

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 987**

51 Int. Cl.:

C07K 16/08 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2008 E 08737590 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 2118140**

54 Título: **Anticuerpos neutralizantes de citomegalovirus humano y su uso**

30 Prioridad:

04.01.2007 GB 0700133

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

28.10.2013

73 Titular/es:

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

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

72 Inventor/es:

**LANZAVECCHIA, ANTONIO y
MACAGNO, ANNALISA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 426 987 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos neutralizantes de citomegalovirus humano y su uso

Campo técnico

5 Esta invención se refiere a anticuerpos que tienen especificidad hacia el citomegalovirus humano, a anticuerpos monoclonales adecuados que tienen esa especificidad y a linfocitos B inmortalizados que producen tales anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos se pueden utilizar en métodos de cribado, así como en el diagnóstico, profilaxis y terapia de una enfermedad.

Técnica anterior

10 El citomegalovirus humano (CMVh) es un agente patógeno ampliamente distribuido que puede causar una patología grave en adultos inmunodeprimidos y después de una infección del feto, y se ha implicado en enfermedades crónicas tales como la aterosclerosis. El CMVh infecta múltiples tipos de células incluyendo los fibroblastos, las células endoteliales, epiteliales y hematopoyéticas [1]. Las cepas atenuadas de CMVh propagadas *in vitro*, que se están desarrollando como vacunas candidatas, han perdido el tropismo hacia las células endoteliales, mientras que conservan la capacidad de infectar fibroblastos [2]. Recientemente, se ha mostrado que dos complejos de glicoproteínas víricas controlan el tropismo celular de CMVh. Para la infección de fibroblastos se requiere un complejo de gH, gL y gO, mientras que un complejo de gH, gL y proteínas codificadas por los genes UL131-UL128 son responsables de la infección de las células endoteliales, las células epiteliales y las células dendríticas [2-8].

20 Las globulinas hiperinmunes ya se comercializan para la profilaxis de la enfermedad por CMVh asociada con trasplante, y una evidencia reciente indica que tienen un efecto terapéutico en las mujeres embarazadas [9]. Este enfoque terapéutico está limitado por la baja cantidad de anticuerpos neutralizantes que se puede transferir y por esta razón, sería muy deseable la disponibilidad de anticuerpos humanos (tales como anticuerpos monoclonales humanos) con una capacidad de neutralización elevada. Sin embargo, aún no se ha establecido la diana de los anticuerpos neutralizantes de CMVh. Un trabajo previo identificó gB y gH como dianas potenciales. Sin embargo, un anticuerpo humanizado para gH (MSL 109) no mostró ningún efecto significativo en un ensayo clínico [10, 11]. Se ha descrito que el anticuerpo monoclonal SD MSL-109 es un anticuerpo monoclonal neutralizante de citomegalovirus [43]. Todos los anticuerpos neutralizantes descritos hasta la fecha tenían una capacidad neutralizante reducida ya que neutralizan la infección con CMVh solo a concentraciones elevadas. Por ejemplo, el anticuerpo MSL-109 solo mostraba un 50% de actividad neutralizante a una concentración de 10 µg/ml, un hecho que podría explicar la falta de un efecto *in vivo* [11]. La potencia neutralizante de los anticuerpos anti-CMVh se mide típicamente usando fibroblastos como células diana. Sin embargo, se sabe que el CMVh causa patología infectando otros tipos de células, tales como las células epiteliales, endoteliales y leucocitos. No parece haber ningún anticuerpo monoclonal disponible que sea capaz de neutralizar con alta potencia una infección de células diana no fibroblastos. Los anticuerpos neutralizantes descritos recientemente para UL128 y UL130 también mostraron una potencia muy baja en la neutralización de la infección de células endoteliales [7].

35 Por tanto, se requiere la producción de anticuerpos neutralizantes de CMVh, así como el esclarecimiento de la diana a la que se unen dichos anticuerpos.

Descripción de la invención

40 La invención se basa en la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que neutralizan la infección con CMVh y que tienen una potencia particularmente alta para neutralizar la infección con CMVh. Tales anticuerpos son deseables, ya que solo se requieren concentraciones bajas con el fin de neutralizar una cantidad dada de virus. Esto facilita unos niveles de protección más elevados, aunque se administran menores cantidades de anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales humanos y los clones de linfocitos B inmortalizados que secretan tales anticuerpos, también se incluyen dentro del alcance de la invención.

45 Los inventores han descubierto que anticuerpos dirigidos a una combinación de UL130 y UL131A son particularmente eficaces en la neutralización de CMVh. La combinación puede ser un complejo de UL130 y UL131A que forma un epítipo reconocido por el anticuerpo o un anticuerpo se puede dirigir a uno de UL130 y UL131A, siendo necesaria la presencia de la otra proteína para la especificidad.

50 Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno que se une al citomegalovirus humano (CMVh) y neutraliza la infección con CMVh de células endoteliales, células epiteliales, células de la retina y células dendríticas, y que es específico de una combinación de proteínas de CMVh, UL130 y UL131A, en donde la combinación forma el epítipo reconocido por dicho anticuerpo o fragmento de unión, en donde el anticuerpo o el fragmento

55 (a) comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente, SEQ ID NOs: 17 y 18, respectivamente, SEQ ID NOs: 39 y 40, respectivamente o SEQ ID NOs: 49 y 18, respectivamente;

(b) comprende secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena pesada, tal como se describen en SEQ ID NOs: 1, 2 y 3, respectivamente, y secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena ligera, tal como se describen en SEQ ID NOs: 4, 5 y 6, respectivamente;

5 (c) comprende secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena pesada, tal como se describen en SEQ ID NOs: 11, 12 y 13, respectivamente, y secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena ligera, tal como se describen en SEQ ID NOs: 14, 15 y 16, respectivamente; o

(d) comprende secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena pesada, tal como se describen en SEQ ID NOs: 33, 34 y 35, respectivamente, y secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena ligera, tal como se describen en SEQ ID NOs: 36, 37 y 38, respectivamente.

10 Anticuerpos de la invención

La invención proporciona anticuerpos monoclonales o recombinantes que tienen una potencia particularmente alta para neutralizar CMVh. La invención también proporciona fragmentos de estos anticuerpos recombinantes o monoclonales, en particular fragmentos que conservan la actividad de unión al antígeno de los anticuerpos.

15 En esta memoria descriptiva, por "potencia elevada para neutralizar CMVh" se entiende que una molécula de anticuerpo de la invención neutraliza CMVh en un ensayo convencional a una concentración mucho menor que los anticuerpos conocidos en la técnica, por ejemplo, en comparación con MSL-109.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención puede neutralizar a una concentración de 0,01, 0,0075, 0,005, 0,004 o menor, preferiblemente a una concentración de anticuerpo de 10^{-8} o inferior, preferiblemente 10^{-9} M o inferior, preferiblemente 10^{-10} M o inferior, es decir, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M o inferior. Esto significa que solo se requieren concentraciones muy bajas de anticuerpo para neutralizar el 50% de una cepa clínica aislada de CMVh *in vitro*, en comparación con la concentración requerida de MSL-109 para neutralizar el mismo título de CMVh. Preferiblemente, la concentración de anticuerpo de la invención para neutralizar el 50% de la infección de células endoteliales, células epiteliales y células dendríticas con una cepa clínica aislada de CMVh, es 50 veces o más (es decir, 75, 100, 150, 200 o más) menor que la requerida con MSL-109. La potencia se puede medir empleando un ensayo de neutralización convencional, tal como se describe en la técnica.

Los anticuerpos de la invención son capaces de neutralizar CMVh. Un anticuerpo de acuerdo con la invención evita la infección de fibroblastos y de células endoteliales. Los anticuerpos de la invención también evitan la infección de células dendríticas y células epiteliales, tales como las células de la retina.

30 Estos anticuerpos se pueden utilizar como agentes profilácticos o terapéuticos después de una formulación apropiada, o como una herramienta de diagnóstico.

Un "anticuerpo neutralizante" es uno que puede neutralizar la capacidad de ese agente patógeno para iniciar y/o mantener una infección en un hospedador. La invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano neutralizante, en donde el anticuerpo reconoce un antígeno del citomegalovirus humano (CMVh).

35 Preferiblemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención tiene especificidad hacia una combinación UL130 y UL131A.

Preferiblemente un anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo monoclonal denominado en este documento 1F11 o 2F4. Estos anticuerpos se aislaron inicialmente a partir de un donante infectado con CMVh, y son producidos por los clones de linfocitos B inmortalizados, denominados 1F11 o 2F4. Estos anticuerpos han mostrado que neutralizan la infección con CMVh de células endoteliales, células epiteliales, células de la retina y células dendríticas. Además, los anticuerpos 5A2 y 9A11, aislados a partir de un donante diferente infectado con CMVh, muestran la misma especificidad hacia una combinación de UL130 y UL131A y la capacidad de neutralizar la infección con CMVh de células endoteliales, epiteliales, dendríticas y de la retina. Estos anticuerpos son producidos por clones de linfocitos B inmortalizados denominados 5A2 y 9A11, respectivamente.

45 1F11 consiste en una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 8. 2F4 consiste en una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 17 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 18. Las CDRs de las cadenas pesadas del anticuerpo se conocen como CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente. Del mismo modo, las CDRs de las cadenas ligeras del anticuerpo se conocen como CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente. La posición de los aminoácidos de las CDRs se definen de acuerdo con el sistema de numeración de IMGT [12, 13, 14] como: posiciones 27 a 38 de CDR1 – IMGT, posiciones 50 56 a 65 de CDR2 – IMGT y posiciones 105 a 117 de CDR3 – IMGT.

5A2 consiste en una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 39 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 40.

Las secuencias de aminoácidos de las CDRs de estos anticuerpos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

	1F11	2F4	5A2
CDRH1	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)	GFSFNTYG (SEQ ID NO: 11)	GGTFSSYV (SEQ ID NO: 33)
CDRH2	ISFDGDNK (SEQ ID NO: 2)	IWDDGSKM (SEQ ID NO: 12)	IIPIFNTA (SEQ ID NO: 34)
CDRH3	AREELVGLMPPYYNYGLDV (SEQ ID NO: 3)	ARDEGAIMLHAMTDYGLDV (SEQ ID NO: 13)	ARDFLSGPMEMPPGGYYGLDV (SEQ ID NO: 35)
CDRL1	SSNIGNNF (SEQ ID NO: 4)	NLGDEF (SEQ ID NO: 14)	QSVLYSSNNKNY (SEQ ID NO: 36)
CDRL2	DND (SEQ ID NO: 5)	QDS (SEQ ID NO: 15)	WAS (SEQ ID NO: 37)
CDRL3	ETWDGSLNPAVV (SEQ ID NO: 6)	QAWDSSTAHYV (SEQ ID NO: 16)	QYYSTPIT (SEQ ID NO: 38)

Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender las secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena pesada, tal como se describen en SEQ ID NOs: 1, 2 y 3, respectivamente, y las secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena ligera, tal como se describen en SEQ ID NOs: 4, 5 y 6, respectivamente. Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender las secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena pesada, tal como se describen en SEQ ID NOs: 11, 12 y 13, respectivamente, y las secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena ligera, tal como se describen en SEQ ID NOs: 14, 15 y 16, respectivamente. Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender las secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena pesada, tal como se describen en SEQ ID NOs: 33, 34 y 35, respectivamente, y las secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena ligera, tal como se describen en SEQ ID NOs: 36, 37 y 38, respectivamente

Preferiblemente un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO: 7, 17 o 39. Preferiblemente un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una cadena ligera que tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO: 8, 18 o 40. En particular, un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

La invención también incluye secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de ácidos nucleicos preferidas de acuerdo con la invención incluyen SEQ ID NO: 9 (que codifica la región variable de la cadena pesada de 1F11), SEQ ID NO: 10 (que codifica la región variable de cadena ligera de 1F11), SEQ ID NO: 19 (que codifica la región variable de la cadena pesada de 2F4) y SEQ ID NO: 20 (que codifica la región variable de la cadena ligera de 2F4). Las secuencias de ácido nucleico preferidas que codifican las diversas CDRs incluyen SEQ ID NO: 21 (que codifica CDRH1 de 1F11), SEQ ID NO: 22 (que codifica CDRH2 de 1F11), SEQ ID NO: 23 (que codifica CDRH3 de 1F11), SEQ ID NO: 24 (que codifica CDRL1 de 1F11), SEQ ID NO: 25 (que codifica CDRL2 de 1F11), SEQ ID NO: 26 (que codifica CDRL3 de 1F11), SEQ ID NO: 27 (que codifica CDRH1 de 2F4), SEQ ID NO: 28 (que codifica CDRH2 de 2F4), SEQ ID NO: 29 (que codifica CDRH3 de 2F4), SEQ ID NO: 30 (que codifica CDRL1 de 2F4), SEQ ID NO: 31 (que codifica CDRL2 de 2F4) y SEQ ID NO: 32 (que codifica CDRL3 de 2F4). Otras secuencias de ácido nucleico preferidas de acuerdo con la invención incluyen SEQ ID NO: 41 (que codifica la región variable de la cadena pesada de 5A2), SEQ ID NO: 42 (que codifica la región variable de la cadena ligera de 5A2), SEQ ID NO: 43 (que codifica CDRH1 de 5A2), SEQ ID NO: 44 (que codifica CDRH2 de 5A2), SEQ ID NO: 45 (que codifica CDRH3 de 5A2), SEQ ID NO: 46 (que codifica CDRL1 de 5A2), SEQ ID NO: 47 (que codifica CDRL2 de 5A2), SEQ ID NO: 48 (que codifica CDRL3 de 5A2). Debido a la redundancia del código genético, existirán variantes de estas secuencias que codifican las mismas secuencias de aminoácidos.

Las variantes de las secuencias indicadas en la solicitud se describen en esta memoria. Tales variantes pueden surgir debido a la degeneración del código genético, tal y como se ha mencionado anteriormente. Alternativamente, las variantes naturales se pueden producir debido a errores en la transcripción o la traducción. Una variante de 2F4 también se describe en este documento. Esta variante comprende dos residuos de serina adicionales en el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 2F4 (SEQ ID NO: 17). Por lo tanto, esta variante de 2F4 consiste en una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 49 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 18. La secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de la variante se indica en SEQ ID NO: 50. Por lo tanto, los anticuerpos que comprenden la cadena pesada de la variante de 2F4 (SEQ ID NO: 49) están incluidos dentro del alcance de la invención.

Otras variantes de las secuencias de anticuerpos que tienen una afinidad mejorada se pueden obtener usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos se pueden utilizar para obtener anticuerpos con una afinidad mejorada adicionalmente. Alternativamente, la optimización de codones de la secuencia de

nucleótidos se puede utilizar para mejorar la eficacia de la traducción en sistemas de expresión para la producción del anticuerpo.

Preferiblemente, tales secuencias de la variante del anticuerpo compartirán el 85% o más (es decir, 85, 90, 95, 97, 98, 99% o más) de la identidad de secuencia con las secuencias indicadas en la solicitud. Preferiblemente, tal identidad de secuencia se calcula con respecto a la longitud completa de la secuencia de referencia (es decir, la secuencia indicada en la solicitud). Preferiblemente, el porcentaje de identidad, tal y como se describe en la presente memoria, es tal como se determina utilizando la versión 2.1.3 de BLAST, usando los parámetros por defecto especificados por el NCBI (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [matriz Blosum 62; penalización por apertura de hueco = 11 y penalización por extensión de hueco = 1].

También están incluidos dentro del alcance de la invención los vectores, por ejemplo, vectores de expresión, que comprenden una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Las células transformadas con tales vectores también se incluyen dentro del alcance de la invención.

En esta memoria también se describen anticuerpos monoclonales que se unen a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal 1F11 o 2F4. También se describen en esta memoria anticuerpos monoclonales que se unen a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal 5A2.

Los anticuerpos monoclonales y recombinantes son particularmente útiles en la identificación y purificación de los polipéptidos individuales u otros antígenos hacia los que están dirigidos. Los anticuerpos de la invención tienen una utilidad adicional porque se pueden emplear como reactivos en inmunoensayos, radioinmunoensayos (RIA) o ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA). En estas aplicaciones, los anticuerpos se pueden marcar con un reactivo detectable analíticamente, tal como un radioisótopo, una molécula fluorescente o una enzima. Los anticuerpos también se pueden utilizar para la identificación y caracterización molecular (cartografiado de epítipos) de antígenos.

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

Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede estar conjugado con un residuo terapéutico, tal como una citotoxina, un agente terapéutico o un ion de metal radiactivo o un radioisótopo. Ejemplos de radioisótopos incluyen, pero no se limitan a, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111 y similares. Tales conjugados de anticuerpos se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada; el residuo de fármaco no debe interpretarse como limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el residuo de fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica.

Las técnicas para conjugar tal residuo terapéutico a anticuerpos son bien conocidas. Véase, por ejemplo, Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, compilador Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), págs. 243-256; compilador Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery*, compilador Robinson et al. (2ª ed.; Marcel Dekker, Inc.), págs. 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, compilador Pinchera et al. págs. 475-506 (Editrice Kurtis, Milán, Italia, 1985); "Analysis, Results and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, compilador Baldwin et al. (Academic Press, Nueva York, 1985), págs. 303-316; y Thorpe et al. (1982) *Immunol. Rev.* 62:119-158.

Alternativamente, un anticuerpo se puede conjugar con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos, tal y como se describe en la referencia 19. Además, los enlazadores se pueden utilizar entre los marcadores y los anticuerpos de la invención [20]. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a antígeno se

pueden marcar directamente con yodo, indio o itrio radiactivos u otra partícula radiactiva conocida en la técnica [21]. El tratamiento puede consistir en una combinación de un tratamiento con anticuerpos conjugados y no conjugados administrados simultánea o posteriormente [22, 23].

Los anticuerpos de la invención se pueden fijar a un soporte sólido.

5 Además, los anticuerpos pueden estar modificados químicamente, por ejemplo, mediante conjugación covalente a un polímero para incrementar su semivida circulante. Los polímeros preferidos, y los métodos para fijarlos a péptidos, se muestran en las referencias 24-27. Los polímeros preferidos son polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a temperatura ambiente y tiene la fórmula general: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, en donde R puede ser hidrógeno o un grupo protector, tal como un grupo alquilo o alcohol. Preferiblemente, el grupo protector tiene entre 1 y 8 átomos de carbono, más preferiblemente es metilo. El símbolo n es un número entero positivo, preferiblemente entre 1 y 1000, más preferiblemente entre 2 y 500. El PEG tiene un peso molecular promedio preferido entre 1000 y 40.000, más preferiblemente entre 2.000 y 20.000, lo más preferible entre 3.000 y 12.000. Preferiblemente, el PEG tiene al menos un grupo hidroxilo, más preferiblemente es un grupo hidroxilo terminal. Es este grupo hidroxilo el que se activa preferentemente para reaccionar con un grupo amino libre en el inhibidor. Sin embargo, se entenderá que el tipo y la cantidad de grupos reactivos pueden variar para obtener un PEG covalentemente conjugado/anticuerpo de la presente invención.

Los polioles polioxietilados hidrosolubles también son útiles en la presente invención. Incluyen sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG) y similares. Se prefiere el POG. Una razón es porque el esqueleto de glicerol del glicerol polioxietilado es el mismo esqueleto que el que existe en la naturaleza, por ejemplo, en animales y seres humanos en monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos. Por lo tanto, esta ramificación no se consideraría necesariamente un agente extraño en el cuerpo. El POG tiene un peso molecular preferido en el mismo intervalo que PEG. La estructura de POG se muestra en la referencia 28, y una descripción de los conjugados POG/IL-2 se encuentra en la referencia 24.

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

Los anticuerpos de la invención se proporcionan preferiblemente en forma purificada. Típicamente, el anticuerpo estará presente en una composición que está sustancialmente exenta de otros polipéptidos, por ejemplo, en donde menos del 90% (en peso), por lo general menos del 60% y más usualmente menos del 50% de la composición está compuesta por otros polipéptidos.

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

Los anticuerpos de la invención pueden tener cualquier isotipo (por ejemplo, IgA, IgG, IgM, es decir, una cadena pesada α , γ o μ), pero por lo general serán IgG. Dentro del isotipo IgG, los anticuerpos pueden tener la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los anticuerpos de la invención pueden tener una cadena ligera κ o una λ .

Producción de anticuerpos

40 Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención se pueden preparar por uno de los métodos conocidos en la técnica. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales usando tecnología de hibridoma es bien conocida [34, 35]. Preferiblemente, se utiliza el método alternativo de inmortalización con VEB, descrito en la referencia 36.

45 Utilizando el método descrito en la referencia 36, los linfocitos B que producen el anticuerpo de la invención se pueden transformar con VEB en presencia de un activador de linfocitos B policlonales. La transformación con VEB es una técnica convencional y se puede adaptar fácilmente para incluir activadores de linfocitos B policlonales.

Se pueden añadir agentes estimulantes adicionales del crecimiento y la diferenciación celular durante la etapa de transformación, para mejorar aún más la eficacia. Estos agentes estimulantes pueden ser citocinas tales como IL-2 e IL-15. En un aspecto particularmente preferido, se añade IL-2 durante la etapa de inmortalización para mejorar aún más la eficacia de la inmortalización, pero su uso no es esencial.

Los linfocitos B inmortalizados producidos utilizando estos métodos se pueden cultivar entonces usando métodos conocidos en la técnica y los anticuerpos se aíslan a partir de los mismos.

Los anticuerpos monoclonales se pueden purificar adicionalmente, si se desea, usando filtración, centrifugación y diversos métodos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de afinidad. Las técnicas de purificación de anticuerpos monoclonales, incluyendo las técnicas para la producción de anticuerpos de calidad farmacéutica, son bien

conocidas en la técnica.

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

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

Cualquier sistema adecuado de célula hospedadora/vector se puede utilizar para la expresión de las secuencias de ADN que codifican las moléculas de anticuerpo de la presente invención o fragmentos de las mismas. Los sistemas bacterianos, por ejemplo, *E. coli*, y otros sistemas microbianos se pueden utilizar, en parte, para la expresión de fragmentos de anticuerpos tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, y especialmente los fragmentos Fv y los fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla, por ejemplo, Fvs de cadena sencilla. Los sistemas de expresión en células hospedadoras eucarióticas, por ejemplo, de mamífero, se pueden utilizar para la producción de moléculas de anticuerpo más grandes, incluyendo moléculas de anticuerpo completas. Las células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen las células CHO, HEK293T, PER.C6, de mieloma o de hibridoma.

Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención se puede producir mediante un procedimiento que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un vector de la presente invención, en condiciones adecuadas para que a partir del ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención se llegue a la expresión de una proteína, y aislar la molécula de anticuerpo.

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

Alternativamente, los anticuerpos según la invención se pueden producir mediante i) la expresión de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula, y ii) el aislamiento del producto del anticuerpo expresado. Además, el método puede incluir iii) la purificación del anticuerpo.

Cribado y aislamiento de los linfocitos B

Los linfocitos B transformados se criban en busca de los que producen anticuerpos con la especificidad antigénica deseada, y a continuación se pueden producir clones individuales de linfocitos B, a partir de las células positivas.

La etapa de cribado se puede llevar a cabo mediante ELISA, tiñendo los tejidos o las células (incluyendo las células transfectadas), un ensayo de neutralización o uno entre una variedad de otros métodos conocidos en la técnica para identificar la especificidad antigénica deseada. El ensayo se puede seleccionar basándose en el simple reconocimiento del antígeno, o se puede seleccionar basándose adicionalmente en una función deseada, por ejemplo, para seleccionar anticuerpos neutralizantes y no solo anticuerpos que se unen a antígenos, para seleccionar anticuerpos que pueden cambiar las características de las células diana, tales como sus cascadas de señalización, su forma, su tasa de crecimiento, su capacidad de influir en otras células, su respuesta a la influencia de otras células o mediante otros reactivos o por un cambio en las condiciones, su estado de diferenciación, etc.

La etapa de clonación para separar clones individuales a partir de la mezcla de células positivas se puede llevar a cabo empleando una dilución limitante, micromanipulación, deposición de una sola célula mediante separación de células u otro método conocido en la técnica. Preferiblemente, la clonación se lleva a cabo usando una dilución limitante.

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

Una composición puede comprender linfocitos B de memoria inmortalizados, en donde los linfocitos producen anticuerpos con una potencia neutralizante elevada, específica de CMVh, y en donde los anticuerpos se producen a ≥ 5

pg por célula al día. Una composición puede comprender clones de un linfocito B de memoria inmortalizado, en donde los clones producen un anticuerpo monoclonal con una alta afinidad específica de CMVh, y en donde el anticuerpo se produce a $\geq 10^N$ ng por clon al día. Preferiblemente, dichos clones producen un anticuerpo monoclonal con una potencia elevada para neutralizar una infección con CMVh.

- 5 Los clones de linfocitos B inmortalizados preferidos de acuerdo con la invención son de 1F11 y 2F4. Otros clones preferidos son 5A2 y 9A11.

Epítomos

10 Los anticuerpos de la invención se pueden usar para cartografiar los epítomos a los que se unen. Los solicitantes han descubierto que los anticuerpos 1F11, 2F4, 5A2 y 9A11 que neutralizan la infección con CMVh de células endoteliales, células epiteliales, células de la retina y células dendríticas se dirigen hacia un epítomo encontrado en una combinación de UL130 y UL131A. Aunque el solicitante no desea estar vinculado a esta teoría, se cree que los anticuerpos 1F11 y 2F4 se unen a un epítomo conformacional formado por estas dos proteínas. También se cree que 5A2 y 9A11 también se unen a un epítomo conformacional formado por UL130 y UL131A.

15 Debido al hecho de que 1F11, 2F4, 5A2 y 9A11 no neutralizan la infección de fibroblastos, se postula que estos anticuerpos reconocen un epítomo diferente a los anticuerpos monoclonales humanos 10C6, 5F1, 6B4 y 7H3. Por otra parte, se cree que los anticuerpos monoclonales 10C6, 5F1, 7H3 y 6B4 se unen a un epítomo funcional de gB.

20 Los epítomos reconocidos por estos anticuerpos pueden tener una variedad de usos. Los epítomos y los mimotopos en forma purificada o sintética se pueden utilizar para inducir respuestas inmunes (es decir, como una vacuna, o para la producción de anticuerpos para otros usos) o para cribar el suero de pacientes en busca de anticuerpos que reaccionan inmunológicamente con los epítomos o mimotopos. Preferiblemente, un epítomo o mimotopo tal, o un antígeno que comprende un epítomo o un mimotopo tal, se utiliza como vacuna para inducir una respuesta inmune. Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar en un método para vigilar la calidad de las vacunas, en particular, para comprobar que el antígeno en una vacuna contiene el epítomo inmunógeno correcto en la conformación correcta.

25 Los epítomos también pueden ser útiles para un cribado en busca de ligandos que se unen a dichos epítomos. Tales ligandos bloquean preferentemente los epítomos y así evitan la infección.

Expresión recombinante

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

35 Por lo tanto, un método para preparar una célula recombinante puede comprender las etapas de: (i) obtener uno o varios ácidos nucleicos (por ejemplo, genes de la cadena pesada y/o ligera) procedentes del clon de linfocitos B que codifica el anticuerpo de interés; e (ii) insertar el ácido nucleico en un hospedador de expresión con el fin de permitir la expresión del anticuerpo de interés en ese hospedador.

Del mismo modo, un método para preparar una célula recombinante puede comprender las etapas de: (i) secuenciar el(los) ácido(s) nucleico(s) del clon de linfocitos B que codifica el anticuerpo de interés; y (ii) utilizar la información de la secuencia de la etapa (i) para preparar ácido(s) nucleico(s) para la inserción en un hospedador de expresión con el fin de permitir la expresión del anticuerpo de interés en ese hospedador.

40 Un método para preparar una célula recombinante puede comprender la etapa de transformar una célula hospedadora con uno o varios ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo monoclonal de interés, en donde los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos que se obtienen a partir de un clon de linfocitos B inmortalizados descritos en esta memoria. Por lo tanto, los procedimientos para preparar primero el(los) ácido(s) nucleico(s) y luego usarlo para transformar una célula hospedadora, se pueden realizar en diferentes momentos, por diferentes personas, en diferentes lugares (por ejemplo, en diferentes países).

45 Estas células recombinantes se pueden utilizar entonces para fines de expresión y de cultivo. Son particularmente útiles para la expresión de anticuerpos para la producción farmacéutica a gran escala. También se pueden usar como ingrediente activo de una composición farmacéutica. Se puede utilizar cualquier técnica de cultivo adecuada, incluyendo pero no limitadas al cultivo estático, cultivo en botella rotatoria, fluido de ascitis, cartucho de biorreactor de tipo fibra hueca, minifermentador modular, tanque agitado, cultivo microportador, perfusión nuclear cerámica, etc.

50 Los métodos para obtener y secuenciar genes de inmunoglobulinas a partir de linfocitos B son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véase la referencia 37).

El hospedador de expresión es preferiblemente una célula eucariota, que incluye células de levadura y células animales, particularmente células de mamífero (por ejemplo, células CHO, células humanas tales como PER.C6 [Cru-

cell; referencia 38] o células HKB-11 [Bayer; referencias 39 y 40], células de mieloma [41 y 42], etc.), así como células vegetales. Los hospedadores de expresión preferidos pueden glicosilar el anticuerpo de la invención, en particular con estructuras de hidratos de carbono que no son en sí mismas inmunógenas en seres humanos. Se prefieren los hospedadores de expresión que pueden crecer en medios exentos de suero. Se prefieren los hospedadores de expresión que pueden crecer en cultivo sin la presencia de productos derivados de animales.

El hospedador de expresión se puede cultivar para obtener una línea celular.

Un método para preparar una o varias moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, genes de la cadena ligera y pesada) que codifica un anticuerpo de interés, puede comprender las etapas de: (i) preparar un clon de linfocitos B inmortalizados tal y como se describe en esta memoria, (ii) obtener a partir del clon de linfocitos B ácido nucleico que codifica el anticuerpo de interés. Un método para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de interés, puede comprender las etapas de: (i) preparar un clon de linfocitos B inmortalizados tal y como se describe en esta memoria, (ii) secuenciar el ácido nucleico del clon de linfocitos B que codifica el anticuerpo de interés.

Un método para preparar una(s) molécula(s) de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de interés, puede comprender la etapa de obtener el ácido nucleico a partir de un clon de linfocitos B que se ha obtenido a partir de un linfocito B transformado descrito en esta memoria. Por lo tanto, los procedimientos para obtener primero el clon de linfocitos B y preparar a continuación el(los) ácido(s) nucleico(s) a partir del mismo, se pueden realizar en momentos muy diferentes, por diferentes personas, en diferentes lugares (por ejemplo, en diferentes países).

Un método para la preparación de un anticuerpo (por ejemplo, para uso farmacéutico) puede comprender las etapas de: (i) obtener y/o secuenciar uno o varios ácidos nucleicos (por ejemplo, genes de la cadena pesada y ligera) a partir del clon de linfocitos B seleccionado que expresa el anticuerpo de interés, (ii) insertar el(los) ácido(s) nucleico(s) en o empleando el(los) ácido(s) nucleico(s) para preparar un hospedador de expresión que puede expresar el anticuerpo de interés, (iii) cultivar o subcultivar el hospedador de expresión en condiciones en las que se expresa el anticuerpo de interés; y, opcionalmente, (iv) purificar el anticuerpo de interés.

Un método de preparación de un anticuerpo puede comprender las etapas de: cultivar o subcultivar una población de células hospedadoras de expresión en condiciones en las que el anticuerpo de interés se expresa y, opcionalmente, purificar el anticuerpo de interés, en donde dicha población de células hospedadoras de expresión ha sido preparada (i) proporcionando ácido(s) nucleico(s) que codifica un linfocito B seleccionado para el anticuerpo de interés que es producido por una población de linfocitos B de memoria preparada tal y como se ha descrito anteriormente, (ii) insertando el(los) ácido(s) nucleico(s) en un hospedador de expresión que puede expresar el anticuerpo de interés, y (iii) cultivando o subcultivando hospedadores de expresión que comprenden dichos ácidos nucleicos insertados para producir dicha población de células hospedadoras de expresión. Por lo tanto, los procedimientos para la preparación en primer lugar del hospedador de expresión recombinante y luego el cultivo del mismo para expresar el anticuerpo, se pueden realizar en momentos muy diferentes, por diferentes personas, en diferentes lugares (por ejemplo, en diferentes países).

Composiciones farmacéuticas

El uso de anticuerpos como ingrediente activo de productos farmacéuticos está generalizado en la actualidad, incluyendo los productos Herceptin[®] (trastuzumab), Rituxan[®], Campath[®], Remicade[®], ReoPro[®], Mylotarg[®], Zevalin[®], Omalizumab, Synagis[®] (Palivizumab), Zenapax[®] (daclizumab), etc.

La invención proporciona por tanto una composición farmacéutica que contiene los anticuerpos de la invención. También se describen en esta memoria composiciones farmacéuticas que contienen ácido nucleico que codifica tales anticuerpos y/o linfocitos B inmortalizados que expresan tales anticuerpos y/o los epítopos reconocidos por los anticuerpos de la invención. Una composición farmacéutica también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable para permitir la administración. El vehículo no debe inducir el mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

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

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

Las formas preferidas de administración incluyen formas adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión, por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua. Cuando el producto es

para inyección o infusión, puede estar en forma de suspensión, solución o emulsión en un vehículo aceitoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para reconstituir antes del uso con un líquido estéril apropiado.

- 5 Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Se prefiere que las composiciones estén adaptadas para la administración a sujetos humanos.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por cualquiera entre una variedad de vías incluyendo, pero no limitadas a las vías intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea, tópica, subcutánea, intranasal, entérica, sublingual, intravaginal o rectal. Una jeringa hipodérmica también se puede usar para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como soluciones inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. Las formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección, también se pueden preparar.

La administración directa de las composiciones generalmente se realizará mediante inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se administra en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un régimen de dosis única o un régimen de dosis múltiple. Los agentes farmacéuticos conocidos basados en anticuerpos proporcionan una orientación en relación con la frecuencia de la administración, por ejemplo, si un agente farmacéutico se debe administrar a diario, semanalmente, mensualmente, etc. La frecuencia y la dosificación también pueden depender de la gravedad de los síntomas.

Las composiciones de la invención se pueden preparar de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar en forma inyectable, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. Las formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección, también pueden ser preparadas (por ejemplo, una composición liofilizada, como Synagis[®] y Herceptin[®], para reconstituir con agua estéril que contiene un conservante). La composición se puede preparar para administrar por vía tópica, por ejemplo, como un ungüento, crema o polvo. La composición se puede preparar para administrar por vía oral, por ejemplo, como un comprimido o cápsula, como un aerosol o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición se puede preparar para administrar por vía pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o un aerosol. La composición se puede preparar como un supositorio o pesario. La composición se puede preparar para administrar por vía nasal, aural u ocular, por ejemplo, en forma de gotas. La composición puede estar en forma de kit, diseñado de tal manera que una composición combinada se reconstituye inmediatamente antes de la administración a un paciente. Por ejemplo, se puede proporcionar un anticuerpo liofilizado en forma de kit con agua estéril o una solución tampón estéril.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible a una degradación en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición se va a administrar por una vía que emplea el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan al anticuerpo de la degradación pero que liberen el anticuerpo una vez que haya sido absorbido desde el tracto gastrointestinal.

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

40 Las composiciones farmacéuticas de la invención tienen generalmente un pH entre 5,5 y 8,5, preferentemente entre 6 y 8, y más preferiblemente aproximadamente 7. El pH se puede mantener empleando un tampón. La composición puede ser estéril y/o estar exenta de pirógenos. La composición puede ser isotónica con respecto a los seres humanos. Las composiciones farmacéuticas de la invención se suministran preferiblemente en recipientes cerrados herméticamente.

45 Las composiciones farmacéuticas incluirán una cantidad eficaz de uno o varios anticuerpos de la invención, es decir, una cantidad que es suficiente para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o trastorno deseados, o para mostrar un efecto terapéutico detectable. En esta memoria también se describen composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad eficaz de uno o varios linfocitos B inmortalizados de la invención y/o un polipéptido que comprende un epítipo que se une a un anticuerpo de la invención. Los efectos terapéuticos también incluyen una reducción de los síntomas físicos. La cantidad eficaz precisa para cualquier sujeto particular dependerá de su tamaño y su salud, de la naturaleza y la extensión del trastorno, y del agente terapéutico o la combinación de agentes terapéuticos seleccionados para la administración. La cantidad eficaz para una situación dada se determina mediante experimentación rutinaria y según el criterio de un médico. Para los fines de la presente invención, una dosis eficaz será generalmente desde aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, o aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de las composiciones de la presente invención en el individuo al que se le administra. Los agentes farmacéuticos conocidos basados en anticuerpos proporcionan una orientación a este respecto, por ejemplo, Herceptin[®] se administra mediante infusión intravenosa de una solución de 21 mg/ml, con una dosis de carga inicial de 4 mg/kg de peso corporal y una dosis de mantenimiento semanal de 2 mg/kg de peso corporal; Rituxan[®] se administra semanalmente a 375 mg/m²; etc.

- Las composiciones pueden incluir más de un anticuerpo de la invención (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc.), particularmente cuando tales anticuerpos se unen a diferentes antígenos (o a diferentes epítomos en el mismo antígeno), para proporcionar un efecto terapéutico aditivo o sinérgico. Por ejemplo, un anticuerpo se puede unir a la combinación (o complejo) UL130-UL131A, mientras que otro se puede unir a gH. En un ejemplo adicional, un anticuerpo se puede unir a la combinación (o complejo) UL130-UL131A, mientras que otro puede unirse a gB. Por lo tanto, un anticuerpo se puede dirigir al mecanismo que media la infección de fibroblastos, mientras que el otro anticuerpo se puede dirigir al mecanismo que media la infección de células endoteliales. Para un efecto clínico óptimo puede ser bien ventajoso dirigir ambos mecanismos de infección y mantenimiento con CMVh.
- Los anticuerpos de la invención se pueden administrar (de forma combinada o por separado) con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, con compuestos quimioterapéuticos, con radioterapia, etc. Los compuestos terapéuticos preferidos incluyen compuestos antivíricos tales como ganciclovir, foscarnet y cidofovir. Dicha terapia de combinación proporciona un aditivo o una mejora sinérgica en la eficacia terapéutica con respecto a los agentes terapéuticos individuales, cuando se administran solos. El término "sinergia" se utiliza para describir un efecto combinado de dos o varios agentes activos que es mayor que la suma de los efectos individuales de cada agente activo respectivo. Por lo tanto, cuando el efecto combinado de dos o varios agentes da como resultado una "inhibición sinérgica" de una actividad o proceso, se considera que la inhibición de la actividad o el proceso es mayor que la suma de los efectos inhibidores de cada agente activo respectivo. La expresión "efecto terapéutico sinérgico" se refiere a un efecto terapéutico observado con una combinación de dos o varias terapias, en donde el efecto terapéutico (según se mide con cualquiera de una variedad de parámetros) es mayor que la suma de los efectos terapéuticos individuales observados con las terapias individuales respectivas.
- Los anticuerpos se pueden administrar a los pacientes que previamente no han mostrado ninguna respuesta al tratamiento de la infección con CMVh, es decir, que han mostrado ser refractarios al tratamiento anti-CMVh. Tal tratamiento puede incluir un tratamiento previo con un agente antivírico. Esto puede ser debido, por ejemplo, a una infección con una cepa de CMVh resistente al antivírico.
- En las composiciones de la invención que incluyen los anticuerpos de la invención, los anticuerpos constituyen preferiblemente al menos el 50% en peso (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más) de la proteína total en la composición. Los anticuerpos, por lo tanto, están en forma purificada.
- Un método de preparación de un agente farmacéutico puede comprender las etapas de: (i) preparar un anticuerpo de la invención, y (ii) mezclar completamente el anticuerpo purificado con uno o varios vehículos farmacéuticamente aceptables.
- Un método para preparar un agente farmacéutico puede comprender la etapa de mezclar completamente un anticuerpo con uno o varios vehículos farmacéuticamente aceptables, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se había obtenido a partir de un linfocito B transformado descrito en esta memoria. Por ello, los procedimientos para obtener primero el anticuerpo monoclonal y luego preparar el agente farmacéutico se pueden realizar en momentos muy diferentes, por diferentes personas, en diferentes lugares (por ejemplo, en diferentes países).
- Como alternativa a la administración de anticuerpos o linfocitos B con fines terapéuticos, es posible administrar ácido nucleico (típicamente ADN) a un sujeto, que codifica el anticuerpo monoclonal (o un fragmento activo del mismo) de interés, de tal manera que el ácido nucleico se puede expresar en el sujeto *in situ* para proporcionar un efecto terapéutico deseado. La terapia génica adecuada y los vectores para la entrega del ácido nucleico son conocidos en la técnica.
- También se describen en esta memoria composiciones inmunogénicas, y son más preferiblemente composiciones de vacunas que comprenden un antígeno que comprende un epítomo que se encuentra en una combinación de proteínas de CMVh, UL130 y UL131A. Las composiciones alternativas pueden comprender (i) un antígeno que comprende un epítomo que se encuentra en una combinación de proteínas de CMVh, UL130 y UL131A, y (ii) un antígeno que comprende un epítomo que se encuentra en gB de CMVh. Las vacunas pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero normalmente serán profilácticas.
- Las composiciones pueden incluir un agente antimicrobiano, particularmente si se envasan en un formato de dosis múltiples.
- Las composiciones pueden comprender un detergente, por ejemplo, un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los detergentes están presentes generalmente a niveles bajos, por ejemplo, <0,01%.
- Las composiciones pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro sódico) para dar tonicidad. Una concentración de 10±2 mg/ml de NaCl es típica.
- Las composiciones pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o un disacárido (por ejemplo, sacarosa o trehalosa), por ejemplo, aproximadamente a 15-30 mg/ml (por ejemplo, 25 mg/ml), particularmente si se van a liofilizar o si incluyen material que ha sido reconstituido a partir de material liofilizado. El pH de una composición para la liofilización se puede ajustar a aproximadamente 6,1 antes de la liofilización.

Las composiciones descritas en esta memoria también pueden comprender uno o varios agentes inmunorreguladores. Preferiblemente, uno o varios de los agentes inmunorreguladores incluyen un adyuvante.

5 Las composiciones descritas en esta memoria estimularán preferiblemente una respuesta inmune mediada por células, así como una respuesta inmune humoral, con el fin de dirigirse eficazmente hacia una infección con CMVh. Esta respuesta inmune inducirá preferentemente anticuerpos de larga duración (por ejemplo, neutralizante) y una inmunidad mediada por células que puede responder rápidamente después de la exposición a CMVh.

Tratamientos y usos médicos

Los anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos se pueden utilizar para el tratamiento de una infección con CMVh, para la prevención de una infección con CMVh o para el diagnóstico de una infección con CMVh.

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

15 (i) Un anticuerpo de acuerdo con la invención, (ii) un clon de linfocitos B inmortalizados de acuerdo con la invención, (iii) un epítipo capaz de unirse a uno de 1F11 o 2F4, o (iv) un epítipo capaz de unirse a uno de 5A2 o 9A11, pueden ser para uso en terapia.

20 Un método para tratar un paciente puede comprender administrar a ese paciente (i) un anticuerpo de acuerdo con la invención, (ii) un epítipo capaz de unirse a uno de 1F11 o 2F4, o (iii) un epítipo capaz de unirse a uno de 5A2 o 9A11.

25 (i) Un anticuerpo de acuerdo con la invención, (ii) un clon de linfocitos B inmortalizados de acuerdo con la invención, (iii) un epítipo capaz de unirse a uno de 1F11 o 2F4, (iv) un anticuerpo que se une a un epítipo capaz de unirse a uno de 1F11 o 2F4, (v) un epítipo capaz de unirse a uno de 5A2 o 9A11, o (vi) un anticuerpo que se une a un epítipo capaz de unirse a uno de 5A2 o 9A11, se pueden emplear en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una infección con CMVh.

30 Una composición de la invención puede ser para emplear como medicamento. Un anticuerpo de la invención y/o una proteína que comprende un epítipo al que se une un anticuerpo tal, se puede utilizar en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente y/o el diagnóstico de un paciente. Un método para tratar a un sujeto y/o realizar un diagnóstico de un sujeto, puede comprender la etapa de administrarle una composición de la invención. El sujeto es preferiblemente un ser humano. Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica la vigilancia de los síntomas de la enfermedad después de la administración de la composición de la invención. El tratamiento puede tener un régimen de una dosis única o un régimen de dosis múltiple. Los anticuerpos de la invención son útiles para una infección con CMV.

35 Preferiblemente, un anticuerpo o una composición de acuerdo con la invención se administra a grupos de sujetos que tienen particularmente un riesgo de infección o son susceptibles a la infección con CMVh. Tales grupos de sujetos incluyen los sujetos inmunodeficientes, tales como los que padecen VIH o están sometidos a terapia inmunosupresora, tales como pacientes sometidos a trasplante.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar en la inmunización pasiva.

40 Los anticuerpos y fragmentos de los mismos tal y como se describen en la presente invención, también se pueden emplear en un kit para el diagnóstico de infección con CMVh.

Los epítipos capaces de unirse al anticuerpo monoclonal 1F11 o 2F4 descritos en esta memoria, se pueden utilizar en un kit para hacer un seguimiento de la eficacia de los procedimientos de vacunación, detectando la presencia de anticuerpos anti-CMVh protectores.

45 Los epítipos capaces de unirse a los anticuerpos monoclonales 5A2 o 9A11 descritos en esta memoria, se pueden utilizar en un kit para hacer un seguimiento de la eficacia de los procedimientos de vacunación, detectando la presencia de anticuerpos anti-CMVh protectores.

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos tal como se describen en esta memoria, también se pueden usar en un kit para hacer un seguimiento de la fabricación de vacunas con la inmunogenicidad deseada.

50 Un método para preparar un agente farmacéutico puede comprender la etapa de mezclar completamente un anticuerpo monoclonal con uno o varios vehículos farmacéuticamente aceptables, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal que se había obtenido a partir de un hospedador de expresión de la invención. Por lo tanto, los procedimientos para obtener primero el anticuerpo monoclonal (por ejemplo, expresándolo y/o purificándolo) y después mezclándolo completamente con el(los) vehículo(s) farmacéutico(s) se pueden realizar en momentos muy diferentes, por diferentes personas, en diferentes lugares (por ejemplo, en diferentes países).

Partiendo de un linfocito B transformado descrito en esta memoria, se pueden realizar diversas etapas de cultivo, subcultivo, clonación, subclonación, secuenciación, preparación de ácidos nucleicos, etc., con el fin de perpetuar el anticuerpo expresado por el linfocito B transformado, con una optimización opcional en cada etapa. En una realización preferida, los métodos anteriores comprenden además técnicas de optimización (por ejemplo, maduración u optimización por afinidad) aplicadas a los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo. Las células, ácidos nucleicos, vectores, secuencias, anticuerpos, etc. se pueden utilizar y preparar durante estas etapas.

En todos estos métodos, el ácido nucleico utilizado en el hospedador de expresión se puede manipular entre las etapas (ii) y (iii) para insertar, eliminar o modificar ciertas secuencias de ácidos nucleicos. Los cambios de tal manipulación incluyen, pero no se limitan a, cambios para introducir sitios de restricción, para modificar el uso de codones, para añadir u optimizar secuencias reguladoras de la transcripción y/o de la traducción, etc. También es posible cambiar el ácido nucleico para alterar los aminoácidos codificados. Por ejemplo, puede ser útil para introducir una o varias (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) sustituciones de aminoácidos, una o varias (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) deleciones de aminoácidos y/o una o varias (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Tales mutaciones puntuales pueden modificar las funciones efectoras, la afinidad de la unión al antígeno, las modificaciones post-traduccionales, la inmunogenicidad, etc., pueden introducir aminoácidos para la fijación de grupos covalentes (por ejemplo, marcadores) o pueden introducir etiquetas (por ejemplo, para fines de purificación). Se pueden introducir mutaciones en sitios específicos o se pueden introducir al azar, seguidas de selección (por ejemplo, evolución molecular).

General

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

El término "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente exenta" de Y, puede estar completamente exenta de Y. En su caso, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

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

El término "enfermedad", tal y como se usa en este documento, generalmente es sinónimo y se utiliza de manera intercambiable con los términos "trastorno" y "estado" (como en el estado médico), en donde todos reflejan un estado anormal del cuerpo humano o animal, o de una de sus partes que impide el funcionamiento normal, se manifiesta típicamente por signos y síntomas distintivos, y hace que el ser humano o el animal tenga una reducción de la duración o de la calidad de vida.

Tal y como se usa en este documento, la referencia a "tratamiento" de un paciente incluye la prevención y la profilaxis. El término "paciente" se refiere a todos los mamíferos, incluyendo los seres humanos. Ejemplos de pacientes incluyen seres humanos, vacas, perros, gatos, caballos, cabras, ovejas, cerdos y conejos. Preferiblemente, el paciente es un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una SDS-PAGE que demuestra que los anticuerpos monoclonales humanos (1) 1F11 y (2) 2F4 precipitan los complejos de proteínas de CMVh, mientras que la IgG irrelevante no lo hace.

La Figura 2 muestra un análisis FACS que demuestra que los anticuerpos monoclonales humanos (A) 1F11 y 2F4 y (B) 5A2 y 9A11 reconocen un epítipo conformacional obtenido por los productos génicos UL130 y UL131A.

La Figura 3 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de 1F11 y 2F4. Las secuencias de las CDRs están en negrita.

La Figura 4 muestra un análisis FACS que demuestra que los anticuerpos monoclonales humanos 7H3, 10C6, 5FL y 6B4 reconocen un epítipo en la proteína gB de CMVh.

La Figura 5 muestra las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de 5A2. Las secuencias de las CDRs están en negrita.

Modos de llevar a cabo la invención

Ejemplo 1: Clonación de linfocitos B y cribado en busca de actividad neutralizante de CMVh

Se identificaron dos donantes con títulos elevados de anticuerpos neutralizantes de CMVh en el suero. Los linfocitos B de memoria se aislaron y se immortalizaron usando VEB y CpG, tal y como se describe en la referencia 36. Brevemente, los linfocitos B de memoria se aislaron mediante selección negativa con perlas de CD22, seguido de la eliminación de los linfocitos B IgM^+ , IgD^+ , IgA^+ utilizando anticuerpos específicos y clasificación de células. Las células clasificadas (IgG^+) fueron immortalizadas con VEB en presencia de CpG 2006 y células mononucleares alogénicas irradiadas. Los cultivos replicados que contenían cada uno 50 linfocitos B de memoria, se montaron en veinte

placas de 96 pocillos de fondo en U. Después de dos semanas, se recogió el material sobrenadante del cultivo y se sometió a ensayo su capacidad para neutralizar la infección con CMVh de fibroblastos o de células epiteliales, en ensayos separados. Los clones de linfocitos B se aislaron a partir de cultivos policlonales positivos tal y como se describe en la referencia 36. Las concentraciones de IgG en el material sobrenadante de los clones seleccionados se determinaron utilizando un ELISA específico de IgG.

Para el ensayo de neutralización vírica, una cantidad titulada de una cepa clínica aislada de CMVh se mezcló con un volumen igual de material sobrenadante del cultivo o con diluciones de sueros humanos contenían anticuerpos neutralizantes. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se añadió a monocapas confluentes de células endoteliales (por ejemplo, células HUVEC) o fibroblastos en placas de 96 pocillos con fondo plano y se incubaron a 37°C durante dos días. El material sobrenadante se desechó, las células se fijaron con metanol frío y se tiñeron con una mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón para antígenos tempranos de CMVh, seguido por una Ig de cabra anti-ratón marcada con fluoresceína. Las placas se analizaron utilizando un microscopio de fluorescencia. En ausencia de anticuerpos neutralizantes, las células infectadas eran ~1000/campo, mientras que en presencia de concentraciones saturantes de anticuerpos neutralizantes, la infección estaba completamente inhibida. El título neutralizante se indica como la concentración de anticuerpo ($\mu\text{g/ml}$) que proporciona una reducción del 50% de la infección con CMVh.

La Tabla 2 muestra que se han identificado tres tipos diferentes de anticuerpos. Aquellos que pueden neutralizar la infección de fibroblastos, los que pueden neutralizar la infección de células endoteliales y los que pueden neutralizar la infección de ambos. Esto concuerda con los datos previos de que diferentes proteínas son responsables del tropismo hacia un tipo de célula particular [7]. Además de la neutralización de células endoteliales, 1F11 y 2F4 se observaron que neutralizaban la infección de células epiteliales, tales como células de la retina, y células dendríticas (datos no mostrados).

Tabla 2

Clon	Especificidad	50% de neutralización ($\mu\text{g/ml}$)	
		Fibroblastos	Células endoteliales
1F11	UL130/UL131A	*	0,001
2F4	UL130/UL131A	*	0,003
5A2	UL130/UL131A	*	0,002
9A11	UL130/UL131A	*	0,001
7H3	gB	2	*
10C6	gB	0,3	0,3
5F1	gB	0,3	0,3
6B4	gB	0,5	2
Cytotec [^]		5000	50
Suero del donante		33	1

*sin neutralización a la concentración más alta sometida a ensayo (es decir, $>2 \mu\text{g/ml}$).

[^]Cytotec (Biotest) es una mezcla de IgG hiperinmune a CMVh.

Algunos anticuerpos neutralizaban la infección de fibroblastos y de células endoteliales a concentraciones de IgG en el intervalo de 0,3-0,5 $\mu\text{g/ml}$. Otros anticuerpos (1F11, 5A2, 9A11 y 2F4) no consiguieron neutralizar la infección con CMVh de los fibroblastos, pero neutralizaron la infección de las células endoteliales y lo hicieron a concentraciones extremadamente bajas que variaban desde 0,001 hasta 0,004 $\mu\text{g/ml}$ (más de 1000 veces más potentes que los anticuerpos previamente conocidos).

Cabe indicar que debido a la caracterización inicial, se ha determinado que 5F1 se une a un epítipo de gB en lugar de gH. Esto es compatible con los resultados que demuestran que el bloqueo de gB permite la neutralización de la infección de fibroblastos, tal y como se observó para 7H3, 10C6 y 6B4.

Ejemplo 2: Identificación de los antígenos diana reconocidos por los anticuerpos monoclonales

Los fibroblastos MRC-9 humanos fueron infectados con una cepa clínica aislada de CMVh. Después de 3 días, las células se marcaron metabólicamente con ³⁵S metionina y cisteína. Después de un aclaramiento previo de los anticuerpos monoclonales humanos lisados, se añadieron 1F11 y 2F4 y los inmunocomplejos precipitaron mediante la

adición de perlas de proteína A y se determinaron con SDS-PAGE (Figura 1). Un anticuerpo IgG monoclonal humano con especificidad irrelevante fue utilizado como testigo negativo. Los resultados muestran que los anticuerpos monoclonales humanos 1F11 y 2F4 precipitan complejos de proteínas de CMV.

5 Para cartografiar la especificidad de los anticuerpos monoclonales humanos, se construyeron vectores de expresión que codificaban proteínas de CMVh UL128Δ1-27, UL130Δ1-25 y UL131AΔ1-18 marcadas con hemaglutinina (HA) que carecían de péptidos señal. Las células HEK293T fueron transfectadas con estos vectores solos o en combinación. Después de 36 h, las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con un anticuerpo anti-HA (para el control de la eficacia de la transfección) y con anticuerpos monoclonales, seguido de una IgG de cabra anti-humana. Una IgG HuMab con especificidad irrelevante fue utilizada como testigo negativo. La Figura 2A muestra que los anticuerpos monoclonales humanos 1F11 y 2F4 reconocen un epítipo conformacional obtenido por los productos génicos de UL130 y UL131A. La Figura 2B muestra que los anticuerpos monoclonales humanos 5A2 y 9A11 reconocen un epítipo conformacional obtenido por los productos génicos de UL130 y UL131A.

Conclusiones

15 Los resultados anteriores definen dos anticuerpos monoclonales humanos que son capaces de neutralizar con una potencia elevada y selectividad la infección con CMVh de células endoteliales humanas. Para identificar el epítipo reconocido, los anticuerpos se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para inmunoprecipitar proteínas a partir de las células infectadas con CMVh (Figura 1). Los AcMos humanos 1F11 y 2F4 precipitaron varias proteínas con pesos moleculares aparentes de ~15, 33-35 y ~100 KDa. Estos patrones son compatibles con la precipitación de un complejo que contiene gH, gL y UL128, UL130 y posiblemente UL131A.

20 Para definir mejor la diana de estos anticuerpos, caracterizamos su capacidad para teñir células HEK293T transfectadas con vectores que codificaban UL128, UL130 y UL131A marcados con HA. Como se muestra en la Figura 2A, 1F11 y 2F4 solo teñían las células que coexpresaban UL130 y UL131A, lo que sugiere que reconocen un epítipo conformacional determinado por los dos productos génicos. Esta conclusión está respaldada por el hecho de que estos anticuerpos no reaccionan en una transferencia western con material lisado de células infectadas o transfectadas, realizada en condiciones reductoras, desnaturizantes (datos no presentados).

25 Se observaron resultados similares para 5A2 y 9A11. La Figura 2b muestra que estos anticuerpos solo tiñeron células que coexpresaban UL130 y UL131A, lo que sugiere que reconocen un epítipo conformacional determinado por los dos productos génicos.

Ejemplo 3: Identificación adicional de los antígenos diana reconocidos por los anticuerpos monoclonales

30 Para cartografiar las especificidades de los anticuerpos monoclonales humanos que neutralizan la infección de fibroblastos, se construyó un vector de expresión que codificaba gB de longitud completa. Las células HEK293T se transfectaron con este vector. Después de 36 h, las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con anticuerpos monoclonales humanos (HuMab), seguido de IgG de cabra anti-humana. La Figura 4 muestra que los anticuerpos monoclonales 7H3, 10C6, 5F1 y 6B4 (pero no un anticuerpo de IgG con una especificidad irrelevante) teñían específicamente las células transfectadas con gB, indicando que reconocen un epítipo de gB. Cabe indicar que los anticuerpos monoclonales 10C6, 5F1 y 6B4 neutralizan la infección de fibroblastos y de células endoteliales, mientras que el anticuerpo monoclonal 7H3 neutraliza la infección de los fibroblastos (pero no de las células endoteliales). Este conocimiento sugiere que los anticuerpos monoclonales 10C6, 5F1 y 6B4 se unen a un epítipo funcional de gB que es distinto del epítipo al que se unen los anticuerpos monoclonales 7H3.

40 Referencias

- [1] Plachter, B., C. Sinzger y G. Jahn. 1996. Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res* 46:195-261.
- [2] Gerna, G., E. Percivalle, F. Baldanti y M.G. Revello. 2002. Lack of transmission to polymorphonuclear leukocytes and human umbilical vein endothelial cells as a marker of attenuation of human cytomegalovirus. *J Med Virol* 66:335-339.
- [3] Adler, B., L. Scrivano, Z. Ruzcics, B. Rupp, C. Sinzger y U. Koszinowski. 2006. Role of human cytomegalovirus UL131A in cell type-specific virus entry and release. *J Gen Virol* 87:2451- 2460.
- [4] Gerna, G., E. Percivalle, D. Lilleri, L. Lozza, C. Fornara, G. Hahn, F. Baldanti y M.G. Revello. 2005. Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8+ T cells. *J Gen Virol* 86:275-284.
- [5] Hahn, G., M.G. Revello, M. Patrone, E. Percivalle, G. Campanini, A. Sarasini, M. Wagner, A. Gallina, G. Milanese, U. Koszinowski, F. Baldanti y G. Gerna. 2004. Human cytomegalovirus UL 131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J Virol* 78:10023-10033.
- [6] Patrone, M., M. Secchi, L. Fiorina, M. Ierardi, G. Milanese y A. Gallina. 2005. Human cytomegalovirus ULI 30 pro-

tein promotes endothelial cell infection through a producer cell modification of the virion. *J Virol* 79:8361-8373.

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

5 [8] Wang, D. y T. Shenk. 2005. Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *J Virol* 79:10330-10338.

[9] Nigro, G., S. P. Adler, R. La Torre y A.M. Best. 2005. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 353:1350-1362.

10 [10] Borucki, M. J., J. Spritzler, D.M. Asmuth, J. Gnann, M.S. Hirsch, M. Nokta, F. Aweeka, P.I. Nadler, F. Sattler, B. Alston, T.T. Nevin, S. Owens, K. Waterman, L. Hubbard, A. Caliendo y R.B. Pollard. 2004. A phase II, double-masked, randomized, placebo-controlled evaluation of a human monoclonal anti-Cytomegalovirus antibody (MSL-109) in combination with standard therapy versus standard therapy alone in the treatment of AIDS patients with Cytomegalovirus retinitis. *Antiviral Res* 64:103-111.

15 [11] Hamilton, A. A., D.M. Manuel, J.E. Grundy, A.J. Turner, S.I. King, J.R. Adair, P. White, F.J. Carr y W.J. Harris. 1997. A humanized antibody against human cytomegalovirus (CMV) gpUL75 (gH) for prophylaxis or treatment of CMV infections. *J Infect Dis* 176:59-68.

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

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

20 [14] Lefranc, MP. 1999. The IMGT unique numbering for Immunoglobulins, T cell receptors and Ig- like domains. *The Immunologist*, 7:132-136.

[15] Documento US 3.766.162.

[16] Documento US 3.791.932.

[17] Documento US 3.817.837.

25 [18] Documento US 4.233.402.

[19] Documento US 4.676.980.

[20] Documento US 4.831.175.

[21] Documento US 5.595.721.

[22] Documento WO00/52031.

30 [23] Documento WO00/52473.

[24] Documento US 4.766.106.

[25] Documento US 4.179.337.

[26] Documento US 4.495.285.

[27] Documento US 4.609.546.

35 [28] Knauf et al. (1988) *J. Bio. Chem.* 263:15064-15070.

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

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

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

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

40 [33] Poznansky (1984) *Pharm Revs* 36:277.

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

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

[36] Documento WO2004/076677.

[37] Capítulo 4 de *Kuby Immunology* (4ª edición, 2000; ASIN: 0716733315).

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

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

5 [40] Cho et al. *Biotechnol Prog* 2003, 19:229-32.

[41] Documento US 5.807.715.

[42] Documento US 6.300.104.

[43] Documento US 5.750.106.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> HUMABS LLC

<120> Anticuerpos neutralizantes de citomegalovirus humano y su uso

5 <130> P045812WO

<150> GB 0700133.2

<151> 04-01-2007

<160> 50

<170> SeqWin99, versión 1.02

10 <210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos de CDRH1 de 1F11

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

20 <210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de CDRH2 de 1F11

25 <400> 2

Ile Ser Phe Asp Gly Asp Asn Lys
1 5

30 <210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de CDRH3 de 1F11

35 <400> 3

Ala Arg Glu Glu Leu Val Gly Leu Met Pro Pro Tyr Tyr Asn Tyr Gly
1 5 10 15

Leu Asp Val

40 <210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Secuencia de aminoácidos de CDRL1 de 1F11

<400> 4

Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Phe
1 5

50 <210> 5

<211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDRL2 de 1F11

<400> 5
 Asp Asn Asp
 1

10 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDRL3 de 1F11

<400> 6
 Glu Thr Trp Asp Gly Ser Leu Asn Pro Ala Val Val
 1 5 10

20 <210> 7
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 1F11

30 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Leu Ile Ser Phe Asp Gly Asp Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Gln Lys Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Glu Leu Val Gly Leu Met Pro Pro Tyr Tyr Asn Tyr Gly
 100 105 110
 Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

35 <210> 8
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 1F11

40 <400> 8

ES 2 426 987 T3

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

<210> 9
 <211> 378
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de 1F11

10 <400> 9
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cgtgagactc 60
 tcctgtgtgg cctctggatt caccttcagt tcctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccgggcaagg ggctggaatg ggtgtcactt atatcctttg atggagacaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaggggccc attcacaatc tccagagaca gttcccagaa gacgctcttt 240
 ctgcaaatac acagcctgag agttgaggac acggctatat attactgtgc gagagaggag 300
 ttagtcggat tgatgcctcc ctactacaat tatggtttgg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctca 378

15 <210> 10
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 1F11

<400> 10
 cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
 tcctgctctg gaagcagctc caacattgga aataattttg tatcctggta ccagcaactc 120
 cccggaacag cccccaact cctcatttat gacaatgata ggcgaccctc agggattcct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctgacacg tcagccacc cggactccag 240
 actggggacg aggccgatta ctactgcgaa acatgggatg gcagcctgaa tcctgctgtg 300
 gtattcggcg gagggaccag gctgaccgtc cta 333

25 <210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDRH1 de 2F4

<400> 11
 Gly Phe Ser Phe Asn Thr Tyr Gly
 1 5

35

<210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDRH2 de 2F4
 <400> 12
 Ile Trp Asp Asp Gly Ser Lys Met
 10 1 5
 <210> 13
 <211> 19
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDRH3 de 2F4
 20 <400> 13
 Ala Arg Asp Glu Gly Ala Ile Met Leu His Ala Met Thr Asp Tyr Gly
 1 5 10 15
 Leu Asp Val
 <210> 14
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDRL1 de 2F4
 30 <400> 14
 Asn Leu Gly Asp Glu Phe
 1 5
 <210> 15
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDRL2 de 2F4
 40 <400> 15
 Gln Asp Ser
 1
 45 <210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDRL3 de 2F4
 <400> 16
 Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala His Tyr Val
 55 1 5 10
 <210> 17
 <211> 124
 <212> PRT

ES 2 426 987 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 2F4

5

<400> 17

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

<210> 18

10 <211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 2F4

<400> 18

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

20 <210> 19

<211> 373

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

ES 2 426 987 T3

<223> Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de 2F4

<400> 19

```

caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt cagtttcaat acatatggga tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatgggatg atggaagtaa aatgtaccat 180
gcggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaaaaa cacactgtat 240
ctccaaatga acagtctgag agccgaggat acggctgtgt attactgtgc gagagacgag 300
ggtgcaataa tgctgcacgc catgactgac tacggtttgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acagtcaccg tct 373

```

5

<210> 20

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 2F4

<400> 20

```

tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccaccatc 60
acctgctctg gagataattt ggggatgag tttgcttgcct ggtatcagca gaagccaggc 120
cagtctcctg tgctgggtcat ctatcaggat tccaagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccagctctgg gaacacagcc actctgacca tccgcgggac ccaggctatg 240
gatgaggctg actactactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgcccatta tgtcttcgga 300
actgggacca aggtcaccgt ccta 324

```

15

<210> 21

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de CDRH1 de 1F11

25

<400> 21

```

ggattcacct tcagttccta tgct 24

```

<210> 22

<211> 24

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de CDRH2 de 1F11

35

<400> 22

```

atatccttgg atggagacaa taaa 24

```

<210> 23

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de CDRH3 de 1F11

45

<400> 23

```

gcgagagagg agttagtcgg attgatgcct ccctactaca attatggitt ggacgtc 57

```

50

<210> 24

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 426 987 T3

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de CDRL1 de 1F11

5 <400> 24
agctccaaca ttggaataa tttt 24

<210> 25
<211> 9
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de CDRL2 de 1F11

15 <400> 25
gacaatgat 9

<210> 26
<211> 36
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de CDRL3 de 1F11

25 <400> 26
gaaacatggg atggcagcct gaatcctgct gtggta 36

<210> 27
30 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Secuencia de nucleótidos de CDRH1 de 2F4

<400> 27
ggattcagtt tcaatacata tggg 24

40 <210> 28
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos de CDRH2 de 2F4

<400> 28
50 atatgggatg atggaagtaa aatg 24

<210> 29
<211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos de CDRH3 de 2F4

<400> 29
60 gcgagagacg aggggtcaat aatgctgcac gccatgactg actacggttt ggacgtc 57

<210> 30
<211> 18
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de CDRL1 de 2F4

5 <400> 30
aatttggggg atgagttt 18

<210> 31

10 <211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de nucleótidos de CDRL2 de 2F4

<400> 31
caggattcc 9

20 <210> 32
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia de nucleótidos de CDRL3 de 2F4

<400> 32
caggcgtggg acagcagcac tgcccattat gtc 33

30 <210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos de CDRH1 de 5A2

<400> 33
Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Val
40 1 5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de CDRH2 de 5A2

50 <400> 34
Ile Ile Pro Ile Phe Asn Thr Ala
1 5

<210> 35
<211> 20
<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de CDRH3 de 5A2

60 <400> 35

ES 2 426 987 T3

Ala Arg Asp Phe Leu Ser Gly Pro Met Glu Met Pro Gly Gly Tyr Tyr
 1 5 10 15

Gly Leu Asp Val
 20

<210> 36

<211> 12

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de CDRL1 de 5A2

10

<400> 36

Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 37

15 <211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia de aminoácidos de CDRL2 de 5A2

<400> 37

Trp Ala Ser
 1

25 <210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos de CDRL3 de 5A2

<400> 38

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr
 1 5

35

<210> 39

<211> 127

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 5A2

<400> 39

ES 2 426 987 T3

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

<210> 40
 <211> 113
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 5A2

10 <400> 40
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

15 <210> 41
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de 5A2

<400> 41

ES 2 426 987 T3

```

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaggaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgtta tccactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatggggggg atcatcccta tctttaatac agcaaactac 180
gcacagaagg tccagggcag agtcacgatt accgcggagc aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaagac actgccatat attactgtgc gagggatatt 300
ctatcaggtc ctatggaaat gcccgcgggc tactacggtt tggacgtctg gggccaaggg 360
accacggtca ccgtctcctc a 381

<210> 42
<211> 339
5 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 5A2
10 <400> 42
   gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc 60
   atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagttcca acaataagaa ctacttagct 120
   tgggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgtctca tttactgggc atctaccggg 180
   gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
   atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300
   cctatcacct tcggccaagg gacacgactg gagattaaa 339

<210> 43
15 <211> 24
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Secuencia de nucleótidos de CDRH1 de 5A2

   <400> 43
   ggaggcacct tcagcagcta tgtt 24

25 <210> 44
   <211> 24
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

30 <220>
   <223> Secuencia de nucleótidos de CDRH2 de 5A2

   <400> 44
   atcatcccta tctttaatac agca 24
35 <210> 45
   <211> 60
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

40 <220>
   <223> Secuencia de nucleótidos de CDRH3 de 5A2

   <400> 45
45 gcgagggatt ttctatcagg tcctatggaa atgccggcg gclactacgg ttggacgtc 60

<210> 46
<211> 36
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de CDRL1 de 5A2

55 <400> 46

```

cagagtgttt tatacagttc caacaataag aactac 36

<210> 47
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de CDRL2 de 5A2

10 <400> 47
 tgggcatct 9

<210> 48
 <211> 27
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de CDRL3 de 5A2

20 <400> 48
 cagcaatatt atagtactcc tacc 27

<210> 49
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la variante de la cadena pesada de 2F4

<400> 49
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Lys Met Tyr His Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Glu Gly Ala Ile Met Leu His Ala Met Thr Asp Tyr Gly
 100 105 110
 Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

35 <210> 50
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de la variante de la cadena pesada de 2F4

40 <400> 50

45 <400> 50

ES 2 426 987 T3

```
caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt cagtttcaat acatatggga tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagc ggctggagtg ggtggcagtt atatgggatg atggaagtaa aatgtaccat 180
gcggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attcaaaaa cacactgtat 240
ctccaaatga acagtctgag agccgaggat acggctgtgt attactgtgc gagagacgag 300
ggtgcaataa tgctgcacgc catgactgac tacggtttgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acagtcaccg tctcctca 378
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se une a antígeno, que se une a citomegalovirus humano (CMVh) y neutraliza la infección con CMVh de células endoteliales, células epiteliales, células de la retina y células dendríticas, y que es específico de una combinación de proteínas UL130 y UL131A de CMVh, formando la combinación el epítipo reconocido por dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión, en donde el anticuerpo o el fragmento:
- 5 (a) comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente, de SEQ ID NOs: 17 y 18, respectivamente, de SEQ ID NOs: 39 y 40, respectivamente o de SEQ ID NOs: 49 y 18, respectivamente;
- 10 (b) comprende secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena pesada, tal como se describen en SEQ ID NOs: 1, 2 y 3, respectivamente, y secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena ligera, tal como se describen en SEQ ID NOs: 4, 5 y 6, respectivamente;
- 15 (c) comprende secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena pesada, tal como se describen en SEQ ID NOs: 11, 12 y 13, respectivamente, y secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena ligera, tal como se describen en SEQ ID NOs: 14, 15 y 16, respectivamente; o
- (d) comprende secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena pesada, tal como se describen en SEQ ID NOs: 33, 34 y 35, respectivamente, y secuencias de CDR1, 2 y 3 de la cadena ligera, tal como se describen en SEQ ID NOs: 36, 37 y 38, respectivamente.
- 20 2. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo según la reivindicación 1.
3. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2, que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NOs: 9, 10, 19, 20, 21-32, 41-48 o 50, o una secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos que una cualquiera de SEQ ID NOs: 9, 10, 19, 20, 21-32, 41-48 o 50.
4. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2 o 3.
- 25 5. Una célula transformada con un vector de expresión según la reivindicación 4.
6. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento que se une a antígeno según la reivindicación 1, y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. La composición según la reivindicación 6, que comprende adicionalmente un segundo anticuerpo anti-CMVh o un fragmento del mismo que se une a antígeno, que neutraliza la infección con CMVh.
- 30 8. La composición según la reivindicación 7, en donde dicho segundo anticuerpo anti-CMVh es específico de la proteína gB de CMVh.

FIG. 1

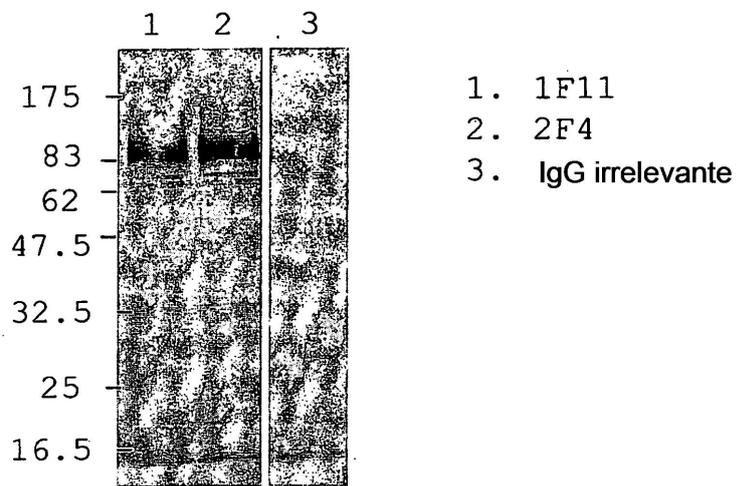


FIG. 2A

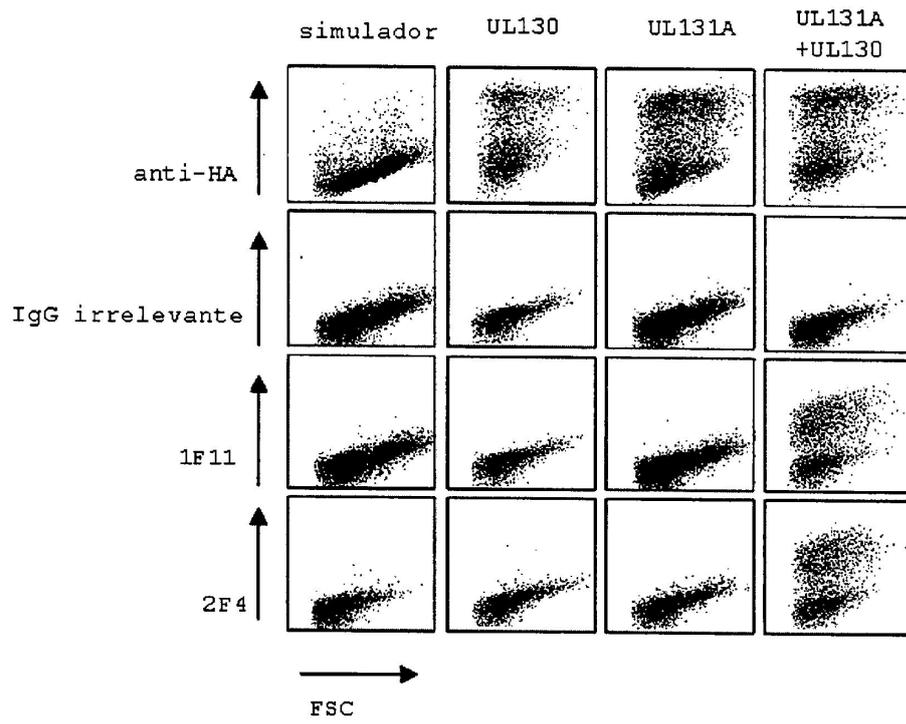


FIG. 2B

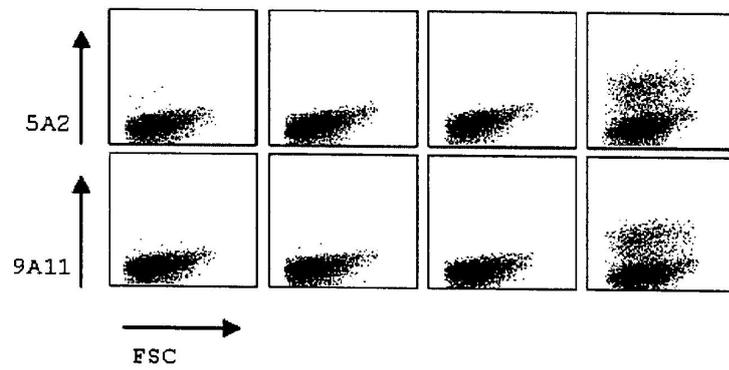


FIG. 3

1F11-VH

caggTgcagctggTggagTctgggggaggcgtggTccagcctgggaggtccgtgagactctcctgtgtggcctctgg
 attcaccttcagttcctatgctatgactgggtccgccaggctccgggcaagggctggaatgggtgtcacttata
 cctttgatggagacaataaatactatgcagactccgtgagggccgattcacaatctccagagacagttcccagaag
 acgctctttctgcaaatgaacagcctgagagttagggacacggctatataatctgtgogagagaggagttagtccg
 attgatgcctccctactacaattatggtttggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctcctca

QVQLVESGGGVVQPGRSVRLSCVASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSLISFDGDNKYADSVRGRFTISRDSQK
 TLFLQMNSLRVEDTAIYYCAREELVGLMPYNYNYGLDVWGQGTITVTVSS

1F11-VL

cagTctgtgttgacgcagccgccctcagTgtctgTggccccaggacagaagTcaccatctcctgctctggaagcag
 ctccaacattggaataaatttTgtatcctgTaccagcaactccccggaacagccccaaactcctcatttatgaca
 atgataggcgaccctcagggattcctgaccgattctctggctccaagTctgacacgtcagccaccctgTcatcacc
 ggactccagactggggacgagggcgttactactcgcaaaacatgggatggcagcctgaaTcctgctgtggTatctcg
 cggagggaccaggtgaccgtccta

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDNDRRPSGIPDRFSGSKSDTSATLVIT
 GLQTGDEADYYCETWDGSLNPAVVFVGGTRLTVL

2F4-VH

caggTgcagctggTggagTctgggggaggcgtggTccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctgg
 attcagtttcaatacataatgggatgactgggtccgccaggctccaggcaagggctggagTgggtggcagTtata
 gggatgatggaagtaaaatgtaccatgcggactccgtgaaagggccgattcaccatctccagagacaattccaaaaac
 acactgtatctccaaatgaacagTctgagagccgaggatcagcgtgtgtattactgtgcagagacaggggtgcaat
 aatgctgcagccatgactgactacggtttggacgtctggggccaagggaccacagTcaccgtct

QVQLVESGGGVVQPGRSRLSLSAASGFSEFNTYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWDGSKMYHADSVKGRFTISRDNKSN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGAIMLHAMTDYGLDVWGQGTITVTV

2F4-VL

tcctatgagctgactcagccaccctcagTgtccgtgtccccaggacagacagccaccatcacctgctctggagataa
 tttgggggatgagTttgcttgtgtgtatcagcagaagccagccagTctcctgtgctggTcatctatcaggattcca
 agcggccctcagggatccctgagcgttctctggctccagctctgggaacacagccactctgaccatccggggacc
 cagcTatggatgaggtgactactactgtcaggcgtgggacagcagcactgcccattaTgtctctcgaaactgggac
 caaggtcaccgtccta

SYELTQPPSVSVSPGQTATITCSGDNLGFACWYQQKPGQS PVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSSSGNTATLIRGT
 QAMDEADYYCAWDSSTAHYVFGTGKTVTL

FIG. 4

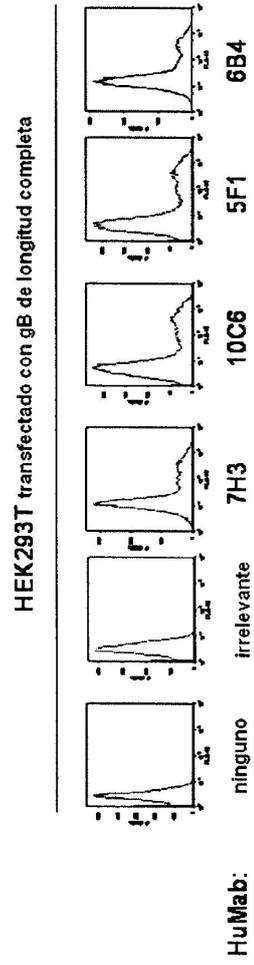


FIG. 5

5A2 - VH

cagggtgcagctgggtgcagctcggggctgaggtgaggaagcctgggtcctcggtgaaggtcctctgca
aggcttctggaggcaccttcagcagctatgttatccactgggtgcgacaggccccctggacaagggt
tgagtggatgggggggatcaatccctatctttaatacagcaaaactacgcacagaaggtccagggcaga
gtcacgattaccgcgagcaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaag
acactgccatatattactgtgaggggattttctatcaggtcctatggaaatgcccgggcggctacta
cggtttgagcgtctggggccaaggaccacggtcaccgtctcctca

QVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSKASGGTFSSYVIHWVRQAPGQGLEWMGGIIPFNATANYAQKVQGR
VTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAIYYCARDFLSGPMEMPGGYGLDVGQGTITVTVSS

5A2 - VK

gacatcgtgatgaccagctcctcagactccttggtgtgtctctggcgagagggccaccatcaact
gcaagtcagccagagtggtttatcacagttccaacaataagaactacttagcttggtagcagcagaa
accaggacagcctcctaagctgctcatttactgggcactctaccgggaatccggggctcctgaccga
ttcagtgccagcgggtctgggacagatttactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgtgg
cagtttattactgtcagcaatattatagtaactcctatcaccttcggccaaggacacgactggagat
taaa

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR
FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYISTPITFGQTRLEIK