta memoria pueden utilizarse para la producción de anticuerpos con alta potencia, o anticuerpos de potencia incrementada, que tienen afinidad para un antígeno característico del virus respiratorio sincitial (RSV).

En otra realización, la presente invención se refiere a composiciones y medicamentos para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad que comprenden dicha cantidad terapéuticamente activa de la composición o medicamento de un anticuerpo preparado por los métodos descritos en esta memoria. Así, un anticuerpo de este tipo puede ser un anticuerpo completamente nuevo o un anticuerpo conocido y clínicamente útil cuya potencia se ha incrementado por aplicación de los métodos descritos en esta memoria. Las enfermedades que se previenen o se tratan por los anticuerpos preparados por los métodos descritos en esta memoria pueden ser comúnmente enfermedades causadas por microorganismos, tales como bacterias o virus, preferiblemente virus y muy preferiblemente RSV.

Los anticuerpos dados a conocer de este modo tendrán también comúnmente regiones de entramado derivadas de un anticuerpo humano pero, en el caso de no ser de origen humano, son preferiblemente de ratón.

En la generación de los clones, el anticuerpo básico o de referencia (regiones variables de cadena pesada y ligera (CDRs más entramado) representadas en las Figuras 1 y 2) se utilizó como el “molde” para generar las nuevas secuencias CDR de los anticuerpos de la presente invención, impartiendo las últimas valores  $k_{on}$  mayores. Se utilizaron métodos estándar para caracterizar y sintetizar las 6 bibliotecas de CDR de mutaciones simples (véase Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 95:6037-6042 (1998)). La CDR diana se delecionó primeramente para cada una de las bibliotecas antes de la reasociación de los nucleótidos. Para la síntesis de las bibliotecas, las CDRs de un anticuerpo de referencia (véase la Figura 2) se definieron como en la Tabla 1. Se empleó mutagénesis basada en codones para la síntesis de oligonucleótidos a fin de producir las secuencias CDR de la invención (como se ha descrito arriba).

Las bibliotecas se cribaron inicialmente por levantamiento de captura para identificar las variantes de afinidad máxima. Se caracterizaron luego adicionalmente estos clones utilizando ELISA de captura y por titulación sobre un antígeno inmovilizado. Después de dicho cribado, los anticuerpos se criban luego por sus respectivos valores  $k_{on}$ , cuyos efectos positivos se miden después por determinación de la potencia. Las Figuras 4 y 5 muestran detalles adicionales acerca de los procedimientos de la preparación y cribado utilizados en esta memoria.

Tabla 1. Secuencias CDR básicas como se proporcionan en la Figura 2.

CDR	Residuos de Fig. 22	Secuencia	SEQ ID NO.
L1	24-33	<b>SASSSVGYMH</b>	5
L2	49-55	<b>DT<b>SK</b>LAS</b>	6
L3	88-96	<b>FQGS<b>G</b>YP<b>F</b>T</b>	7
H1	31-37	<b>T<b>S</b>GMSVG</b>	8
H2	52-67	<b>DIWWDD<b>K</b><b>K</b>DYN<b>P</b>SL<b>K</b><b>S</b></b>	9
H3	100-109	<b>S<b>M</b>IT<b>N</b>W<b>Y</b>FDV</b>	10

De acuerdo con la presente invención, el DNA de las variantes  $k_{on}$  más altas se secuenció para determinar la naturaleza de los reemplazamientos beneficiosos o de alta potencia. Después del cribado, los anticuerpos se preparan luego con los reemplazamientos de aminoácidos de  $k_{on}$  alto, sea individualmente o en diversas combinaciones, a fin de maximizar los efectos de tales sustituciones y producir con ello anticuerpos de afinidad alta que exhiben también alta potencia.

Como regla general, se encontró que las más beneficiosas de las CDRs de  $k_{on}$  alto eran el resultado de reemplazamientos de aminoácidos en hasta 6 CDRs. Así pues, los anticuerpos neutralizantes de alta potencia (es decir,  $k_{on}$  alto) dados a conocer en esta memoria contienen secuencias de aminoácidos que difieren de la del anticuerpo base o de referencia (por ejemplo, como se muestra en las Figuras 1 y 2) únicamente en las regiones determinantes de la complementariedad L1 (o CDRL1), L2 (o CDRL2), L3 (o CDRL3), H1 (o CDRH1) y H3 (o CDRH3).

**Tabla 2.** Secuencias de CDRs que tienden a inducir alta potencia en los anticuerpos

Clon	CDR	CDR Alta Potencia	Secuencia	SEQ ID NO.
1	L1	-	SASSSVGYMH	5
	L2	X	<b>DT<b>SK</b>LAS</b>	14
	L3	-	FQGS <b>G</b> YP <b>F</b> T	7
	H1	X	<b>T<b>S</b>GMSVG</b>	24

ES 2 390 761 T3

Clon	CDR	CDR Alta Potencia	Secuencia	SEQ ID NO.
	H2	-	DIWWDDKKDYNPSLKS	9
	H3	X	<b>DMITNWFYFDV</b>	31
2	L1	-	SASSSVGGMH	5
	L2	X	<b>DTRKLAS</b>	15
	L3	-	FQGSGYPFT	7
	H1	X	<b>TAGMSVG</b>	24
	H2	-	DIWWDDKKDYNPSLKS	9
	H3	X	<b>DMITNWFYFDV</b>	32
3	L1	-	SASSSVGGMH	5
	L2	X	<b>DTRYKQTS</b>	16
	L3	.	FQGSGYPFT	7
	H1	X	<b>TAGMSVG</b>	24
	H2	-	DIWWDDKKDYNPSLKS	9
	H3	X	<b>DMITNWFYFDV</b>	32
4	L1	-	SASSSVGGMH	5
	L2	X	<b>DTRYLSS</b>	17
	L3	-	FQGSGYPFT	7
	H1	X	<b>TAGMSVG</b>	24
	H2	-	DIWWDDKKDYNPSLKS	9
	H3	X	<b>DMITNWFYFDV</b>	32

ES 2 390 761 T3

Clon	CDR	CDR Alta Potencia	Secuencia	SEQ ID NO.
5	L1	-	SASSSVGYMH	5
	L2	X	<b>DTEFKLAS</b>	15
	L3	-	FQGSQYPFT	7
	H1	X	<b>TAGMSVG</b>	24
	H2	-	DIWWDDKKDYNPSLKS	9
	H3	X	<b>DMITNRYFDV</b>	31
6	L1	-	SASSSVGYMH	5
	L2	X	<b>DTEFKLAS</b>	15
	L3	X	<b>FQGSQYPFT</b>	23
	H 1	X	<b>TAGMSVG</b>	24
	H2	-	DIWWDDKKDYNPSLKS	9
	H3	X	<b>SMITNRYFDV</b>	33
7	L1	X	<b>SASSRQVGYMH</b>	11
	L2	X	<b>DTEFKLAS</b>	15
	L3	-	FQGSQYPFT	7
	H1	X	<b>TAGMSVG</b>	24
	H2	-	DIWWDDKKDYNPSLKS	9
	H3	X	<b>DMITNRYFDV</b>	31
8	L1	-	SASSSVGYMH	5

ES 2 390 761 T3

Clon	CDR	CDR Alta Potencia	Secuencia	SEQ ID NO.
	L2	X	<b>D</b> T <b>F</b> <b>R</b> L <b>A</b> S	60
	L3	-	FQGS <b>G</b> YPFT	7
	H1	X	T <b>A</b> <b>G</b> M <b>S</b> V <b>G</b>	24
	H2	-	DIW <b>W</b> DD <b>K</b> KD <b>Y</b> N <b>P</b> S <b>L</b> K <b>S</b>	9
	H3	X	<b>D</b> M <b>I</b> T <b>N</b> <b>F</b> <b>Y</b> F <b>D</b> V	31
9	L1	X	<b>S</b> L <b>S</b> <b>S</b> <b>R</b> V <b>G</b> Y <b>M</b> H	12
	L2	X	D <b>T</b> <b>F</b> <b>Y</b> L <b>S</b> S	61
	L3	-	FQGS <b>G</b> YPFT	7
	H1	X	T <b>F</b> <b>G</b> M <b>S</b> V <b>G</b>	25
	H2	X	DIW <b>W</b> DD <b>K</b> K <b>H</b> <b>I</b> <b>N</b> P <b>S</b> L <b>K</b> <b>D</b>	26
	H3	X	<b>D</b> M <b>I</b> <b>F</b> <b>N</b> <b>F</b> <b>Y</b> F <b>D</b> V	34
10	L1	X	<b>S</b> L <b>S</b> <b>S</b> <b>R</b> V <b>G</b> Y <b>M</b> H	12
	L2	X	D <b>T</b> <b>R</b> <b>G</b> L <b>S</b> S	18
	L3	-	FQGS <b>G</b> YPFT	7
	H1	X	T <b>F</b> <b>G</b> M <b>S</b> V <b>G</b>	25
	H2	X	DIW <b>W</b> D <b>G</b> <b>K</b> K <b>H</b> <b>I</b> <b>N</b> P <b>S</b> L <b>K</b> <b>D</b>	27
	H3	X	<b>D</b> M <b>I</b> <b>F</b> <b>N</b> <b>F</b> <b>Y</b> F <b>D</b> V	34
11	L1	X	<b>S</b> <b>P</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>R</b> V <b>G</b> Y <b>M</b> H	13
	L2	X	D <b>T</b> <b>M</b> <b>R</b> L <b>A</b> S	19

ES 2 390 761 T3

Clon	CDR	CDR Alta Potencia	Secuencia	SEQ ID NO.
	L3	-	FQGSGYPFT	7
	H1	X	T <b>PG</b> MSVG	25
	H2	X	DIWWD <b>G</b> KK <b>H</b> YNPSLK <b>D</b>	27
	H3	X	<b>D</b> M <b>I</b> F <b>N</b> YFDV	34
12	L1	X	S <b>L</b> SS <b>R</b> VG <b>M</b> H	12
	L2	X	DT <b>F</b> KL <b>S</b> S	20
	L3	-	FQGSGYPFT	7
	H1	X	T <b>A</b> GMSVG	24
	H2	X	DIWWD <b>G</b> KK <b>H</b> YNPSLK <b>D</b>	27
	H3	X	<b>D</b> M <b>I</b> F <b>N</b> YFDV	34
13	L1	X	S <b>A</b> SS <b>R</b> VG <b>M</b> H	11
	L2	X	DT <b>F</b> KL <b>S</b> S	20
	L3	-	FQGSGYPFT	7
	H1	X	T <b>A</b> GMSVG	24
	H2	X	DIWWD <b>G</b> KK <b>D</b> YNPSLK <b>D</b>	28
	H3	X	<b>D</b> M <b>I</b> F <b>N</b> YFDV	34
14	L1	X	S <b>F</b> SS <b>R</b> VG <b>M</b> H	13
	L2	X	DT <b>Y</b> R <b>H</b> SS	21

ES 2 390 761 T3

Clon	CDR	CDR Alta Potencia	Secuencia	SEQ ID NO.
	L3	-	FQGSGYPFT	7
	H1	X	TAGMSVG	24
	H2	X	DIWWDDKKHYNPSLKD	29
	H3	X	DMIFNWFYFDV	32
15	L1	X	SLSSRVGYMH	12
	L2	X	DTMYQSS	22
	L3	-	FQGSGYPFT	7
	H1	X	TAGMSVG	24
	H2	X	DIWWDGKKSYNPSLKD	30
	H3	X	DMIFNWFYFDV	34
16	L1	X	KQQLSVGYMH	59
	L2	-	DTSKLAS	6
	L3	-	FQGSGYPFT	7
	H1	-	TSGMSVG	8
	H2	-	DIWWDDKKDYNPSLKS	9
	H3	-	SMITNWFYFDV	10
17	L1	-	SASSSVGYMH	5
	L2	X	DTFKLAS	15
	L3	X	FQGSFYPFT	23

ES 2 390 761 T3

Clon	CDR	CDR Alta Potencia	Secuencia	SEQ ID NO.
	H1	X	<b>TAGMSVG</b>	24
	H2	-	DIWWDDKKDYNPSLKS	9
	H3	X	<b>SMITNFYFDV</b>	33
18	L1	X	<b>LPSSRVGYMH</b>	56
	L2	X	<b>DTMYQSS</b>	22
	L3	-	FQGSGYPFT	7
	H1	X	<b>TAGMSVG</b>	24
	H2	X	<b>DIWWDGKKSYNPSLKS</b>	62
	H3	X	<b>DMITNFYFDV</b>	34
19	L1	X	<b>SASSRVGYMH</b>	11
	L2	X	<b>DTFFLDS</b>	57
	L3	-	FQGSGYPFT	7
	H1	X	<b>TAGMSVG</b>	24
	H2	X	<b>DIWWDDKKHYNPSLKD</b>	26
	H3	X	<b>DMITNFYFDV</b>	34
20	L1	X	<b>SPSSRVGYMH</b>	13
	L2	X	<b>DTRYQSS</b>	58

Clon	CDR	CDR Alta Potencia	Secuencia	SEQ ID NO.
	L2	-	FQSGYPFT	7
	H1	X	<b>TAGMSVG</b>	24
	H2	X	<b>DIWWDDKKS<sup>Y</sup>YNPSLKD</b>	55
	H3	X	<b>DM<sup>Y</sup>FNWYFDV</b>	32

Así, para las secuencias de aminoácidos de la Figura 3, se reemplazaron aminoácidos seleccionados de la secuencia de la Figura 2 como medio para aumentar la potencia del anticuerpo con las secuencias de las cadenas pesada y ligera que se muestran en la Figura 2.

5 Los anticuerpos seleccionados de  $k_{on}$  alto (y fragmentos activos de los mismos) resultantes de los métodos dados a conocer en esta memoria se muestran en la Tabla 2 (todos los cuales tienen las secuencias de entramado de la Figura 2) donde el clon de referencia es el clon que tiene las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera que se muestran en la Figura 2 (SEQ ID NO: 3 y 4 para las secuencias ligera y pesada, respectivamente).

10 La Tabla 2 indica las secuencias de aminoácidos (todas las secuencias en el código estándar de aminoácidos de una sola letra) de las CDRs de alto  $k_{on}$  empleadas en los anticuerpos de alta potencia preparados de acuerdo con los métodos dados a conocer en esta memoria. En la Tabla 2, las localizaciones de las sustituciones de aminoácidos fundamentales hechas en las CDRs correspondientes de la Tabla 1 (es decir, las localizaciones en las cuales las CDRs difieren en aminoácidos) se indican por un recuadro alrededor del o de los aminoácidos.

15 De acuerdo con la invención, por combinación de tales sustituciones de aminoácidos de tal manera que ocurriera más de una en la misma molécula de anticuerpo, fue posible aumentar notablemente la potencia de los anticuerpos dados a conocer en esta memoria.

En general, existe una correlación entre  $k_{on}$  y potencia del anticuerpo, teniendo la totalidad de las variantes de  $k_{on}$  más alto más de una CDR beneficiosa o de  $k_{on}$  alto, teniendo incluso la totalidad de las 6 CDRs sustituidas.

20 En una realización, un anticuerpo preparado de tal manera que tenga  $k_{on}$  incrementado es un anticuerpo neutralizante de RSV, con una afinidad de al menos  $10^9 M^{-1}$  y preferiblemente al menos  $10^{10} M^{-1}$ , que es también un anticuerpo humanizado que incluye una región constante humana y una región de entramado para las cadenas pesada y ligera en donde al menos una porción del entramado se deriva de un anticuerpo humano (o de una secuencia de consenso de un entramado de anticuerpo humano).

En otra realización, la totalidad del entramado se deriva de un anticuerpo humano (o una secuencia de consenso humana).

25 En otra realización, un anticuerpo producido de acuerdo con la presente invención, con una afinidad de al menos  $10^9 M^{-1}$  y preferiblemente al menos  $10^{10} M^{-1}$ , es un anticuerpo injertado que tiene una región constante humana, una o más CDRs que se derivan de un anticuerpo no humano en el cual al menos uno de los aminoácidos en al menos una de dichas CDRs está cambiado y en el cual la totalidad o una parte del entramado se deriva de un anticuerpo humano (o una secuencia de consenso de un entramado de anticuerpo humano).

30 Con tal que las secuencias CDR deseadas, y la secuencia constante y de entramado sean conocidas, pueden ensamblarse genes con las secuencias deseadas y, utilizando una diversidad de vectores, insertarse en células apropiadas para expresión de las moléculas de anticuerpo tetrámeras funcionales. El acoplamiento de esto con la metodología ya descrita, permite el ensamblado de bibliotecas de mutaciones simples en las cuales los anticuerpos poseen las mismas secuencias que los anticuerpos injertados correspondientes y, por consiguiente, las mismas estructura y afinidades de fijación.

35 Las combinaciones de las secuencias CDR descritas en la Tabla 2 pueden estar presentes en moléculas de anticuerpos tetrámeros enteros o en fragmentos activos, tales como un fragmento Fab. Los datos de potencia para los clones 1 a 5 que se muestran en la Tabla 3 corresponden a fragmentos Fab, mientras que los datos para los clones 16 y 17 de la Tabla 3 corresponden a moléculas de anticuerpo enteras (el clon 16 es MEDI-493 con la secuencia descrita en Johnson et al (1997)).

40

Las moléculas de anticuerpos enteros de acuerdo con la presente invención incluyen moléculas de anticuerpo que tienen secuencias de cadena pesada (región variable más constante) seleccionadas del grupo constituido por SEQ ID NO: 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51 y 53 y con secuencias de cadena ligera (región variable más constante) seleccionadas del grupo constituido por SEQ ID NO: 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, y 54.

5 Los anticuerpos de  $k_{on}$  relativamente alto de la invención pueden estar presentes en una forma relativamente pura o aislada así como en un sobrenadante extraído de células cultivadas en pocillos o en placas. Los anticuerpos de la invención pueden estar presentes también por tanto en la forma de una composición que comprende el anticuerpo de la invención y en la cual dicho anticuerpo está suspendido en un diluyente o excipiente farmacológicamente aceptable. Los anticuerpos de la invención pueden estar presentes en una composición de este tipo a una  
10 concentración, o en una cantidad, suficiente para ser terapéutica o farmacológicamente valiosa en el tratamiento o la prevención de enfermedades (por ejemplo, prevención de RSV, con inclusión de la mayor incidencia de asma y respiración jadeante que ocurren a menudo después de tales infecciones). Dichos anticuerpos pueden estar presentes también en una composición en forma más diluida.

15 Por consiguiente, la invención está dirigida también a proporcionar composiciones y medicamentos para el uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades, especialmente enfermedades víricas, muy especialmente infecciones del virus respiratorio sincitial, comprendiendo dicha composición o medicamento una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de anticuerpos descrita en esta memoria.

20 En una realización particular, un anticuerpo neutralizante de alta potencia de la presente invención tiene las secuencias de dominios de cadena pesada y dominios de cadena ligera representadas en la Figura 3B (SEQ ID NO: 36) y la Figura 3A (SEQ ID NO: 35), respectivamente. Las CDRs de las cadenas pesada y ligera son las mismas que las dadas en la Tabla 2 para el clon 15.

25 Debe tenerse en cuenta que si bien los anticuerpos de  $k_{on}$  incrementado de la presente invención podrían ensamblarse a partir de regiones CDR y regiones no-CDR derivadas de anticuerpos reales neutralizantes por remodelación conjunta de segmentos de aminoácidos (y los anticuerpos así ensamblados estarían dentro de la invención descrita en esta memoria), los anticuerpos de la presente invención se preparan más convenientemente modificando por ingeniería genética secuencias génicas apropiadas para producir vectores que pueden transfectarse luego a líneas de células adecuadas para expresión eventual de las moléculas de anticuerpo ensambladas por las  
30 células modificadas. De hecho, tales procedimientos recombinantes se emplearon para preparar los anticuerpos descritos en esta memoria. Adicionalmente, dado que las secuencias de las cadenas de los anticuerpos de afinidad alta son conocidas por la exposición de esta memoria, tales anticuerpos podrían ensamblarse también por síntesis directa de las cadenas apropiadas dejando luego que éstas se autoensamblaran en estructuras de anticuerpos tetrámeros.

#### Materiales y Métodos Generales

35 **Anticuerpos Monoclonales.** MEDI-493 es un MAb humanizado de IgG<sub>1</sub> (COR)/kappa (K102) (las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera se representan en la Figura 1) que contiene los determinantes de fijación de antígeno de MAb 1129 murino [Johnson et al, J. Infect. Dis., 176, 1215-1224 (1997); Beeler y van Wyck Coelingh, J. Virol., 63, 2941-2950 (1989)].

40 **Ensayo de Inhibición de la Fusión de RSV.** La aptitud de los anticuerpos para bloquear la fusión inducida por RSV después de fijación viral a las células se determinó en un ensayo de inhibición de la fusión. Este ensayo era idéntico al ensayo de microneutralización, excepto que las células se infectaron con RSV (largo) durante 4 horas antes de la adición del anticuerpo [Taylor et al., J. Gen. Virol., 73, 2217-2223 (1992)].

45 **Análisis BIAcore.** El análisis de epítopes de los MAbs se realizó utilizando un biosensor BIAcore (BIAcore, Piscataway, NJ) [Karlsson et al, J. Immunol. Methods, 145, 229-240 (1991); Johne, Mol. Biotechnol., 9, 65-71 (1998)] con un sistema Microfluidics de resonancia de plasmones. El antígeno utilizado para este ensayo era una proteína RSV truncada (A2) F (aminoácidos 1-526) expresada en baculovirus. La proteína F de RSV purificada se acopló covalentemente a un chip sensor CM5 activado con *N*-hidroxisuccinimida/1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]-carbodiimida de acuerdo con el protocolo del fabricante, y los grupos éster activos sin reaccionar se hicieron reaccionar con etanolamina 1M. Una inyección primaria de 1  $\mu$ M o 10  $\mu$ M MEDI-493 fue seguida por un paso de lavado con HBSS, y luego por una inyección secundaria de MEDI-493 o RHSZ19. Los sensores se analizaron utilizando software  
50 de evaluación BIA.

55 **Calorimetría de Titulación Isotérmica.** La afinidad de la solución de cada MAb para la proteína F del RSV se determinó por calorimetría de titulación isotérmica [Wiseman et al., Anal. Biochem., 179, 131-137 (1989)]. Una solución de 1,4 ml de proteína F de RSV 4,5  $\mu$ M se tituló con inyecciones de 5,5  $\mu$ l de MEDI-493 26  $\mu$ M o RHSZ19. Después de cada inyección de MAb, se midió la cantidad de calor desprendida, que es proporcional a la cantidad de fijación. El antígeno utilizado era una proteína F de RSV truncada (A2) (aminoácidos 25-524) expresada en células de *Drosophila*. Las titulaciones se realizaron a 44° y 55°C hasta alcanzar la ratio óptima de señal a ruido. La estabilidad térmica de los MAbs y la proteína F a estas temperaturas se demostró por experimentos de despliegue por dicroísmo circular. Las afinidades se corrigieron a 37°C para comparación con datos in vivo utilizando la

ecuación integrada de van't Hoff [Doyle y Hensley, *Methods Enzymol.*, 295, 88-99 (1998)]. La corrección de van't Hoff está basada exclusivamente en el cambio de entalpía de fijación de la proteína F que se medía directamente por calorimetría. Dado que se encontró que los cambios de entalpía de fijación para MEDI-493 y RSHZ19 eran muy similares, las correcciones de temperatura para sus  $K_d$ s eran casi idénticas.

5 **Profilaxis de la Rata del Algodón.** La eficacia *in vivo* se determina utilizando el modelo de la rata del algodón [Prince et al, *J. Virol.*, 55, 517-520 (1985)]. Las ratas del algodón (*Sigmodon hispidus*, peso medio 100 gramos) se anestesian con metoxifluorano, se sangran, y reciben 0,1 ml de MAb purificado por inyección intramuscular (i.m.) a dosis de 5, 2,5, 1,25, ó 0,625 mg/kg de peso corporal, o control de seroalbúmina bovina (BSA) a 5 mg/kg de peso corporal. 24 horas más tarde, los animales se pesan nuevamente, se sangran para determinación de la  
10 concentración de MAB en el suero, y se enfrentan por instigación intranasal (i.n.) de  $10^5$  PFU a cepas A (larga) o B (18537) de RSV. 4 días más tarde se sacrifican los animales y se extirpan sus pulmones. Los pulmones se homogeneizan en 10 partes (peso/volumen) de solución salina equilibrada de Hanks, y la suspensión resultante se utilizó para determinar los títulos virales pulmonares por ensayo de calvas. Los títulos de anticuerpos en suero en el momento del enfrentamiento se determinan por un ELISA de IgG anti-humana.

## 15 Ejemplo 1

### **Análisis Cinético de Mabs de RSV Humanizados por BIAcore TM**

La cinética de interacción entre los Mabs anti-RSV de afinidad alta y la proteína F de RSV se estudió por resonancia de plasmones de superficie utilizando un biosensor BIAcore<sup>TM</sup> de Pharmacia. Un baculovirus recombinante que expresaba una proteína F C-terminal truncada proporcionó una fuente abundante de antígeno para estudios  
20 cinéticos. El sobrenadante, que contenía la proteína F secretada, se enriqueció aproximadamente 20 veces por cromatografía sucesiva en columnas de concanavalina A y Q-Sepharose. Las fracciones agrupadas se dializaron contra citrato de sodio 10 mM (pH 5,5), y se concentraron a aproximadamente 0,1 mg/ml. En un experimento típico, una parte alícuota de la proteína F (100 ml) se sometió a acoplamiento amínico al chip del sensor BIAcore. La cantidad inmovilizada daba aproximadamente 2000 unidades de respuesta ( $R_{max}$ ) de señal cuando se saturaba con H1129 o H1308F (preparados de acuerdo con la patente U.S. 5.824.307). Esto indicaba que existía un número igual de sitios antigénicos "A" y "C" en la preparación de proteína F después del procedimiento de acoplamiento. Dos  
25 Mabs irrelevantes no afines (RVFV 4D4 y CMV H758) no exhibían interacción alguna con la proteína F inmovilizada. Un estudio cinético típico implicó la inyección de 35 ml de Mab a concentraciones variables (25-300 nM) en tampón PBS que contenía 0,05% Tween-20 (PBS/Tween). El caudal se mantuvo a 5 ml/min, dando una fase de fijación de 7 min. Después de la inyección de Mab, se cambió el flujo con tampón PBS/Tween durante 30 min para determinar la velocidad de disociación. El chip sensor se regeneró entre los ciclos con un pulso de 2 min de HCl 10 mM. El paso de regeneración causó una pérdida mínima de capacidad de fijación de la proteína F inmovilizada (4% de pérdida por ciclo). Esta pequeña disminución no cambiaba los valores calculados de las constantes de velocidad para fijación y disociación (denominadas también  $k_{on}$  y  $k_{off}$ , respectivamente).

35 De modo más específico, para la medida de  $K_{assoc}$  (o  $k_{on}$ ), la proteína F se inmovilizó directamente por el método EDC/NHS (EDC = N-etil-N'-[3-dietilaminopropil]-carbodiimida). Resumidamente, se prepararon 4  $\mu$ g/ml de proteína F en NaOAc 10 mM, de pH 4,0 y una inyección de aproximadamente 30  $\mu$ l da aproximadamente 500 RU (unidades de respuesta) de proteína F inmovilizada en las condiciones referidas anteriormente. La célula de flujo en blanco (VnR inmovilizada-superficie CM de dextrano) se sustrajo para análisis cinético. La columna pudo regenerarse  
40 utilizando HCl 100 mM (requiriéndose 72 segundos de tiempo de contacto para regeneración plena). Este tratamiento eliminaba completamente el Fab fijado sin dañar el antígeno inmovilizado, y podía utilizarse durante más de 40 regeneraciones. Para las medidas de  $k_{on}$ , las concentraciones de Fab eran 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, y 400 nM. La fase de disociación se analizó desde 230 segundos (30 segundos después del comienzo de la fase de disociación) hasta 900 segundos. Las cinéticas se realizaron por el ajuste 1:1 de Langmuir (ajuste global). Las medidas se realizaron en tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% (v/v) de Agente Tensioactivo P20.

Para las medidas de clones combinatorios, como se exponen en esta memoria, se midieron por separado los valores  $k_{on}$  y  $k_{off}$ . El valor  $k_{on}$  se midió en condiciones que eran iguales que las utilizadas para los clones de mutación simple y se realizó análogamente.

50 Para la medida de  $k_{off}$  (o  $K_{dissoc}$ ) se emplearon las condiciones siguientes. Resumidamente, se inmovilizaron 4100 RU de proteína F (como anteriormente) con CM-dextrano utilizado como el blanco. En este caso, se fijaban 3000 RU de Fab (con Fab disociado suficientemente alto para contrarrestar la fluctuación de la máquina). Como tampón se utilizó HBS más 5 nM de proteína F (aproximadamente 350-2000 veces mayor que la  $k_{dissoc}$  o  $k_d$  - la constante de disociación en equilibrio). La fase de disociación fue de 6 a 15 horas a un caudal de 5  $\mu$ l/min. En las condiciones  
55 utilizadas en esta memoria, la re-fijación del Fab disociado era mínima. Para más detalles, véase el manual con el biosensor.

La fijación de los anticuerpos anti-RSV de afinidad alta a la proteína F, u otros sitios epitópicos en RSV, descritos en esta memoria se calculó a partir de la ratio de la constante de velocidad de primer orden para disociación de la

constante de velocidad de segundo orden para fijación o asociación ( $k_d = k_{diss}/k_{assoc}$ ). El valor para  $k_{assoc}$  se calculó basándose en la ecuación de velocidad siguiente:

$$dR/dt = k_{assoc}[Mab]R_{max} - (k_{assoc}[Mab] + k_{diss})R$$

5 donde R y  $R_{max}$  son las unidades de respuesta en el tiempo t y en el infinito, respectivamente. Una gráfica de dr/dt en función de R da una pendiente de  $(k_{assoc} [Mab] + k_{diss})$ . Dado que estas pendientes están relacionadas linealmente con el valor [Mab], el valor  $k_{assoc}$  puede derivarse de una repetición de la gráfica de las pendientes frente a [Mab]. La pendiente de la nueva línea es igual a  $k_{assoc}$ . Aunque el valor de  $k_{diss}$  puede extrapolarse a partir de la intersección con el eje Y, un valor más exacto se determinó por medida directa de  $k_{diss}$ . Después de la fase de inyección del Mab, el tampón PBS/Tween se deja fluir a través del chip sensor. A partir de este punto, [Mab] = 0. La ecuación expuesta  
10 anteriormente para dR/dt se reduce por tanto a:

$$dr/dt = k_{diss} R \quad \text{o} \quad dR/R = k_{diss} dt$$

La integración de esta ecuación da luego:

$$\ln(R_0/R_t) = k_{diss} t$$

15 donde  $R_0/R_t$  son las unidades de respuesta para el tiempo 0 (comienzo de la fase de disociación) y t, respectivamente. Por último, la representación gráfica de  $\ln(R_0/R_t)$  en función de t da una pendiente de  $k_{diss}$ . En la realización preferida de esta memoria, los valores numéricos de tales variantes de anticuerpo se muestran en la Tabla 3.

20 Para los clones de las Tablas 2 y 3, el clon de referencia es el fragmento Fab con las secuencias que se muestran en la Figura 2 y las CDRs que se muestran en la Tabla 1. Los clones 1-15 son fragmentos Fab que tienen las secuencias de entramado de la Figura 2 y las combinaciones de CDR indicadas de los clones 1-15 de la Tabla 2 (donde la "X" indica una CDR de alta potencia (es decir, una CDR cuya presencia frente a la secuencia de referencia da como resultado potencia elevada y una potencia mayor que la Fab de referencia)). Donde no aparece ninguna "X" al lado de la CDR de la Tabla 2, la secuencia es justamente la secuencia correspondiente del Fab de referencia (a partir de la Tabla 1 y la Figura 2).

25 Tabla 3. Sumario de las Constantes Cinéticas para Anticuerpos de alta Potencia

Clon No.	$K_{on} \times 10^5 (M^{-1}s^{-1})$	$K_{off} \times 10^{-4} (s^{-1})$	EC <sub>50</sub> (nM)
Ref.	1,85	6,5	3,52
1	3,65	3,26	2,26
2	5,31	4,22	5,05
3	6,05	4,22	4,70
4	7,57	4,62	3,55
5	4,16	3,06	2,61
6	1,85	3,20	2,88
7	3,70	2,51	1,59
8	3,75	2,73	2,67
9	6,63	2,82	0,29
10	5,27	2,99	1,06
11	5,71	7,17	20,9
12	7,9	4,53	3,24
13	7,43	2,30	0,81
14	7,35	2,50	2,23
15	7,81	2,80	0,56
16	2,04	7,35	6,12
17	1,09	2,49	2,7

Tabla 4. Títulos de Microneutralización de RSV en el Punto Final de IgGs y Fabs Mutantes de Velocidad on "Alta"

Tipo	Clon No.	Media CI50 µg/ml	Estándar CI50	Diferencia, veces	Media CI50 (Control) µg/ml	Estándar (Control CI50)	Diferencia, veces (Control CI50)	Número de Repeticiones del Ensayo
IgG	16	0,4527	0,208	-	0,5351	0,238	-	8
"	24	0,0625	0,0268	7	0,0645	0,0223	8	3
"	18	0,0342	0,022	13	0,0354	0,0187	15	4
"	23	0,0217	0,0331	21	0,0289	0,0110	19	5
"	21	0,0231	0,0141	20	0,0223	0,0083	24	6
"	20	0,0337	0,0309	13	0,0383	0,0283	14	5
"	25	0,0357	0,0316	13	0,0354	0,0261	15	7
"	22	0,0242	0,0163	19	0,0235	0,0076	23	7
"	26	0,0376	0,0268	12	0,0375	0,0213	14	6
"	19	0,0171	0,0018	27	0,0154	0,00417	35	2
Fab	12	0,157	-	3	0,125	-	4	1
"	27	0,0179	-	25	0,0171	-	31	1
"	11	>1,00	-	-	>1,00	-	-	1
"	9	0,0407	0,0112	11	0,0326	0,009	16	2
"	28	0,177	-	3	0,157	-	34	1
"	13	0,0287	0,00417	16	0,0310	0,00982	17	2
"	10	0,0464	0,00791	10	0,0351	0,0126	15	2
"	15	0,0264	0,00141	17	0,0258	0,00071	21	2
"	29	0,0414	-	11	0,0411	-	13	1
"	14	0,120	0,0222	4	0,1022	0,0260	5	2
"	30	0,194	0,462	2	0,176	0,0625	3	2

Los resultados de la Tabla 4 comparan fragmentos Fab y moléculas de anticuerpos tetrámeros enteros relacionadas por los valores CI<sub>50</sub> (o la concentración en µg/ml que da 50% de inhibición frente a controles similares a los de la Tabla 3). El clon 16 de la Tabla es el anticuerpo de referencia con las CDRs descritas en la Tabla 2.

- 5 Los clones 16 y 17 de la Tabla 3 son anticuerpos monoclonales reales con las secuencias de entramado de la Figura 1 y regiones constantes como las descritas en Johnson et al (1997). Las secuencias de entramado de estos anticuerpos pueden diferir ligeramente de las de los fragmentos Fab.

10 Los clones 18 a 26 de la Tabla 4 son moléculas de anticuerpo tetrámeros similares a los clones 16 y 17 pero que tienen secuencias CDR de alta potencia. El clon 21 del anticuerpo tiene las mismas secuencias CDR que el clon 9 de Fab, el clon 22 del anticuerpo tiene las mismas secuencias CDR que el clon 10 de Fab, el clon 23 del anticuerpo

tiene las mismas secuencias CDR que el clon 11 de Fab, el clon 24 del anticuerpo tiene las mismas secuencias CDR que el clon 12 de Fab, el clon 25 del anticuerpo tiene las mismas secuencias CDR que el clon 13 de Fab, y el clon 26 del anticuerpo tiene las mismas secuencias CDR que el clon 15 de Fab. Los clones 18, 19 y 20 del anticuerpo de la Tabla 3 son anticuerpos tetrámeros de longitud total con las combinaciones CDR dadas en la Tabla 2. Las secuencias de entramado de estos anticuerpos pueden diferir ligeramente de las de los fragmentos Fab.

Los aminoácidos subrayados de las secuencias CDR de la Tabla 2 representan los residuos de aminoácidos localizados en las localizaciones clave dentro de las CDRs de alta potencia de los anticuerpos de alta potencia producidos por los métodos de la presente invención. Por ejemplo, para aumentar la potencia de un anticuerpo por producción de un valor  $K_{on}$  mayor, los aminoácidos localizados en las posiciones clave expuestas en esta memoria por los residuos en negrita y subrayados en la Tabla 1 para el anticuerpo de referencia se reemplazarían por los aminoácidos listados bajo CDRs de la Tabla 2 (también con negrita y subrayados). Así pues, estos códigos de una sola letra representan los aminoácidos que reemplazan a los aminoácidos de referencia en las posiciones clave (o posiciones críticas) de las CDRs que se muestran en la Figura 2 (residuos en negrita en las secuencias de la Tabla 2) para un anticuerpo de referencia cuya potencia debe aumentarse.

Para los clones de la Tabla 4, el clon 18 tiene las secuencias de longitud total dadas por SEQ ID NO: 41 (cadena pesada) y 42 (cadena ligera); el clon 19 tiene las secuencias de longitud total dadas por SEQ ID NO: 45 (cadena pesada) y 46 (cadena ligera), el clon 20 tiene las secuencias de longitud total dadas por SEQ ID NO: 47 (cadena pesada) y 48 (cadena ligera), el clon 21 tiene las secuencias de longitud total dadas por SEQ ID NO: 51 (cadena pesada) y 52 (cadena ligera), el clon 22 tiene las secuencias de longitud total dadas por SEQ ID NO: 53 (cadena pesada) y 54 (cadena ligera), el clon 23 tiene las secuencias de longitud total dadas por SEQ ID NO: 49 (cadena pesada) y 50 (cadena ligera), el clon 24 tiene las secuencias de longitud total dadas por SEQ ID NO: 43 (cadena pesada) y 44 (cadena ligera), el clon 25 tiene las secuencias de longitud total dadas por SEQ ID NO: 37 (cadena pesada) y 38 (cadena ligera), y el clon 26 tiene las secuencias de longitud total dadas por SEQ ID NO: 39 (cadena pesada) y 40 (cadena ligera).

En este caso, el clon 18 (IgG) y el clon 27 (Fab) tienen las mismas CDRs, el clon 19 (IgG) y el clon 29 (Fab) tienen las mismas CDRs, el clon 20 (IgG) y el clon 28 (Fab) tienen las mismas CDRs, el clon 21 (IgG) y el clon 9 (Fab) tienen las mismas CDRs, el clon 22 (IgG) y el clon 10 (Fab) tienen las mismas CDRs, el clon 23 (IgG) y el clon 11 (Fab) tienen las mismas CDRs, el clon 24 (IgG) y el clon 12 (Fab) tienen las mismas CDRs, el clon 25 (IgG) y el clon 13 (Fab) tienen las mismas CDRs, el clon 26 (IgG) y el clon 15 (Fab) tienen las mismas CDRs. Así pues, los datos de la Tabla 4 correlacionan la actividad de los fragmentos Fab con la de una molécula de anticuerpo completa.

Por tanto, la presente invención incluye anticuerpos neutralizantes tetrámeros enteros de alta potencia en los cuales dicho anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 37, 39, 41, 45, 47, 49, 43, 51 y 53, y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 y 54, preferiblemente donde dichos anticuerpos son los anticuerpos de los clones 18-26.

## Ejemplo 2

### Ensayo de Microneutralización

La neutralización de los anticuerpos de la presente invención se determinó por ensayo de microneutralización. Este ensayo de microneutralización es una modificación de los procedimientos descritos por Anderson et al ["Microneutralization test for respiratory syncytial virus based on an enzyme immunoassay, J. Clin. Microbiol. 22, 1050-1052 (1985)]. El procedimiento utilizado aquí se describe en Johnson et al [J. Infectious Diseases, 180, 35-40 (1999)]. Se hicieron diluciones de los anticuerpos por triplicado utilizando una placa de 96 pocillos. Se incubaron 10 TCID<sub>50</sub> del virus respiratorio sincitial (RSV - cadena larga) con diluciones seriadas del anticuerpo (o Fabs) para testado durante 2 horas a 37° en los pocillos de una placa de 96 pocillos. Se añadieron luego a cada pocillo células HEP-2 sensibles a RSV ( $2,5 \times 10^4$ ) y se cultivaron durante 5 días a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. Después de 5 días, se aspiró el medio y las células se lavaron y se fijaron a las placas con 80% metanol y 20% PBS. Se determinó luego la replicación del RSV por expresión de la proteína F. Las células fijadas se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-proteína F conjugado con biotina (proteína pan F, Mab 133-1H específico del sitio C) se lavaron y se añadió a los pocillos avidina conjugada con peroxidasa de rábano picante. Los pocillos se lavaron nuevamente y se midió la renovación del sustrato TMB (ácido tionitrobenzoico) a 450 nm. El título de neutralización se expresó como la concentración de anticuerpo que causaba al menos 50% de reducción en la absorbencia a 450 nm (la DO<sub>450</sub>) a partir de células de control que contenían únicamente el virus.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Young, James F.  
 Koenig, Scott  
 5 Johnson, Leslie S.  
 Huse, William D.  
 Wu, Herren  
 Watkins, Jeffry D.

<120> Anticuerpos recombinantes de alta potencia y métodos para producirlos

10 <130> 469201-525  
 <140>  
 <141>  
 <150> U.S. 60/186,252  
 <151> 01-03-2000

15 <160> 59  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 <210> 1  
 <211> 106  
 <212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de región variable de la cadena ligera de anticuerpo humanizado Medi-493.  
 <400> 1

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

25 <210> 2  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 390 761 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de región variable de la cadena pesada de anticuerpo humanizado Medi-493

<400> 2

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

5

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de región variable de la cadena ligera de un anticuerpo humanizado.

<400> 3

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



<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia referencia CDR de cadena ligera.  
 <400> 6  
**Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser**  
**1 5**  
 <210> 7  
 5 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia referencia CDR de cadena ligera.  
 10 <400> 7  
**Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr**  
**1 5**  
 <210> 8  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia referencia CDR de cadena pesada.  
 <400> 8  
**Thr Ser Gly Met Ser Val Gly**  
**1 5**  
 20 <210> 9  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia referencia CDR de cadena pesada.  
 <400> 9  
**Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser**  
**1 5 10 15**  
 <210> 10  
 <211> 10  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia referencia CDR de cadena pesada.  
 <400> 10  
**Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val**  
 35 **1 5 10**  
 <210> 11  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.

<400> 11

**Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His**  
**1 5 10**

<210> 12

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.

10 <400> 12

**Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His**  
**1 5 10**

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.

<400> 13

**Ser Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His**  
**1 5 10**

20 <210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.

<400> 14

**Asp Thr Phe Lys Leu Thr Ser**  
**1 5**

<210> 15

<211> 7

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.

<400> 15

**Asp Thr Phe Lys Leu Ala Ser**  
**1 5**

35 <210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.

<400> 16

**Asp Thr Tyr Lys Gln Thr Ser**  
**1 5**

5 <210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.

<400> 17

**Asp Thr Arg Tyr Leu Ser Ser**  
**1 5**

<210> 18

<211> 7

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.

<400> 18

**Asp Thr Arg Gly Leu Pro Ser**  
**1 5**

20 <210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.

<400> 19

**Asp Thr Met Arg Leu Ala Ser**  
**1 5**

30 <210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.

35 <400> 20

**Asp Thr Phe Lys Leu Ser Ser**  
**1 5**

<210> 21

<211> 7

<212> PRT



<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.

5 <400> 26  
**Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp**  
**1 5 10 15**

<210> 27  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.  
 <400> 27  
**Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp**  
**1 5 10 15**

15 <210> 28  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.  
 <400> 28  
**Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp**  
**1 5 10 15**

<210> 29  
 <211> 16  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.  
 <400> 29  
**Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp**  
 30 **1 5 10 15**

<210> 30  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.  
 <400> 30  
**Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp**  
**1 5 10 15**

<210> 31

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.  
 <400> 31  
**Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val**  
**1 5 10**

<210> 32  
 <211> 10  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.  
 <400> 32  
**Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val**  
 15 **1 5 10**

<210> 33  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.  
 <400> 33  
**Ser Met Ile Thr Asn Phe Tyr Phe Asp Val**  
**1 5 10**

<210> 34  
 25 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.  
 30 <400> 34  
**Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val**  
**1 5 10**

<210> 35  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena pesada de anticuerpo de alta potencia.  
 <400> 35

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

<210> 36

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena ligera de anticuerpo de alta potencia.

<400> 36

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

## ES 2 390 761 T3

<210> 37  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena pesada de anticuerpo de alta potencia.  
<400> 37

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60  
 Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
450

<210> 38

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena ligera de anticuerpo de alta potencia.

<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Thr Phe Lys Leu Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110  
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 115 120 125  
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 130 135 140  
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165 170 175  
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 180 185 190  
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205  
 Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 39

<211> 450

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena pesada de anticuerpo de alta potencia.

<400> 39

ES 2 390 761 T3

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

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
 450

<210> 40

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena ligera de anticuerpo de alta potencia.

<400> 40

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met  
 20 25 30

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

Asp Thr Met Tyr Gln Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp  
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205

**Asn Arg Gly Glu Cys**  
**210**

<210> 41

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena pesada de anticuerpo de alta potencia.

<400> 41

ES 2 390 761 T3

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60  
 Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
 450

<210> 42

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena ligera de anticuerpo de alta potencia.

<400> 42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Thr Met Tyr Gln Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110  
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 115 120 125  
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 130 135 140  
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165 170 175  
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 180 185 190  
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205  
 Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 43

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena pesada de anticuerpo de alta potencia.

<400> 43

ES 2 390 761 T3

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

ES 2 390 761 T3

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
 450

<210> 44

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena ligera de anticuerpo de alta potencia.

<400> 44

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Thr Phe Lys Leu Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110  
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 115 120 125  
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 130 135 140  
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

ES 2 390 761 T3

165 170 175  
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 45

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena pesada de anticuerpo de alta potencia.

<400> 45

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala  
 20 25 30

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

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

ES 2 390 761 T3

	195		200		205										
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
	210					215					220				
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
225					230					235					240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245					250					255	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
			260					265					270		
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
		275					280					285			
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
	290					295					300				
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
305					310					315					320
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
				325					330					335	
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
			340					345					350		
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
		355						360				365			
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
	370					375					380				
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
385					390					395					400
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				405					410					415	
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
			420					425					430		
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
		435					440					445			

Gly Lys  
450

<210> 46

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

ES 2 390 761 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena ligera de anticuerpo de alta potencia.

<400> 46

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Phe Phe Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

```

5 <210> 47

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena pesada de anticuerpo de alta potencia.

<400> 47

ES 2 390 761 T3

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala

			20					25				30			
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Leu	Ala	Asp	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Lys	Lys	Ser	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55					60				
Leu	Lys	Asp	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
65					70					75					80
Val	Leu	Lys	Val	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Asp	Met	Ile	Phe	Asn	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
		115					120					125			
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
	130					135					140				
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145					150					155					160
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
				165					170					175	
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
			180					185					190		
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
		195					200					205			
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
	210					215					220				
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
225					230					235					240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245					250					255	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
			260					265					270		
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
		275					280					285			
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
	290					295					300				
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
305					310					315					320
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
				325					330					335	

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
 450

<210> 48

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena ligera de anticuerpo de alta potencia.

<400> 48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met  
 20 25 30

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

Asp Thr Arg Tyr Gln Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp  
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 49

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena pesada de anticuerpo de alta potencia.

<400> 49

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro  
 20 25 30

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

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445  
 Gly Lys  
 450

ES 2 390 761 T3

<210> 50  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena pesada de anticuerpo de alta potencia.

<400> 50  
**Asp** **Ile** **Gln** **Met** **Thr** **Gln** **Ser** **Pro** **Ser** **Thr** **Leu** **Ser** **Ala** **Ser** **Val** **Gly**  
 1 5 10 15  
**Asp** **Arg** **Val** **Thr** **Ile** **Thr** **Cys** **Ser** **Pro** **Ser** **Ser** **Arg** **Val** **Gly** **Tyr** **Met**  
 20 25 30  
**His** **Trp** **Tyr** **Gln** **Gln** **Lys** **Pro** **Gly** **Lys** **Ala** **Pro** **Lys** **Leu** **Leu** **Ile** **Tyr**  
 35 40 45  
**Asp** **Thr** **Met** **Arg** **Leu** **Ala** **Ser** **Gly** **Val** **Pro** **Ser** **Arg** **Phe** **Ser** **Gly** **Ser**  
 50 55 60  
**Gly** **Ser** **Gly** **Thr** **Glu** **Phe** **Thr** **Leu** **Thr** **Ile** **Ser** **Ser** **Leu** **Gln** **Pro** **Asp**  
 65 70 75 80  
**Asp** **Phe** **Ala** **Thr** **Tyr** **Tyr** **Cys** **Phe** **Gln** **Gly** **Ser** **Gly** **Tyr** **Pro** **Phe** **Thr**  
 85 90 95  
**Phe** **Gly** **Gly** **Gly** **Thr** **Lys** **Val** **Glu** **Ile** **Lys** **Arg** **Thr** **Val** **Ala** **Ala** **Pro**  
 100 105 110  
**Ser** **Val** **Phe** **Ile** **Phe** **Pro** **Pro** **Ser** **Asp** **Glu** **Gln** **Leu** **Lys** **Ser** **Gly** **Thr**  
 115 120 125  
**Ala** **Ser** **Val** **Val** **Cys** **Leu** **Leu** **Asn** **Asn** **Phe** **Tyr** **Pro** **Arg** **Glu** **Ala** **Lys**  
 130 135 140  
**Val** **Gln** **Trp** **Lys** **Val** **Asp** **Asn** **Ala** **Leu** **Gln** **Ser** **Gly** **Asn** **Ser** **Gln** **Glu**  
 145 150 155 160  
**Ser** **Val** **Thr** **Glu** **Gln** **Asp** **Ser** **Lys** **Asp** **Ser** **Thr** **Tyr** **Ser** **Leu** **Ser** **Ser**  
 165 170 175  
**Thr** **Leu** **Thr** **Leu** **Ser** **Lys** **Ala** **Asp** **Tyr** **Glu** **Lys** **His** **Lys** **Val** **Tyr** **Ala**  
 180 185 190  
**Cys** **Glu** **Val** **Thr** **His** **Gln** **Gly** **Leu** **Ser** **Ser** **Pro** **Val** **Thr** **Lys** **Ser** **Phe**  
 195 200 205  
**Asn** **Arg** **Gly** **Glu** **Cys**  
 210

10 <210> 51  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

## ES 2 390 761 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena pesada de anticuerpo de alta potencia.

<400> 51

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60  
 Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
 450

<210> 52  
 <211> 213  
 <212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena ligera de anticuerpo de alta potencia.

<400> 52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Thr Phe Tyr Leu Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110  
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
 115 120 125  
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 130 135 140  
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
 165 170 175  
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
 180 185 190  
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205  
 Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 53

<211> 450

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena pesada de anticuerpo de alta potencia.

<400> 53

ES 2 390 761 T3

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

ES 2 390 761 T3

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435

440

445

**Gly Lys**  
450

<210> 54

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cadena Igiera de anticuerpo de alta potencia.

<400> 54

**Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly**  
1 5 10 15

**Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met**  
20 25 30

**His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr**  
35 40 45

**Asp Thr Arg Gly Leu Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser**  
50 55 60

**Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp**  
65 70 75 80

**Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr**  
85 90 95

**Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro**  
100 105 110

**Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr**  
115 120 125

**Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys**  
130 135 140

**Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu**  
145 150 155 160

**Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser**  
165 170 175

**Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala**  
180 185 190

**Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe**  
195 200 205

**Asn Arg Gly Glu Cys**  
210

<210> 55  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.  
 <400> 55  
**Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp**  
**1 5 10 15**

<210> 56  
 10 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.

15 <400> 56  
**Leu Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His**  
**1 5 10**

<210> 57  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.  
 <400> 57  
**Asp Thr Phe Phe Leu Asp Ser**  
**1 5**

25 <210> 58  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR de alta potencia.  
 <400> 58  
**Asp Thr Arg Tyr Gln Ser Ser**  
**1 5**

<210> 59  
 <211> 10  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia CDR Básica.  
 <400> 59  
**Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His**  
 40 **1 5 10**

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo que se fija específicamente a la proteína F de un virus respiratorio sincitial (RSV), donde el anticuerpo:
  - a. tiene una constante de velocidad de asociación ( $k_{on}$ ) de al menos  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  como se mide por resonancia de plasmones de superficie;
  - b. tiene un valor  $CE_{50}$  menor que 3,0 nM en un ensayo de microneutralización para RSV; y
  - c. comprende las CDRs siguientes con uno o más cambios de aminoácidos en las posiciones subrayadas y en negrita en una o más de las CDRs:
    - región de determinación de la complementariedad de la región variable de la cadena pesada (VH) (CDR)1 TSGMSVG (SEQ ID NO:8);
    - VH CDR2 DIWWDDKKDYNPSLKS (SEQ ID NO:9);
    - VH CDR3 SMITNWYFDV (SEQ ID NO:10);
    - región variable de la cadena ligera (VL) CDR1 SASSSVGYMH (SEQ ID NO:5);
    - VL CDR2 DTSKLAS (SEQ ID NO:6); y
    - VL CDR3 FQGSGYPET (SEQ ID NO:7),

en donde dichos uno o más cambios de aminoácidos tienen el efecto de producir un aumento en el valor de  $k_{on}$  y aumentar la actividad de microneutralización de dicho anticuerpo.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende las regiones de entramado de las Figuras 1 ó 2.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2 que está aislado.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, 2, ó 3, en donde el anticuerpo se fija al mismo epítotope del antígeno F de RSV que un anticuerpo que comprende una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (Figura 2B) y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (Figura 2A).
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la  $k_{on}$  es al menos  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, 2, 3, ó 4, en donde la  $k_{on}$  es al menos  $7,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .
7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo tiene una  $CE_{50}$  menor que 1,0 nM.
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo tiene una constante de afinidad de ( $K_a$ ) de al menos aproximadamente  $10^9 \text{ M}^{-1}$ .
9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo tiene un  $K_a$  de al menos aproximadamente  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ .
10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo tiene un  $K_a$  de al menos aproximadamente  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ .
11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo aislado comprende una VH CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos TAGMSVG (SEQ ID NO: 24) o TPGMSVG (SEQ ID NO: 25).
12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo comprende una VH CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos DIWWDGKKHYNPSLKD (SEQ ID NO:27), DIWWDKHKHYNPSLKD (SEQ ID NO:26), DIWWDGKKDYNPSLKD (SEQ ID NO:28), DIWDDKHKHYNPSLKD (SEQ ID NO:29), DIWWDGKKSYPNSLKD (SEQ ID NO: 30), DIWDDKKSYPNSLKD (SEQ ID NO:55), o DIWWDGKKSYPNSLKS.
13. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo comprende una VH CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos DMITNFYFDV (SEQ ID NO:31), DMIFNWFYFDV (SEQ ID NO:32), SMITNFYFDV (SEQ ID NO:33) o DMIFNFYFDV (SEQ ID NO:34).

14. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo comprende una VL CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SASSRVGYMH (SEQ ID NO:11), SLSSRVGYMH (SEQ ID NO:12), SPSSRVGYMH (SEQ ID NO:13), LPSSRVGYMH (SEQ ID NO:56), o KCQLSVGYMH (SEQ ID NO:59).
- 5 15. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo comprende una VL CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos DTFKLTS (SEQ ID NO:14), DTFKLAS (SEQ ID NO:15), DTYKQTS (SEQ ID NO:16), DTRYLSS (SEQ ID NO:17), DTRGLPS (SEQ ID NO:18), DTMLAS (SEQ ID NO:19), DTFKLSS (SEQ ID NO:20), DTYRHSS (SEQ ID NO:21), DTMYSQS (SEQ ID NO:22), DTFFLDS (SEQ ID NO:57), DTRYQSS (SEQ ID NO:58), DTFRLAS, o DTFYLSS.
- 10 16. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo comprende una VL CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos FQGSFYPT (SEQ ID NO: 23).
17. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo aislado es un anticuerpo monoclonal.
18. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el anticuerpo es un fragmento Fab o F(ab')<sub>2</sub>.
- 15 19. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el anticuerpo es una molécula entera de anticuerpo tetrámero.
20. Una composición que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un diluyente o excipiente farmacológicamente aceptable.
21. La composición de la reivindicación 20, para uso como medicamento.
- 20 22. La composición de la reivindicación 21, para uso en la prevención de una enfermedad causada por RSV en un paciente que corre riesgo de padecer dicha enfermedad.
23. La composición de la reivindicación 21, para uso en el tratamiento de una enfermedad causada por RSV en un paciente afectado por dicha enfermedad.
- 25 24. Uso de la composición de la reivindicación 20, para fabricación de un medicamento para prevención de una enfermedad causada por RSV en un paciente que corre riesgo de dicha enfermedad.
25. Uso de la composición de la reivindicación 20, para fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad causada por RSV en un paciente afectado por dicha enfermedad.
26. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para uso como medicamento.
27. El anticuerpo de la reivindicación 26, para uso en la prevención de una enfermedad causada por RSV en un paciente que corre riesgo de padecer dicha enfermedad.
- 30 28. El anticuerpo de la reivindicación 26, para uso en el tratamiento de una enfermedad causada por RSV en un paciente afectado por dicha enfermedad.
29. Uso de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para fabricación de un medicamento para la prevención de una enfermedad causada por RSV en un paciente que corre riesgo de padecer dicha enfermedad.
- 35 30. Uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad causada por RSV en un paciente afectado por dicha enfermedad.
31. La composición de la reivindicación 22 ó 23, en la cual el paciente es un humano.
32. El uso de la reivindicación 24 ó 25, en el cual el paciente es un humano.
- 40 33. El anticuerpo de la reivindicación 27 ó 28, en el cual el paciente es un humano.
34. El uso de la reivindicación 29 ó 30, en el cual el paciente es un humano.

FIGURA 1

**A**

DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKCQLSVG**GYMH** WYQQKF  
*CDR L1*

KAPKLLIY **DTSKLAS** GVPSR FSGSGSGTEF TLTIS**SLQP**  
*CDR L2*

DFATYYC **FQGSGYPFT** FGGG**TKLEIK**  
*CDR L3*

**B**

QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGF**SLS** **TSGMSVG** WI  
*CDR H1*

QPPGKALEWL A **DIWWDDKKDYNPSLKS** RLTISKDT**SKNG**  
*CDR H2*

VLKVTNMDPA DTATYYCAR **SMITNWFYFDV** WGAGTT**VTVS**  
*CDR H3*

FIGURA 2

**A**

DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCSASSSVGYMH WYQQKPG  
*CDR L1*

KAPKLLIY DTSKLAS GVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD  
*CDR L2*

DFATYYC FQGSGYPFT FGGG TKVEIK  
*CDR L3*

**B**

QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSL TSGMSVG WIR  
*CDR H1*

QPPGKALEWL A DIWWDDKKDYNPSLKS RLT ISKDTSKNQV  
*CDR H2*

VLKVTNMDPA DTATYYCAR SMITNWFYFDV WGQGTTVTVSS  
*CDR H3*

FIGURA 3

**A**

DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCSLSSRVGYMH WYQQKPG  
*CDR L1*

KAPKLLIY DTMYQSS GVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD  
*CDR L2*

DFATYYC FQSGYPFT FGSG TKVEIK  
*CDR L3*

**B**

QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS TAGMSVG WIR  
*CDR H1*

QPPGKALEWL A DIWWDGKKSYPNPSLKD RLT ISKDTSKNQV  
*CDR H2*

VLKVTNMDPA DTATYYCAR DMIFNFYFDV WGQGTTVTVSS  
*CDR H3*

FIGURA 4

Expresión de Fab en el Fago M13

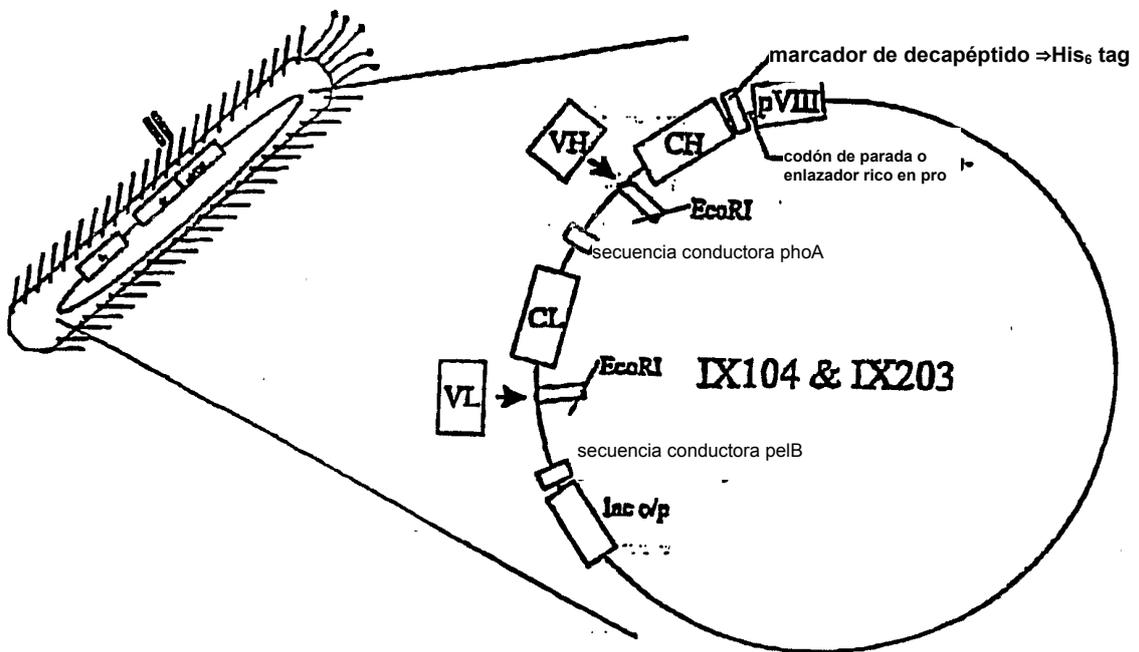


FIGURA 5

Cribado

