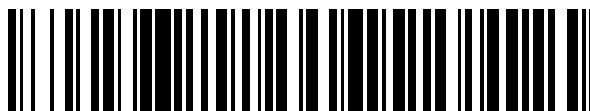


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 460**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/08** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

**A61K 39/42** (2006.01)

**C07K 16/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.1995 E 06003224 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 1659133**

54 Título: **Anticuerpos quiméricos humano-murinos frente al virus respiratorio sincitial**

30 Prioridad:

**15.08.1994 US 290592**

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

**11.02.2014**

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)  
ONE MEDIMMUNE WAY  
GAITHERSBURG, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**JOHNSON, LESLIE SYD, DR.**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**ES 2 442 460 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 quiméricos humano-murinos frente al virus respiratorio sincitial

### 5 Antecedentes

10 El virus respiratorio sincitial (RSV) es la principal causa de la enfermedad respiratoria aguda en niños pequeños admitidos en hospitales, y la práctica de la comunidad tratará quizá cinco veces el número de niños hospitalizados. Por consiguiente, ésta es la causa más común de infección del tubo respiratorio inferior en niños pequeños. Aunque la mayoría de las infecciones del RSV adquiridas de la comunidad se resuelven por ellas mismas en un periodo comprendido entre una semana y diez días, muchos niños hospitalizados, especialmente de menos de seis meses de edad requieren ventilación asistida.

15 Los esfuerzos para producir una vacuna efectiva no han tenido éxito (8). Un obstáculo principal para el desarrollo de una vacuna es la seguridad; la vacuna de RSV inactivada de formalina inicial causó un incremento de la incidencia de enfermedad del tubo respiratorio inferior de RSV y muerte en niños inmunizados expuestos al virus (5).

20 Recientemente, se ha licenciado el fármaco ribavirina para la terapia de neumonía y bronquiolitis de RSV (2, 3); su valor es contradictorio (4). Aunque la ribavirina ha mostrado eficacia (9), el fármaco debe ser administrado durante un periodo de 18 horas por inhalación de aerosol. Además, el nivel de infecciones secundarias después del cese del tratamiento es significativamente mayor que en los pacientes no tratados.

25 Los estudios han demostrado que la inmunoglobulina del RSV de valoración alta fue efectiva tanto en la profilaxis como en la terapia de las infecciones del RSV en modelos animales (6, 7). Los animales infectados tratados con inmunoglobulina del RSV, no mostraron evidencia de enfermedad pulmonar de inmunocomplejo (6, 7).

30 Incluso si la globulina hiperinmunitaria del RSV muestra que reduce la incidencia y la severidad de la infección en el tubo respiratorio inferior del RSV en niños de alto riesgo, varias desventajas pueden limitar su uso. Un inconveniente es la necesidad de infusión intravenosa en estos niños que tienen un acceso venoso limitado debido a la anterior terapia intensiva. Una segunda desventaja es el gran volumen de RSVIG requerido para la protección, de forma particular debido a que la mayoría de estos niños tienen la función cardiopulmonar comprometida. Una tercera desventaja es que la infusión intravenosa precisa visitas mensuales al hospital durante la etapa del RSV lo que sitúa a estos niños en riesgo de infección de RSV nosocomial (1). Un problema final es que puede probarse que es muy difícil seleccionar suficientes donantes para producir una globulina hiperinmunitaria para el RSV de modo que se pueda cumplir con la demanda de este producto. Actualmente, sólo aproximadamente el 8% de los donantes normales tienen valoraciones de anticuerpos que neutralizan el RSV lo suficientemente altos como para beneficiarse de la producción de globulina hiperinmunitaria.

40 Otra aproximación puede ser el desarrollo de anticuerpos monoclonales con una actividad neutralizante específica elevada como una alternativa a la globulina hiperinmunitaria. Es preferible, si no necesario, el uso de anticuerpos monoclonales mejor que anticuerpos murinos o de rata para minimizar el desarrollo de respuestas de anticuerpos anti-roedores humanos que puedan comprometer la eficacia terapéutica del anticuerpo o inducir patología de inmunocomplejo. Sin embargo, la generación de anticuerpos monoclonales humanos con la especificidad deseada puede ser difícil y el nivel de producción a partir de líneas celulares humanas es a menudo bajo, descartando su desarrollo.

50 Una aproximación alternativa implica la producción de anticuerpos quiméricos de humano-ratón en los que la información genética que codifica las regiones variables de cadena pesada y ligera de murino está fijada a los genes que codifican las regiones constantes de pesada y ligera. El híbrido de ratón-humano resultante tiene aproximadamente un 30% de la inmunoglobulina intacta derivada de las secuencias de murino. Por consiguiente, aunque varios laboratorios han construido anticuerpos quiméricos con dominios variables de ratón y constantes de humano (10-18), la región variable de ratón todavía es observada como extraña (19). El documento WO9417105 divulga la humanización del mAb anti-RSV neutralizante murino designado como 1308F la unión al sitio antigénico C de la proteína F.

### 55 Sumario de la invención

60 La presente invención proporciona el anticuerpo humanizado de las reivindicaciones 1-8, la composición farmacéutica de las reivindicaciones 9-18 y los usos de las reivindicaciones 19-32.

65 El término "animal" tal como se utiliza en la presente memoria se usa en su sentido más amplio incluyendo mamíferos que incluyen humanos.

### Descripción detallada de los dibujos

Los dibujos representados y descritos en la presente memoria pretenden ilustrar de forma adicional la presente

invención y no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

La Figura 1 muestra el diseño de la secuencia de aminoácidos (AA) del glucoproteína V<sub>H</sub> de la glucoproteína anti-RSV F CDR-Injertada. La figura representa la secuencia de AA para el V<sub>H</sub> del HV3 humano antes del injerto, el V<sub>H</sub> injertado de CDR, y el V<sub>H</sub> de murino MAb1308F a partir del que se injertó la secuencia de CDR. Las regiones intensamente subrayadas identifican la secuencia de CDR que fue injertada en el V<sub>H</sub> de HV3 humano y cada una de las tres regiones es identificada como CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente.

La Figura 2 muestra el diseño de la secuencia de aminoácidos (AA) del V<sub>L</sub> de la proteína anti-RSV F CDR-Injertada. La figura representa la secuencia de AA para el V<sub>L</sub> de K102 humano antes del injerto, el V<sub>L</sub> injertado de CDR, y el V<sub>L</sub> de MAb1308F a partir del que se injertó la secuencia de CDR. Estas regiones fuertemente subrayadas identifican la secuencia de CDR que ha sido injertada en el V<sub>L</sub> de K102 humano y cada una de las tres regiones es identificada como CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente.

La Figura 3 representa los oligonucleótidos utilizados para preparar el Hu1308V<sub>H</sub>, siendo las secuencias que están subrayadas las secuencias específicas del cebador.

La Figura 4 representa los oligonucleótidos utilizados para preparar el Hu1308V<sub>L</sub>, siendo las secuencias que están subrayadas las secuencias específicas del cebador.

La Figura 5 representa la construcción del plásmido de los vectores de expresión para el Humanizado 1308.

La Figura 6 representa un gráfico de la Neutralización del RSV como porcentaje de la neutralización frente a ng de MAb por reacción para la neutralización con Cos Hu1308F y con Mu1308F.

La Figura 7 muestra el diseño de la secuencia de aminoácidos (AA) del V<sub>H</sub> de la glucoproteína anti-RSV F CDR-Injertada. La figura representa la secuencia de AA para el COR V<sub>H</sub> humano antes del injerto, el V<sub>H</sub> CDR injertado, y el Mab1129 V<sub>H</sub> de murino a partir del que se ha injertado la secuencia de CDR. Las regiones subrayadas de forma intensa identifican la secuencia de CDR que ha sido injertada en el COR V<sub>H</sub> humano y cada una de las tres regiones es identificada como CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente.

La Figura 8 muestra el diseño de la secuencia de aminoácidos (AA) del V<sub>L</sub> de la proteína anti-RSV F CDR-injertada. La figura representa la secuencia de AA para el K102 V<sub>L</sub> humano antes del injerto, el V<sub>L</sub> CDR injertado, y el Mab1129 V<sub>L</sub> de murino a partir del que se injertó la secuencia de CDR. Las regiones subrayadas de modo intenso identifican la secuencia de CDR que ha sido injertada en el K102 V<sub>L</sub> humano y cada una de las tres regiones es identificada como CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente.

La Figura 9 muestra los oligonucleótidos utilizados para construir el 1129 VH humanizado.

La Figura 10 muestra los datos de unión para al 1129 humanizado en un ensayo ELISA.

### Descripción detallada de la invención

El trasplante en un anticuerpo de humano, de sólo la información genética para al menos una CDR a partir de cada una de las cadenas pesada variable y ligera variable derivadas del anticuerpo monoclonal de murino frente al antígeno de RSV, es efectivo para la prevención y el tratamiento del RSV en animales. El anticuerpo de murino puede ser un anticuerpo neutralizante frente a RSV. El anticuerpo de murino puede ser un anticuerpo frente al antígeno de RSV F. El anticuerpo de murino puede ser un anticuerpo neutralizante frente al antígeno de RSV F. La sustitución de las CDR de ratón en los segmentos de estructura variable de humano minimiza el potencial para las respuestas de anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA) mientras que retiene la afinidad de unión y la especificidad por el antígeno, la proteína de RSV F. Ya que, las CDR no contienen características de motivos de murino o de humano, los anticuerpos de humano que contienen las CDR de anticuerpo de murino son esencialmente indistinguibles de los anticuerpos completamente humanos, minimizando de este modo la respuesta del anticuerpo humano mientras que retienen la afinidad de unión y la especificidad por el antígeno del RSV F.

El desarrollo de un anticuerpo humanizado frente al antígeno de RSV F empezó con un anticuerpo de murino frente al antígeno de RSV F. Ejemplos de anticuerpos de murino de este tipo son: MAb 1436C, MAb 113, MAb 112, MAb 151, MAb 1200, MAb 1214, MAb 1237, MAb 1129, MAb 1121, MAb 1107, MAb 131-1, MAb 43-1, MAb 1112, MAb 1269, MAb 1243, MAb 1331H, MAb 1308F y MAb 1302A (ver cita 21).

Las CDR del anticuerpo humanizado están comprendidas de tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) a partir de cada cadena pesada variable y ligera variable del anticuerpo de murino.

Se han mapeado los anticuerpos de murino frente al antígeno del RSV F por perfiles de unión competitiva y de reactividad de los mutantes de escape del virus para los tres sitios antigénicos amplios (A, B, C) que contienen 16 epítopos diferentes (20). Los epítopos dentro de los sitios antigénicos A y C han mostrado la menor variabilidad en

los aislados naturales.

5 Un anticuerpo humanizado puede contener al menos una CDR de cada cadena pesada variable y ligera variable de al menos un anticuerpo de murino frente al antígeno del RSV F que es específico para el sitio antigénico A o C. El anticuerpo de murino frente al antígeno del RSV F puede ser específico para el sitio antigénico C, en donde el anticuerpo de murino es MAb 1308F.

10 Un anticuerpo humanizado puede contener CDR de la cadena pesada variable de anticuerpo de murino MAb 1308F frente al antígeno del RSV F. La cadena pesada variable de CDR de MAb 1308F comprende tres CDR que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos: N.º 31 a 35, 47 a 60 y 99 a 106. Además, el anticuerpo humanizado puede contener adicionalmente CDR de una cadena ligera variable de MAb 1308F de anticuerpo de murino frente al antígeno del RSV F. La cadena ligera variable de CDR puede comprender tres CDR que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos: N.º 24 a 34, 50 a 56 y 89 a 97.

15 Un anticuerpo humanizado puede contener al menos una CDR de cada cadena variable pesada y variable ligera de al menos un anticuerpo de murino frente al antígeno del RSV F que es específica para el sitio antigénico A. El anticuerpo de murino frente al antígeno del RSV F específico para el sitio antigénico A puede ser MAb 1129.

20 Un anticuerpo humano puede contener CDR de la cadena pesada variable del anticuerpo de murino MAb 1129 frente al antígeno del RSV F. La cadena pesada variable de CDR de MAb 1129 comprende tres CDR que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos: N.º 31 a 36, 52 a 67 y 100 a 109. El anticuerpo humanizado puede contener CDR de una cadena ligera variable de MAb 1129 de anticuerpo de murino frente al antígeno del RSV F. La cadena ligera variable de CDR comprende tres CDR que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos: N.º 24 a 33, 51 a 56 y 89 a 96.

25 Un procedimiento para prevenir o tratar una infección por RSV puede comprender la administración al animal de una cantidad efectiva de un anticuerpo humano que contiene al menos una CDR de cada cadena pesada variable y ligera variable, de al menos un anticuerpo de murino frente al antígeno del RSV F.

30 Otro aspecto de la invención de los solicitantes es una composición que comprende la administración de una cantidad efectiva del anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 conjuntamente con un vehículo farmacéutico aceptable. Los vehículos farmacéuticos aceptables incluyen pero no están limitados a tampones no tóxicos, rellenos, soluciones isotónicas, etc.

35 La composición de la invención de los solicitantes se puede administrar por vía tópica o sistémica. Ejemplos de administración tópica son la administración intranasal y la inhalación de un aerosol que contiene la composición de anticuerpo humano. La administración sistémica puede realizarse por inyección intravenosa o intramuscular de la composición de anticuerpo humano.

40 Un aspecto preferente de la invención de los solicitantes es que el anticuerpo humanizado se administre como parte de una pluralidad de anticuerpos humanos frente al antígeno del RSV F. Estos anticuerpos pueden ser frente al mismo o a diferentes epítomos del antígeno del RSV F.

45 De forma adicional, el anticuerpo humanizado de la presente invención se puede usar de forma clínica para el diagnóstico del virus respiratorio sincitial en pacientes. Debido a su afinidad por el antígeno de RSV F, estos anticuerpos humanizados se pueden usar en procedimientos de ensayo de diagnóstico conocidos para la detección de la presencia y de la concentración de células de antígeno de RSV F en muestras, por ej., fluidos corporales. Los anticuerpos humanizados de la presente invención pueden estar, por ejemplo, ligados o unidos a un soporte sólido, tal como perlas de látex, una columna, etc., que a continuación se ponen en contacto con una muestra que se cree que contiene el antígeno del RSV F.

50 El desarrollo de los solicitantes de anticuerpos humanizados frente al RSV, empezó con células de hibridoma de murino que producen anticuerpos monoclonales de murino que han mostrado que neutralizan el RSV *in vitro* y que protegen las ratas del algodón frente a la infección del tubo respiratorio inferior con RSV.

55 Se seleccionó uno de dichos anticuerpos, que es específico para el sitio antigénico C, para producir anticuerpos quiméricos de ratón-humano. Se seleccionó este anticuerpo sobre la base de que: (i) reaccionó con un gran número de cepas de virus ensayadas (al menos 13 sobre 14 aisladas); (ii) retuvo la actividad neutralizante frente a los mutantes de escape del virus seleccionados con otros anticuerpos anti-F y (iii) bloqueó la replicación del RSV cuando se administró a bajas dosis a ratas del algodón por vía intranasal antes del desafío del virus. El anticuerpo mostró una reducción significativa en la valoración del virus pulmonar entre anticuerpos en esa región respectiva. Se seleccionó el anticuerpo 1308F de murino, específico para la región C de la proteína del RSV F, como el objetivo inicial para humanización.

65 En resumen, se construyeron los anticuerpos humanizados del modo siguiente: se extrajo el ARN a partir de la línea celular que produce el anticuerpo, se clonaron y secuenciaron las regiones variables de murino que son

responsables de la unión del anticuerpo al RSV, resultando en la identificación de las CDR del anticuerpo de murino. A continuación se seleccionó una secuencia de estructura de cadena variable pesada y ligera que tiene la mayor homología con el anticuerpo de murino de cadena variable pesada y ligera. Una secuencia de estructura humana tal como la descrita anteriormente es más capaz de aceptar las CDR derivadas de murino.

5 Se comparó la cadena variable pesada de murino 1308F con varios genes de líneas germinales humanas, siendo la mayor homología la del gen HV3 de la línea germinal humana. Las dos secuencias fueron homólogas en un 62% en total y un 65% en las regiones de estructura. De forma significativa, hay buena homología en los cruces de los segmentos de CDR y las estructuras con la excepción del extremo terminal 5' de FR2. A continuación se  
10 sustituyeron las CDR de cadena variable pesada derivadas de murino en el gen HV3 de la línea germinal de cadena variable pesada humana. En la Figura 1 se muestran las secuencias de ratón y humana así como las de una potencial combinación CDR-injertado de los dos.

15 Un análisis similar de la región V<sub>L</sub> reveló una alta homología para el gen K 102 de la línea germinal humana V-kappa. La alineación de estas secuencias se muestra en la Figura 2. En este caso la homología es del 62% en total y del 73% en las regiones de estructura. A continuación se sustituyeron las CDR variable ligera derivadas de murino en la cadena variable ligera humana del gen K102 de la línea germinal humana. En cada caso puede seleccionarse una región J humana que es idéntica a la secuencia de ratón.

20 En otro modo de realización, se comparó la cadena variable pesada de murino 1129 con varias secuencias de aminoácidos de la región variable humana, siendo la mayor homología con la secuencia de COR reordenada humana. Las dos secuencias de aminoácidos fueron homólogas en un 75% en total y en un 80% en las regiones de estructura. De forma significativa, hay una buena homología en las conexiones de los segmentos de CDR y las estructuras. A continuación se sustituyeron las CDR de cadena variable pesada derivadas de murino en la secuencia  
25 de COR V<sub>H</sub> humana de cadena pesada variable. En la Figura 7 se muestran las secuencias de ratón y humano así como la de una potencial combinación CDR-injertado de las dos.

30 Un análisis similar de la región V<sub>L</sub> reveló una alta homología para la línea germinal humana K102. La alineación de estas secuencias se muestra en la Figura 8. En este caso la homología es de un 73% en total y de un 82% en las regiones de estructura. A continuación se sustituyeron las CDR de variable ligera derivadas de murino en la cadena de variable ligera de la línea germinal humana K102. En este caso se seleccionó una región humana J, humana JK4, que es similar a la secuencia de ratón.

35 Por consiguiente, los anticuerpos humanos se expresan y se caracterizan con relación a los anticuerpos de murino paternos para estar seguros de que la manipulación genética no ha alterado de forma drástica las propiedades de unión de los anticuerpos.

Los solicitantes presentan en la presente memoria ejemplos que son además ilustrativos de la invención reivindicada.

40 **Ejemplo 1**

**Clonación de ADNc y secuenciación del anticuerpo 1308F de proteína anti-RSV F**

45 Se generaron del modo siguiente copias de ADNc del V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo objetivo del modo siguiente. Se llevó a cabo la primera reacción de la hebra de ADNc utilizando transcriptasa inversa de AMV y un cebador de oligonucleótido fosforilado complementario a un segmento del ARNm que codifica la región constante del isotipo particular de cadena pesada y ligera. Para el 1308F el isótopo es gamma, kappa y los oligonucleótidos específicos fueron 5'AGCGGATCCAGGGGCCAGTGGATAGAC complementario a los codones 129-137 de la región CH1 del  
50 gen Gamma de murino, y 5'TGGATGGTGGGAAGATG complementario a los codones 116-122 del gen C-kappa de murino. El cebador se hibrida a un segmento del ARNm adyacente a la región variable. Se llevó a cabo la síntesis de ADNc de la segunda hebra utilizando RNasa y ADN polimerasa I de *E. coli*, tal como se ha descrito por Gubler y Hoffman (Gene 25; 263, 1983), seguido por ADN polimerasa T4 para asegurar que se produjeran las terminaciones despuntadas.

55

Señal	V	J	C	ARNm
	1 <sup>a</sup>	hebra	ADNc	
	2 <sup>a</sup>	hebra	ADNc	

60 Se ligó el ADNc bicatenario en el pUC18 que había sido digerido con endonucleasa de restricción SmaI y se trató con fosfatasa alcalina. Se utilizó la ligadura para transformar el DH5a de *E. coli* por el método de Hanahan (J. Mol. Biol. 166; 557, 1983). Se utilizaron las sondas de oligonucleótido correspondientes a la secuencia de la región C situadas entre el cebador de la primera hebra de ADNc y la región V en hibridaciones de colonia para identificar los transformantes que llevan el segmento de ADNc deseado. Las secuencias de sonda específicas fueron

GGCCAGTGGATAGAC complementaria a los codones 121-125 de regiones CH1 de murino y TACAGTTGGTGCAGCA complementaria con los codones 110-115 de c-kappa, respectivamente. Se analizaron los plásmidos candidatos, aislados de colonias que fueron positivas en la hibridación, por digestión con endonucleasas de restricción EcoRI y HindIII para liberar la inserción de ADNc. Los plásmidos con insertos de 400-500 pb se sometieron a secuenciación de ADN.

Se insertaron las inserciones de ADNc en M13 mp18 y mp19 para la determinación de la secuencia de ADN en ambas hebras. Se aisló el ADN monocatenario del bacteriófago recombinante resultante y se secuenció por el método de terminación de la cadena didesoxi (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74; 5463, 1977).

Con el fin de confirmar que el par de ADNc del gen, reordenados y somáticamente V mutados, aislados del hibridoma 1308F representaban aquellos que estaban en el anticuerpo 1308F, se generó un gen de Fv monocatenario, expresado en y segregado de células de mamífero, ensayándose a continuación para determinar la unión al virus RS. A continuación se utilizaron los experimentos de unión de competición para demostrar la identidad del sitio de unión.

## Ejemplo 2

### Diseño y montaje de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de 1308F humano

Se identificaron las regiones de CDR del V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> por comparación de la secuencia de aminoácidos con secuencias conocidas tal como se ha descrito por Kabat (38). Con el fin de seleccionar las secuencias de estructura humana más capaces de aceptar las secuencias de CDR derivadas de ratón en una conformación que retiene la estructura del sitio de combinación del antígeno, se utilizó la siguiente estrategia. En primer lugar, se comparó la secuencia de las regiones del V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de murino con secuencias humanas conocidas a partir tanto de Genbank como de bancos de datos de proteína NBRF utilizando el programa Wordsearch en el paquete Wisconsin de programas de manipulación de secuencias (Nucleic Acid Res. 12; 387). A continuación se analizaron además varias de las mejores regiones V humanas sobre la base de la semejanza en las regiones de estructura, especialmente en las uniones de la estructura y de las regiones de CDR (ver Figuras 1 y 2).

Se sintetizó de nuevo la región de V<sub>H</sub> CDR-injertada junto con la respectiva secuencia líder del gen humano de la región-v utilizando cuatro oligonucleótidos solapantes con una longitud comprendida entre 100-137 nucleótidos (véase la Figura 3). Se dejó que los oligonucleótidos se hibridaran en combinaciones pareadas y extendidas con ADN polimerasa para generar fragmentos de ADN bicatenario de aproximadamente 200 pb con una región de solapamiento. A continuación se mezclaron los fragmentos y se sometieron a PCR utilizando cebadores en el extremo terminal 3' de un fragmento y el extremo terminal 5' del otro fragmento. El único producto que puede formarse en esta condición es el segmento de V<sub>H</sub> de longitud total. En la Figura 3 se subrayan las secuencias de cebador específicas. Se incluyó un sitio SacI de endonucleasa en el extremo terminal 3' de la secuencia de V<sub>H</sub> con el fin de unirla a un segmento de gen humano de región constante.

Se sintetizó la región de V<sub>L</sub> de CDR-injertada de un modo similar (véase la Figura 4). En este caso se amplificaron los fragmentos iniciales de 200 pb de forma separada y se insertaron en plásmidos separados. Se clonó el fragmento que codifica el extremo terminal amino en un derivado pUC18 tal como un fragmento NcoI-SmaI mientras que el fragmento que codifica el extremo terminal carboxilo se clonó como un fragmento SmaI a HindIII. Posteriormente se combinaron los fragmentos a través del sitio SmaI en la unión. En la Figura 4 se indican los oligonucleótidos. Se incluyó un sitio de HindIII cerca del extremo terminal 3' del segmento del gen con el fin de unirlo a un gen humano C-kappa.

## Ejemplo 3

### Construcción de Vectores para la expresión del 1308F

Se unió el fragmento de NcoI-SacI que representa el V<sub>H</sub> humanizado a un fragmento de SacI-NotI que representa un ADNc c-Gamma I de humano y se insertó en pS 18 (que es pUC 1 8 con los sitios de restricción NcoI y NotI incorporados en la región polienlazadora entre los sitios BamHI y KpnI). A continuación se combinó el gen 1308F-gammal humanizado en un fragmento SacI-NotI con un fragmento de PvuI-NotI de pSJ37 que lleva un sitio de adición poli A y un fragmento PvuI-SacI de pSV2-dhfr-pCMV que contiene el origen SV40 de replicación, un gen dhfr y el promotor temprano inmediato de CMV. El plásmido resultante se designó pSJ60.

Se unió el fragmento NcoI-HindIII que representa el V<sub>L</sub> humanizado a un fragmento HindIII-NoTI que representa un ADNc c-kappa en pus18. A continuación se combinó el gen 1308F-kappa en un fragmento Sall-NotI con un fragmento PvuI-NotI de pSJ37 que lleva un sitio de adición poli A y un fragmento PvuI-Sall de pSV2-dhfr-pCMV, que contiene el origen de replicación SV40, un gen dhfr y el promotor temprano inmediato de CMV. El plásmido resultante se designó pSJ61.

Finalmente se combinaron el pSJ60 y el pSJ61 en un único plásmido que contiene tanto las cadenas ligeras y

pesadas como las señales de expresión. Esto se consiguió por aislamiento de un fragmento PvuI-Bam HI de pSJ61 que lleva la cadena ligera con un fragmento PvuI - BglII de pSJ60 que lleva la cadena pesada para generar pSJ66. (Véase la Figura 5).

#### 5 Ejemplo 4

##### Transfección de células Cos1 con PSJ60 y PSJ61

Las transfecciones se llevaron a cabo de acuerdo con el método de McCutchan y Pagano (J. Nat. Can. Inst. 41: 351-356, 1968) con las siguientes modificaciones. Se mantuvieron las células COS 1 (ATCC CRL1650) en un incubador de CO<sub>2</sub> humidificado al 5% en frascos de cultivo de tejidos de 75 cm<sup>2</sup> en un medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, GIBCO n.º 320-1965) suplementado con suero de bovino fetal al 10% (FBS, GIBCO n.º 200-6140) y L-glutamina 2 mM (BRL n.º 320-5030) y se pasó a una velocidad de escisión de 1:20 cuando las células habían alcanzado la confluencia. 48 horas antes de la transfección se sembraron 5 placas de cultivo de tejido de 100 mm con 1,5 x 10<sup>6</sup> células por placa en 12 ml de DMEM, FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, 1% de penicilina-estreptomina (P-S, GIBCO # n.º 600-5070). El día de la transfección, se combinaron 120 ug de cada uno de los plásmidos pSJ60 y pSJ61, se precipitaron con etanol, y se resuspendieron de forma aséptica en 2,5 ml de solución salina tamponada con Tris. Se añadió gota a gota el ADN resuspendido, con mezcla, a 10 ml de DMEM que contiene 1 mg/ml de DEAE-dextrano (Pharmacia n.º 17-0350-01) y cloroquina 250 uM (Sigma n.º C6628). Se separó el medio de las células COS1 en las placas de 100 mm y se lavaron las células una vez con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS, GIBCO n.º 310-4190), y se añadieron a cada placa 2,5 ml de DMEM suplementado con NuSerum al 10% (Collaborative Research n.º 55000). Se añadieron gota a gota a cada placa 2,5 ml de la mezcla de ADN/DEAE-dextrano/cloroquina, se hicieron girar las placas para mezclar el ADN, y se devolvieron al incubador. Después de 4 horas en el incubador, se aspiró el sobrenadante de las células y se lavaron las células una vez con 5 ml de D-PBS. Se sacudieron las células durante 3 minutos mediante la adición de 5 ml de dimetilsulfóxido al 10% (DMSO) en D-PBS a temperatura ambiente. Se aspiró el DMSO de las células y se lavaron las células con 5 ml de D-PBS. Se añadieron a cada placa 14 ml de DMEM/10% de FBS/L-glutamina 2 mM /1% de P-S y se devolvieron las placas al incubador.

Tres días después de la transfección se separó el medio de las placas, se agruparon y se almacenaron a -20°C. Se recogieron las células, se agruparon y se sembraron en 4 frascos de cultivo de tejido de 150 cm<sup>2</sup>, dos con 40 ml de DMEM/10% de NuSerum y dos con 40 ml de DMEM/10% de FBS/L-glutamina 2 mM. Se recogió el medio y las células se realimentaron los días 7, 10, y 14. De este modo se acumularon un total de 125 ug de anticuerpo 1308F humanizado en 310 ml de medio suplementado con FBS y 85 ug en 240 ml de medio suplementado con NuSerum.

#### Ejemplo 5

##### Transfecciones de células COS 1 con PSJ66

48 horas antes de la transfección se sembraron 5 placas de cultivo de tejido de 100 mm con 1,5 x 10<sup>6</sup> células por plato en 12 ml de DMEM, 10% de FBS, L-glutamina 2 mM, 1% de penicilina-estreptomina (P-S, GIBCO n.º 600-5070). El día de la transfección, se precipitaron con etanol 125 ug del plásmido pSJ66 y se resuspendieron de forma aséptica en 1,0 ml de solución salina tamponada con Tris. Se añadió gota a gota el ADN resuspendido, con mezcla, sobre 4,0 ml de DMEM que contiene 1 mg/ml de DEAE-dextrano (Pharmacia n.º 17-0350-01) y 250 uM de cloroquina (Sigma n.º C6628). Se separó el medio de las células COS1 en las placas de 100 mm y se lavaron las células una vez con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS GIBCO n.º 310-4190), y se añadieron a cada placa 2,5 ml de DMEM suplementado con 10% de NuSerum (Collaborative Research n.º 55000). Se añadieron gota a gota 2,5 ml de la mezcla ADN/DEAE-dextrano/cloroquina a cada placa, se hicieron girar las placas para mezclar el ADN, y se devolvieron al incubador. Después de 4 horas en el incubador, se aspiró el sobrenadante de las células y se lavaron las células una vez con 5 ml de D-PBS. Se sacudieron las células durante 3 minutos mediante la adición de 5 ml de dimetilsulfóxido al 10% (DMSO) en D-PBS a temperatura ambiente. Se aspiró el DMSO de las células y se lavaron las células con 5 ml de D-PBS. Se añadieron a cada placa 14 ml de DMEM/10% de FBS/L-glutamina 2 mM /1% de P-S y se devolvieron las placas al incubador.

Tres días después de la transfección se separó el medio de las placas, se agrupó, y se almacenaron a -20°C. Se recogieron las células, se agruparon y se sembraron en 4 frascos de cultivo de tejido de 150 cm<sup>2</sup>, dos con 40 ml de DMEM 10% de NuSerum y dos con 40 ml de DMEM/10% FBS/L-glutamina 2 mM. Se recogió el medio y las células se realimentaron los días 7, 10, y 14. De este modo se acumuló un total de 190 ug de anticuerpo 1308F humanizado en 310 ml de medio suplementado con FBS y 120 ug en 240 ml de medio suplementado con NuSerum.

Se determinó la concentración de anticuerpo humanizado 1308F segregado de las células Cos1 en el medio utilizando un ELISA de captura. Se usaron placas de 96 pocillos recubiertas con IgG Fc anti-humana de cabra para capturar el anticuerpo humanizado. A continuación se utilizó la IgG completa anti-humana de cabra conjugada con peroxidasa desarrollada con un sustrato cromogénico para detectar el anticuerpo unido. Se utilizó una preparación de IgG1/kappa humana purificada para calibrar el ensayo.

**Ejemplo 6****Neutralización de RSV con 1308F humanizado**

## 5 MÉTODOS:

Se neutralizó el RSV tanto con 1308F humanizado del sobrenadante de células Cos como de anticuerpo monoclonal de murino de 1308F purificado. Esto se llevó a cabo por incubación de 50 unidades de formación de placas de RSV con series de diluciones de 2 veces de anticuerpo durante 1 hora a 37°C. Se infectaron las monocapas confluentes de células Hep2 en paneles de 24 pocillos con 100 µl de virus tratado con anticuerpo, virus control no tratado, y controles infectados de forma simulada. Se incubaron durante 1,5 horas a 37°C, se humidificaron, y 5% de CO<sub>2</sub> y se revistieron con 1,5 ml de EMEM, 1% de FBS, y 1% de metil celulosa. Se fijaron las células y se tiñeron con glutaldehído y violeta de cristal el día 4. Se contabilizaron las placas en pocillos triplicados y se representaron como porcentaje de neutralización. Los resultados mostrados en la Figura 6 indican que tanto el anticuerpo monoclonal 1308F de murino purificado como el anticuerpo monoclonal 1308F humanizado a de 5 a 10 ng por pocillo proporcionaron reducciones similares del 50% en las placas de RSV.

**Ejemplo 7**20 **Generación de un anticuerpo 1129 de sitio A CDR-injertado**

Se purificó el poli-A+ ARN a partir de un lisado de 2 x 10<sup>7</sup> células de hibridoma de murino 1129 utilizando oligo-dt celulosa. Se hizo la primera hebra de ADNc a partir de 1 ug de pA+ ARN utilizando cebadores de hexámero al azar y transcriptasa inversa de AMV 1ug pA+ ARN, Tris-HCl 50 mM pH 8,5, Mg<sub>2</sub>Cl 8 mM, KCl 30 mM, 1 mM de ditionitriol, dNTP 1 mM, 25 unidades de inhibidor de ribonucleasa de placenta, 33 uM de hexámero al azar y 10 unidades de transcriptasa inversa de AMV durante una hora a 42°C. Se amplificó el ADNc de la región 1129 VL por PCR utilizando oligonucleótidos SJ41 y SJ11, véase la Tabla 1. El ADNc de la región 1129 VH fue amplificado de forma similar utilizando oligonucleótidos SJ42 y SJ10, véase la Tabla 1.

30 Tabla 1

SJ10  
AGCGGATCCAGGGGCCAGTGGATAGAC

SJ11  
GATGGATCCAGTTGGTGCAGCATC

SJ41  
CACGTGACATTCAGCTGACCCAGTCTCCA

SJ42  
CGGAATTCAGGTIIAICTGCAGIAGTC(A,T)GG  
{I = desoxiinosina }

SJ53  
CCCAAGCTTGGTCCCCCTCCGAACGTG

SJ154  
GGCGTCTGACTCACCATGGACATGAGGGTCC (C/T) CGCRCAGC

SJ155 (H1129L CDR 1)  
GTCACCATCACTTGCAAGTGCCAGCTGAGTGTAGGTTACATGCACTGGTACCAGCAG

SJ157 (H1129L CDR 3)  
GCAACTTATTACTGCTTTTCAGGGGAGTGGGTACCCATTCACGTTCCGAGGGGGG

SJ168  
GTGACCAACATGGACCCTGCTGATACTGCCAC

SJ169  
CCATGTTGGTCACTTTAAGGACCACCTGG

SJ170  
CCAGTTTACTAGTGTTCATAGATCAGGAGCTTAGGGGC

SJ171  
TGACACTAGTAAACTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGG

Condiciones de la PCR



0,5 ul del ADNc de la primera hebra, Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, Mg<sub>2</sub>Cl 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, 0,001% de gelatina, 1 uM de cada cebador, 1 ng del patrón de ADN y 2,5 μ de ADN polimerasa AmpliTaq™ (Perkin Elmer - Cetros). 94° 1 minuto, 55° 2 minutos, 72° 2 minutos en un termociclador 480 durante 25 ciclos. A continuación se extrajo/extrajeron el/los fragmento(s) de ADN resultante(s) una vez con fenol/cloroformo (1/1), se precipitaron con 2,5 volúmenes de EtOH, se resuspendieron en el tampón de endonucleasa de restricción apropiado y se digirió con endonucleasas de restricción para producir extremos terminales cohesivos para la clonación. A continuación, se separaron los fragmentos resultantes por electroforesis en un gel al 1% de agarosa. Después de tinción del gel con bromuro de etidio se escindieron los fragmentos y se purificó a partir de la agarosa por congelación y extracción en presencia de fenol.

A continuación los fragmentos fueron digeridos con las endonucleasas de restricción EcoRI y BamHI y clonados en el plásmido pUC18. A continuación, se secuenciaron las inserciones por el método de terminación de la cadena de didesoxinucleótido utilizando la ADN polimerasa T7 modificada (Sequenase, US Biochemical).

Se compararon las secuencias traducidas con las secuencias de proteína de anticuerpo humanas. Se descubrió que el VL era el más homólogo a la cadena ligera K102 y se descubrió que el VH era el más homólogo a la región de Cor VH. A continuación se modeló la región 1129 Fv por sustitución de los residuos de la secuencia del 1129 VL y VH en las coordenadas de los residuos correspondientes en la estructura del cristal del anticuerpo de MCPC603. Se identificaron los residuos como integrantes de la estructura plegada o se expusieron a disolvente por inspección visual del modelo.

Se dejaron varios residuos que eran integrantes y que eran diferentes en las secuencias del ratón y humanas como el residuo de ratón con el fin de mantener la integridad del Fv y de este modo el sitio de unión. Dichos residuos eran 31, 93, 113 y 116 en el VH y 47 en la región del VL. Las secuencias resultantes se muestran en las figuras 7 y 8.

Se construyó el VH de 1129 humanizado diseñado utilizando los oligonucleótidos sintéticos SJ147-SJ153 (Figura 9) que se combinaron utilizando PCR. Los productos de esta PCR fueron digeridos a continuación con NcoI y SacI y se clonaron en el vector del plásmido pSJ40 que es un derivado de pUC18 en el que un segmento lacZ1 fuera de la estructura se restituye en la estructura como una fusión a un segmento de la región en la estructura V cuando dicho segmento se inserta como un fragmento NcoI-SacI. Se agrupó un plásmido que contiene una inserción en el que las mutaciones 5 se agruparon en una única región de 50 pb se sometió a continuación a la reparación de estos cambios utilizando PCR recombinante y los cebadores SJ168 y SJ169, véase la Tabla 1.

Se generó el VL por mutagénesis dirigida al sitio del gen de cadena ligera humanizado 1308F. Los oligonucleótidos SJ155, véase la Tabla 1, (CDR1), y SJ157 (CDR3) se utilizaron para mutagenizar de forma separada el gen de H1308L. Se llevó a cabo la mutagénesis utilizando ADN polimerasa T7 en moldes de ADN monocatenario que contienen uracilo generados en la cepa BW313 (dut-, ung-) y subsecuentemente transformados en la cepa DHS de E. coli (dut+, ung+). Se combinaron los dos mutantes y se introdujo el CDR2 por PCR recombinante utilizando oligonucleótidos SJ170, SJ154, véase la Tabla 1, (extremo terminal 5') y SJ171, SJ53, véase la Tabla 1, (extremo terminal 3'). Se situaron los genes VH y VL CDR-injertados en el pSJ60 (véase la Ejemplo 3) y pSJ61 (véase la Ejemplo 3), respectivamente como fragmentos NcoI-SacI en lugar de los segmentos de la región V de H1308F dando lugar a los plásmidos pSJB1 y pSJ105. Además los segmentos de ADNc VH y VL de murino fueron unidos de forma similar al C-Gamma1 y Ckappa humano respectivamente para generar vectores de expresión pSJ75 y pSJ84.

## Ejemplo 8

### Expresión transitoria de Hu129

Se mantuvieron las células COS1 (ATCC CRL1650) en un incubador de CO<sub>2</sub> humidificado al 5% en frascos de cultivo de tejido de 75 cm<sup>2</sup> en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, GIBCO n.º 320-1965) suplementado con suero de bovino fetal al 10% (FBS, GIBCO n.º 200-6140) y L-glutamina 2 mM (GIBCO n.º 320-5030) y pasados a una relación de escisión de 1:20 justo antes de alcanzar la confluencia.

Las transfecciones se llevaron a cabo de acuerdo con el método de McCutchan y Pagano (J. Nat. Can. Inst. 41: 351-356, 1968) con las siguientes modificaciones. Veinticuatro horas antes de la transfección se sembraron placas de cultivo de tejidos de 100 mm (Corning n.º 25020) con 2 x 10<sup>6</sup> células COS1 por placa en 14 ml de DMEM, 10% de FBS, L-glutamina 2 mM. El día de la transfección se combinaron 10 ug del plásmido de cadena pesada Hu1129 (pSJ81, del ejemplo 7) con 10 ug del plásmido pSJ105 de cadena ligera Hu1129 kappa, del Ejemplo 7, se precipitó con etanol el ADN y se suspendió de nuevo de forma aséptica en 1,0 ml de solución salina tamponada Tris. Se añadió el ADN resuspendido, con mezcla, a 4,0 ml de DMEM que contienen 1 mg/ml de DEAE-dextrano (Farmacia n.º 170350-01) y 250 uM de cloroquina (Sigma n.º C6628). Se separó el medio de las placas de células de COS1, se lavaron las monocapas de células una vez con 10 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS, GIBCO n.º 310-4190), y 2,5 ml de DMEM suplementado con NuSerum al 10% (Collaborative Research n.º 55000) y se añadió L-glutamina 2 mM a cada placa. Se añadieron gota a gota a cada placa 2,5 ml de la mezcla de ADN/DEAE-dextrano-cloroquina, se hicieron girar las placas para mezclar el ADN, y se devolvieron al incubador. Después de un periodo de adsorción del ADN de ocho horas se retiraron las placas del incubador y se aspiró el

sobrenadante de las placas. Las células se sacudieron mediante la adición de 5 ml de DMSO al 10% en D-PBS por placa durante 3 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se aspiró el DMSO de las células y las células se lavaron una vez con 5 ml de D-PBS. Se añadieron a cada placa 15 ml de DMEM, NuSerum al 10%, L-glutamina 2 mM (medio de producción) y las placas se devolvieron al incubador.

5 Setenta y dos horas después de la transfección se recogió el medio acondicionado de las placas y se almacenó a -20°C, y se añadieron 15 ml del medio de producción a las placas y las placas se devolvieron al incubador. Noventa y seis horas más tarde se recogió el medio de las placas y se almacenó a 20°C.

## 10 Ejemplo 9

### Quantificación del Hul129

15 Se llevó a cabo la cuantificación del anticuerpo IgG1 Hu1129 segregado en el medio por las células COS1 utilizando un ELISA tipo sándwich. En resumen, se recubrieron Inmunoplasmas Nunc Maxisorp (Nunc n.º 439454) con 50 µl/pocillo de 0,5 µg/ml de Fc IgG anti-humano de cabra (Cappel n.º 55071) en bicarbonato sódico 0,1 M pH 9,6 durante 3 horas a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos tres veces con fosfato sódico 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, 0,1% de Tween 20 (PBS-T). Se bloqueó la unión de la proteína no específica a la placa por tratamiento de los pocillos con 200 µl/pocillo de leche descremada en polvo al 3% (p/v) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Un estándar de IgG1 kappa humano purificado (Sigma n.º 1-3889) se llevó a 100 ng/ml en PBS-T y se diluyó de forma seriada de 1:2 a 1,56 ng/ml, y se añadieron 50 µl de cada para duplicar los pocillos de la placa de ensayo. Se diluyeron los sobrenadantes de células COS1 en PBS-T y se añadieron a la placa muestras duplicadas de 50 µl. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente se evacuaron los pocillos y se lavaron tres veces con PBS-T. Para detectar la presencia de anticuerpo Hul 129 unido, se diluyó IgG anti-humano de cabra purificado de afinidad conjugada de la peroxidasa de rábano picante (molécula completa, Cappel n.º 3601-0081) 1:1 000 en PBS-T y se añadieron 50 µl a cada pocillo de la placa de ensayo y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Se lavó la placa tres veces con PBS-T y se añadieron a cada pocillo 100 µl del sustrato cromogénico TMBBlue (TSI n.º TM102). Se incubó la placa a temperatura ambiente en la oscuridad durante diez minutos y se detuvo la reacción mediante la adición de 50 µl por pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,5 M. Se leyó la placa a 450 nm utilizando un lector de microplacas Vmax de Molecular Devices, y se realizaron los análisis de los datos utilizando un software Softmax (Molecular Devices) instalado en un ordenador IBM P/S2 modelo 80.

35 Durante las primeras setenta y dos horas de producción, las células COS1 produjeron 0,06 µg/ml de Hu1129, para un total de 0,9 µg. En las siguientes noventa y seis horas de producción las células COS1 produjeron 0,99 µg/ml de Hu1129, para un total de 14,85 µg.

## Ejemplo 10

### Ensayo de Unión de Hul129

40 Se llevaron a cabo los ensayos del Hul129 en un ELISA de captura, esencialmente del mismo modo que para el ELISA de cuantificación, pero con los siguientes cambios. Las placas se recubrieron con el anticuerpo Mul 331 a 0,5 µg/pocillo, los pocillos se bloquearon con leche desgrasada al 3% en PBS-T, y se añadieron 50 µl de lisado de células HEP2 infectado con RSV a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. El resto del ensayo se llevó a cabo del mismo modo que para el ensayo de cuantificación empezando con la adición de muestras diluidas a los pocillos. Los resultados se analizaron como una representación recíproca doble de DO respecto a la concentración de anticuerpo a partir del que se determinó un Kd aparente para la molécula de H1129 de 0,7 nM en comparación con los 10 nM para el anticuerpo kappa MI129HuGamma1.

50 Los ensayos de neutralización de RSV en el anticuerpo H1129 y ch1129 se llevaron a cabo de acuerdo con el procedimiento siguiente:

1. Desenvolver las placas de cultivo celular Costar de 96 pocillos en una cabina.

55 2. Calentar el Medio de Crecimiento (GM) a 37°C.

3. Descongelar las células MA104 hasta 37°C. Diluir hasta ~ 150.000 células por ml con GM. Mezclar las células y dispensar 200 µl por pocillo.

60 4. Cultivar las células a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, y humedad durante toda la noche antes de la infección.

5. Diluir la reserva de RSV hasta 10.000 pfu por ml en el medio de mantenimiento (MM).

## ES 2 442 460 T3

6. Mezclar un volumen igual de anticuerpo diluido en MM con un volumen igual de RSV diluido. Incubar a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, y humedad durante 1,0 h antes de la infección.
- 5 7. Infectar los pocillos replicados de células MA104 con 200 µl de la mezcla de anticuerpo y virus. Infectar los pocillos replicados con virus y controles infectados de forma simulada.
8. Envolver las placas en celofán e incubar a 37°C, 95% de humedad, y 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 días.
- 10 9. ELISA para el RSV: Aspirar cada pocillo; añadir 100 µl de acetona del 80%/PBS (v/v) e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
10. Aspirar cada pocillo y secar al aire durante 30 minutos en la rejilla de una cabina de flujo laminar.
- 15 11. Lavar 4 veces con PBS, 0,05% de Tween 20.
12. Añadir 100 µl de anticuerpo monoclonal para la proteína F del RSV para cada pocillo. Incubar durante 1,0 h a 37°C.
- 20 13. Lavar 4 veces con PBS, 0,05% de Tween 20.
14. Añadir 100 µl de conjugado de peroxidasa de rábano picante- suero de cabra de anticuerpo de anti-murino a cada pocillo. Incubar durante 1,0 h a 37°C.
- 25 15. Lavar 4 veces con PBS, 0,05% de Tween 20.
16. Añadir 100 µl de una mezcla recién preparada 1:1 de ABTS y peróxido a cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente hasta que la densidad óptica (405 nm) del virus control sea de 5 a 10 veces la de los controles infectados de forma simulada.

30 APÉNDICE:

Medio de crecimiento (GM): Medio Esencial Mínimo (Eagle) con BSS de Earle,

35 glutamina 2 mM

Aminoácidos no esenciales de Eagle 0,1 mM final,

Suero de bovino fetal al 10% (v/v),

40

Penicilina 50 unidades/ml,

Estreptomicina 50 mcg/ml

45 Medio de mantenimiento (MM): tal como anteriormente con suero reducido entre el 1 y el 2%.

Reservas de células MA104: se hicieron crecer en frascos T150 con Medio de Crecimiento. Las reservas se congelan a  $3 \times 10^6$  células por vial de 1,8 ml en DMSO al 10% y Medio de Crecimiento. Se almacenan en un refrigerador de LN<sub>2</sub>.

50

Reservas de RSV: se hicieron crecer en MA104 (riñón de mono) o células Hep 2 en frascos T150. Se añaden ~ 0,2

ml (~ 100.000 pfu) de reserva de virus por confluyente T150. Adsorción durante 1,0 h a temperatura ambiente. A

continuación se añaden 20 ml del medio de mantenimiento con un 1% de suero de bovino fetal. Se incuba 4-5 días a 37°C. Se recogen las células justo antes del 100% cpe por rozamiento. Se agitan las células; se separa todo excepto 10 ml de sobrenadante. Se congela (baño de hielo seco-etanol) los sedimentos de células descongeladas, se agita, se recongela, y se almacena la reserva de virus en el refrigerador de LN<sub>2</sub>.

55

Tampón de anticuerpo de ELISA: PBS, 0,05% de Tween 20 (p/v), suero de cabra al 2,0% (v/v) y gelatina al 0,5%

(p/v).

Anticuerpo de proteína de RSV F: proteína de fusión Chemicon Mab 858-1 anti-RSV diluida ~ 1: 5000 en Tampón de

Anticuerpo de ELISA.

5 Suero anti-murino: peroxidasa de rábano picante Fisher conjugada a IgG anti-ratón de cabra (específica de cadena pesada) diluida ~ 1: 4000 en Tampón de Anticuerpo de ELISA.

10 Los resultados se muestran en la Figura 10, e indican que 25 ng/ml consiguieron un 50% de neutralización en este ensayo mientras que se requirieron 45 ug/ml del anticuerpo chi129 para el 50% de neutralización en este experimento. Con una serie de 6 ensayos separados, el valor promedio de neutralización para el 50% fue de 17 ng/ml. Como control y para comparar la potencia también se ensaya una preparación de IgG humana policlonal preparada a partir del plasma de individuos con valoraciones de neutralización altas para el RSV. Esta preparación, llamada RSVig (lote n.º 4), dio un valor promedio del 50% de neutralización promedio de 2,3 ug/ml en 3 experimentos. De este modo, el H1129 es 100 veces más potente en este ensayo como la preparación policlonal enriquecida.

### Ejemplo 11

#### 20 **Análisis Cinético de Mab de RSV Humanizado por BIAcore™**

Se estudió la cinética de interacción entre Mab de RSV humanizado y la proteína RSV F por resonancia de plasmón de superficie utilizando un biosensor Pharmacia BIAcore™. Un baculovirus recombinante que expresa una proteína F C-terminal truncada proporcionó una abundante fuente de antígeno para los estudios cinéticos. Se enriqueció el sobrenadante, que contenía la proteína F segregada, aproximadamente 20 veces por cromatografía sucesiva en columnas de concanavalina A y Q-sefarosa. Se dializaron las fracciones agrupadas frente a citrato sódico 10 mM (pH 5,5), y se concentró hasta aproximadamente 0,1 mg/ml. Se acopló por la amina una alícuota de la proteína F (100 ml) al chip sensor BIAcore. La cantidad inmovilizada dio aproximadamente 2000 unidades de respuesta (R<sub>max</sub>) de señal cuando se saturó con H1129 o bien con H1308F. Esto indicó que hubo un número igual de sitios antigénicos "A" y "C" en la preparación de proteína F después del procedimiento de acoplamiento. Dos Mab irrelevantes no relacionados (RVFV 4D4 y CMV H758) no mostraron ninguna interacción con la proteína F inmovilizada. Un estudio cinético típico implicó la inyección de 35 ml de Mab a concentraciones variables (25-300 nM) en tampón de PBS que contiene 0,05% de Tween-20 (PBS/Tween). Se mantuvo la velocidad de flujo a 5 ml/min, dando una fase de unión de 7 min. Después de la inyección de Mab, se intercambié el flujo con tampón de PBS/Tween durante 30 min para la determinación de la velocidad de disociación. Se regeneró el chip sensor entre ciclos con un pulso de 2 min de HCl 10 mM. La etapa de regeneración causó una pérdida mínima de capacidad de unión de la proteína F inmovilizada (4% de pérdida por ciclo). Esta pequeña disminución no cambió los valores calculados de las constantes de velocidad para la unión y disociación.

40 Se calculó la afinidad de los diferentes Mab para la unión de la proteína F a partir de la relación de la constante de velocidad de primer orden para la disociación con respecto a la constante de velocidad de segundo orden para la unión ( $k_d = k_{dis}/k_{asoc}$ ). Se calculó el valor para  $k_{asoc}$  en base a la siguiente ecuación de velocidad:

$$(1) \frac{dR}{dt} = k_{asoc} [Mab] R_{m\acute{a}x} - (k_{asoc} [Mab] + k_{dis}) R$$

45 en donde R y R<sub>max</sub> son las unidades de respuesta al tiempo t e infinito, respectivamente. Una representación de dr/dt como una función de R da una pendiente de  $(k_{asoc}[Mab] + k_{dis})$ . Ya que estas pendientes están linealmente relacionadas con la [Mab], el valor de  $k_{asoc}$  puede ser derivado de una nueva representación de las pendientes respecto [Mab]. La pendiente de la nueva línea es igual a  $k_{asoc}$ . Aunque el valor de  $k_{dis}$  puede ser extrapolado a partir de Y-intercepción, se determinó un valor más ajustado por medición directa de  $k_{dis}$ . Siguiendo la fase de inyección del Mab, el tampón PBS/ Tween fluye a través del chip sensor. A partir de este punto, [Mab] = 0. La ecuación (1) se reduce de este modo a:

$$(2) \frac{dR}{dt} = k_{dis} \text{ ó } \frac{dR}{R} = k_{dis} dt$$

55 La integración de la ecuación (2) da:

$$(3) \ln (R_0/R_t) = k_{dis} t$$

en donde  $R_0/R_1$  son las unidades de respuesta al tiempo 0 (inicio de la fase de disociación) y  $t$ , respectivamente. Por último, la representación de  $\ln (R_0/R_1)$  como una función de  $t$  da una pendiente de  $k_{dis}$ .

5 Constantes Cinéticas para Mab de RSV

$(k_d/k_a)$ Mab	$k_a$ (asoc) $M^{-1}s^{-1}$	$k_d$ (dis) $s^{-1}$	$t_{1/2\#}$ (h)	$K_d$ nM
CH1129	$5,0 \times 10^4$	$7,5 \times 10^{-5}$	2,6	1,5
H1129	$4,9 \times 10^4$	$6,9 \times 10^{-5}$	2,8	1,4
M1129	$3,5 \times 10^4$	$4,0 \times 10^{-4}$	0,48	11,4
M13 08F	$3,5 \times 10^4$	$3,8 \times 10^{-5}$	5,1	1,1
H130SF	$2,2 \times 10^4$	$5,5 \times 10^{-5}$	3,5	2,5

Ejemplo 12

10 **Protección *in vivo* de ratas del algodón con Mab humanizados**

Se ensayó cada uno de H1129 y H1308F para determinar la capacidad de reducir la infección en el tejido del pulmón de ratas del algodón cuando se administraron por vía intramuscular. Se anestesiaron ratas del algodón (*S. hispidus*, 4 animales por grupo, peso promedio de 100 gramos) con metoxiflurano y se les administró 0,1 ml de solución de anticuerpo, dando lugar a dosis de 5 mg/kg, 1,67 mg/kg y 0,56 mg/kg respectivamente) por inyección intramuscular. Se inyectó a los animales control seroalbúmina bovina. Un día más tarde, se anestesió de nuevo a los animales y se les administró de forma intranasal una instilación de  $10^{5.0}$  unidades formadoras de placas (PFU) de la cepa Long de RSV. Cuatro días después de la administración del virus, todos los animales se sacrificaron por asfixia con dióxido de carbono. Se separaron los pulmones y se homogenizaron en 10 partes (p/v) de sal equilibrada de Hanks. Se cuantificó la suspensión resultante para determinar el contenido de virus por ensayo de placa.

Los resultados de estos experimentos, mostrados a continuación, indican que ambos H1129 y H1308F son efectivos en la reducción de las valoraciones víricas en los pulmones de ratas del algodón cuando se inyectaron un día antes de la administración de RSV.

Anticuerpo	Dosis inyectada	Valoración de virus (pfu/g) en el tejido pulmonar
Ninguno		$6,3 \times 10^4$
1129 humanizado	5 mg/kg	$1,2 \times 10^2$
	1,67 mg/kg	$1,4 \times 10^2$
	0,56 mg/kg	$5,7 \times 10^3$
1308F de murino	5 mg/kg	$6,8 \times 10^3$
	1,67 mg/kg	$1,3 \times 10^4$
	0,56 mg/kg	$2,6 \times 10^4$
1306F humanizado	5 mg/kg	$2,7 \times 10^3$
	1,67 mg/kg	$1,3 \times 10^4$
	0,56 mg/kg	$2,1 \times 10^4$

Referencias

1. Hall, C.B., Douglas R.G., Geiman, J.M. et al., N. Engl. J. Med. 293:1343, 1975.  
 2. Hall, C.B., McBride, J.T., Walsh. E.E. et al., N. Engl. J. Med. 308:1443, 1983.  
 3. Hall, C.B., McBride. J.T., Gala, C.L. et al., JAMA 254:3047, 1985.  
 4. Wald, E.R., et al., J. Pediat. 112:154, 1988.

5. Kapikian, A.Z., Mithcell, R.H., Chanock, R.M. et al., Am. J. Epidemiol. 89:405, 1969.
6. Prince, G.A., Hemming, V.G., Horswood, R.L. et al., Virus Res. 3:193, 1985.
- 5 7. Hemming, V.G., Prince, G.A., Horswood, R.L. et al., J. Infect. Dis. 152:1083, 1985.
8. Wright, P.F., Belshe, R.B., et al., Infect, Immun. 37:397, 1982.
9. Conrad, D.A., Christenson, J.C., et al., Pediatr. Infect. Dis. J. 6:152, 1987.
- 10 10. LoBuglio, A.F., Wheeler, R.L., Trang, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:4220, 1989.
11. Steplewski, Z., Sun, L.K., Shearman, C.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:4852, 1988.
- 15 12. Boulianne, G.L., Hozumi, N., Shulman, M.J. Nature. 312:643, 1984.
13. Sun, L.K., Curtis, P., Rakowicz-Szulczynska, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84:214, 1987.
14. Liu, A.Y., Mack, P.W., Champion, C.I., Robinson, R.R., Gene 54:33, 1987.
- 20 15. Morrison, S.L., Johnson, M.J., Hersenber, L.A., Oi, V.T. Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851, 1984.
16. Morrison, S.L. Science 229:1202, 1985.
- 25 17. Sahagan, B.G., Dorai, H., Saltzgaber-Muller, J. et al., J. Immunol. 137:1066, 1986.
18. Taked. S., Naito, T., Hama, K., Noma, T., Honjo, T., Nature 314:452,, 1985.
19. Carson, D.A., Freimark, B.D., Adv. Immunol. 38:275, 1986.
- 30 20. Beeler, J.A., et al., J. Virol. 63:2941-2950, 1989.
21. Coelingh, et al., Virology,, 143:569-582, 1985.

35 **Lista de secuencias**

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: MEDIMMUNE, INC.

40 35 West Waskins Mill Road Gaithersburg, MD 20878, US

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Anticuerpos quiméricos humano-murinos frente al virus respiratorio sincitial

45 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 42

(vi) DIRECCIÓN POSTAL:

(A) DESTINATARIO: LOUIS, PÖHLAU, LOHRENTZ & SEGETH

50 (B) DOMICILIO: Merianstrasse 26

(C) LOCALIDAD: Nürnberg

55 (D) PAÍS: Alemania

(E) CÓDIGO POSTAL: 90409

(v) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:

60 (A) TIPO DE MEDIO: DISQUETE DE 3,5

(B) ORDENADOR: COMPAQ

65 (C) SISTEMA OPERATIVO: MS-DOS

(D) SOFTWARE: WORD 4.0

(vi) SOLICITUD DE PATENTE EN TRÁMITE:

5 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: EP 95928353.2

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 9 de agosto de 1995

(C) CLASIFICACIÓN: 6

10 (vi) SOLICITUD DE PATENTE ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US95/10053

15 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 9 de agosto de 1995

(vi) SOLICITUD DE PATENTE ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/290.592

20 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 15 de agosto de 1994

(viii) AGENTE:

25 (A) NOMBRE: Wolfgang SEGETH

(B) NÚMERO DE REGISTRO:

(C) NÚMERO DE REFERENCIA: 33.773ep/40/hs

30 (ix) COMUNICACIÓN:

(A) NÚMERO DE TELÉFONO: 0911/ 510 360

35 (B) NÚMERO DE FAX: 0911/ 511 342

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 1

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40 (A) LONGITUD: 27 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

45 (C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 1

AGCGGATCCA GGGGCCAGTG GATAGAC 27

55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 2

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 NUCLEÓTIDOS

60 (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

65 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 2

5 TGGATGGTGG GAAGATG 17

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 15 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

15 (C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

20

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 3

GGCCAGTGGG TAGAC 15

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 4

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30

(A) LONGITUD: 16 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

35 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 4

40

TACAGTTGGT GCAGCA 16

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 5

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

50

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 5

GATGGATCCA GTTGGTGCAG CATC 24

60

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 6

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

65 (A) LONGITUD: 30 NUCLEÓTIDOS



(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

5 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 6

10 CACGTCGACA TTCAGCTGAC CCAGTCTCCA 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 7

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

20 (C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 7

30 CGGAATTCAG GTNNANCTGC AGNAGTCWGG 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 8

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35 (A) LONGITUD: 28 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

40 (C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 8

CCCAAGCTTG GTCCCCCTC CGAACGTG 28

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 9

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

55 (C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 9

65 GCGTCGACT CACCATGGAC ATGAGGGTCC YCGCTCAGC 39

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5 (A) LONGITUD: 57 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

10 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 10

GTCACCATCA CTTGCAAGTG CCAGCTGAGT GTAGGTTACA TGCACTGGTA CCAGCAG 57

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 11

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 54 NUCLEÓTIDOS

25 (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

30 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 11

35 GCAACTTATT ACTGCTTCA GGGGAGTGGG TACCCATTCA CGTTCGGAGG GGGG 54

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 12

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40 (A) LONGITUD: 32 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

45 (C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 12

GTGACCAACA TGGACCCTGC TGATACTGCCAC 32

55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 13

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60 (A) LONGITUD: 29 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

65 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 13

5 CCATGTTGGT CACTTAAGG ACCACCTGG 29

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 14

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 37 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

15

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

20

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 14

CCAGTTTACT AGTGTCATAG ATCAGGAGCT TAGGGGC 37

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30

(A) LONGITUD: 37 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

35

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 15

40

TGACACTAGT AACTGGCTT CTGGGGTCCC ATCAAGG 37

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 16

45

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 97 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

50

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

55

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 16

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 17

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 117 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

10 (C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 17

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

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 18

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:





(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 107 AMINOÁCIDOS

5 (B) TIPO: AMINOÁCIDO

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 21

```

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

```

15 Ile Lys

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 22

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20 (A) LONGITUD: 117 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

25 (C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 22

```

CCATGGACTG GACCTGGAGG CTCCTCTGCT TGCTGGCTGT AGCACCAGT GCCACTCCC   60
AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGAGCTGAGG TGAAGAAGCC TGGAGCCTCA GTGAGG   117

```

35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 23

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40 (A) LONGITUD: 120 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 23

**CACTTCTTGG GACCTGGGAG TCACTTCCAA AGGACGTTCC GTAGACCTAA GTTGTAAATC 60**  
**CTGATGATGT AAATGACCCA CGCTGTCCGA GGACCTGTTC CCGAGCTCAC CTACCCCAAC 120**

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 24

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 119 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

20

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 24

**GGGCTGGAGT GGATGGGTTG GATTGACCCT GAGAATGGTA ATACTGTGTT TGACCGAAGT 60**  
**TCCAGGGCAG AGTCACCATG ACCAGGGACA CGTCCACGAG CACAGTCTAC ATGGAGCTG 119**

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 137 NUCLEÓTIDOS

35 (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

40

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 25

**GGTGTCTGTG TCAGATGTAC CTCGACTCGT CGGACTCTAG ACTTCTGTGC CGGCACATAA 60**  
**TGACACGCAT GATGCCATGT TCGAGGAAC TGAAGACCCC GGTTCGTTGG TGAGAGTGTG 120**  
**ACTCGAGTAT TCCTAGG 137**

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 26

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

50

(A) LONGITUD: 106 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

55 (C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL



(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 26

5 **CCATGGACAT GAGGGTCCC GCTCAGCTCC TGGGGCTCCT GCTGCTCTGG CTCCCAGGTG 60**  
**CCAAATGTGA TATCCAGATG ACCCAGTCTC CTCCACCCT GTCTGC 106**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 27

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 107 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

15

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

20

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 27

**GTCCAGGAA GGTGGGACAG ACGTAGACAT CCTCTGTCTC AGTGGTAGTG AACGTCCCGC 60**  
**TCAGTCTCTG AATTATCCAT AAATTTGACC ATGGTCTCT TTGGCC 107**

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 28

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30

(A) LONGITUD: 107 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

35

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 28

40

**GAAAGCCCT AAGCTCTGA TCTATCGTGC AAACAGATTG GTAGATGGGG TCCCATCAAG 60**  
**GTTCAGCGGC AGTGGATCTG GGACAGAAIT CACTCTCACC ATCAGCA 107**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 29

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 116 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

50

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

55

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 29

GTCTTAAGTG AGAGTGGTAG TCGTCGGACG TCGGACTACT AAAACGTTGA ATAATGACGG 60  
 ATGTCAAAGT ACTCAAAGGC ATGTGCAAGC CTCGCCCTG GTTCGAACCT TATTTT 116

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 30

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 123 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

10 (C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 30

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

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 31

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 120 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

30 (C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 31

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

- 5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 32
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 120 AMINOÁCIDOS
- 10 (B) TIPO: AMINOÁCIDO
- (C) TIPO DE CADENA:
- 15 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 32
- 20



(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 106 AMINOÁCIDOS

5 (B) TIPO: AMINOÁCIDO

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 34

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

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 35

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 106 AMINOÁCIDOS

25 (B) TIPO: AMINOÁCIDO

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 35



(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 89 NUCLEÓTIDOS
- (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
- (C) TIPO DE CADENA: SENCILLA
- 10 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 38

**GCGCCTTECC TGGGGGCTGA CGAATCCAGC CTACACTCAT ACCAGAAGTG CTCAGTGAAA 60**  
**ACCCAGAGAA GGTGGAGGTC AGTGTGAGG 89**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 39

- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 70 NUCLEÓTIDOS
- 25 (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
- (C) TIPO DE CADENA: SENCILLA
- (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 39

**CCAGGTUACC TTAAGGGAGT CTGGTCTGC GCTGGTGAAA CCCACACAGA CCTTCACACT 60**  
**GACCTGCACC 70**

35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 40

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 40 (A) LONGITUD: 78 NUCLEÓTIDOS
- (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
- (C) TIPO DE CADENA: SENCILLA
- 45 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 40

**CAGCCCCAG GGAAGGCCCT GGAGTGGCTT GCGACATTT GGTGGGATGA CAAAAGGAC 60**  
**TATAATCCAT CCCTGAAG 78**

55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 41

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 64 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

5 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 41

10

<b>GGTCCTTAAA GTGACCAACA TGGACCCTGC TGACTGCGC ACTTACTACT GTGCTCGGTC</b>	<b>60</b>
<b>TATG</b>	<b>64</b>

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº 42

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 72 NUCLEÓTIDOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

20

(C) TIPO DE CADENA: SENCILLA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº 42

<b>GGCTGCGACT CACCATGGAC TGGACTGGA GGGTCTCTG CTGCTGGCT GTAGCACCAG</b>	<b>60</b>
<b>GTGCCACTC CC</b>	<b>72</b>



## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado que neutraliza el RSV y que tiene:
- 5 una CDR de cadena pesada 1, 2 y 3 de MEDI-493 de la Figura 7 y una CDR de cadena ligera 1,2 y 3 de MEDI-493 de la Figura 8, y una secuencia de estructura de cadena ligera humana con una homología de al menos un 82% con la región de estructura de cadena ligera del anticuerpo monoclonal murino 1129 de la Figura 8 y una secuencia de estructura de cadena pesada humana con una homología de al menos un 80% con la región de estructura de cadena pesada del anticuerpo monoclonal murino 1129 de la Figura 7.
- 10 2. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en el que la estructura de cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena pesada de MEDI-493 de la Figura 7.
- 15 3. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en el que la estructura de cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena ligera de MEDI-493 de la Figura 8.
- 20 4. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en el que la estructura de cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena ligera de MEDI-493 de la Figura 8 y la estructura de cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena pesada de MEDI-493 de la Figura 7.
5. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en el que la cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de MEDI-493 de la Figura 7.
- 25 6. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en el que la cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de MEDI-493 de la Figura 8.
- 30 7. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en el que la cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de MEDI-493 de la Figura 7 y la cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de MEDI-493 de la Figura 8.
8. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en el que la cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende las CDR de cadena ligera de MEDI-493 de la Figura 8 y la cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende las CDR de cadena pesada de MEDI-493 de la Figura 7.
- 35 9. Una composición farmacéutica que comprende:
- (a) el anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 y
- (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que la estructura de cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena pesada de MEDI-493 de la Figura 7.
- 45 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que la estructura de cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena ligera de MEDI-493 de la Figura 8.
- 50 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que la estructura de cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena ligera de MEDI-493 de la Figura 8 y la estructura de cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena pesada de MEDI-493 de la Figura 7.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que la cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de MEDI-493 de la Figura 7.
- 55 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que la cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de MEDI-493 de la Figura 8.
- 60 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que la cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de cadena pesada de MEDI-493 de la Figura 7 y la cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de cadena ligera de MEDI-493 de la Figura 8.
- 65 16. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que la cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende las CDR de cadena pesada de MEDI-493 de la Figura 7 y la cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende las CDR de cadena ligera de MEDI-493 de la Figura 8.
17. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que la cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende las CDR de cadena pesada de MEDI-493 de la Figura 7.

18. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que la cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende las CDR de cadena ligera de MEDI-493 de la Figura 8.
- 5 19. El uso del anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 para la preparación de una composición para prevenir la infección producida por el virus respiratorio sincitial en un ser humano.
20. El uso de la reivindicación 19, en el que la estructura de cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena pesada de MEDI-493 de la Figura 7.
- 10 21. El uso de la reivindicación 19, en el que la estructura de cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena ligera de MEDI-493 de la Figura 8.
- 15 22. El uso de la reivindicación 19, en el que la estructura de cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena ligera de MEDI-493 de la Figura 8 y la estructura de cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena pesada de MEDI-493 de la Figura 7.
- 20 23. El uso de la reivindicación 19, en el que la cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de MEDI-493 de la Figura 7.
- 25 24. El uso de la reivindicación 19, en el que la cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de MEDI-493 de la Figura 8.
- 30 25. El uso de la reivindicación 19, en el que la cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de cadena pesada de MEDI-493 de la Figura 7 y la cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de cadena ligera de MEDI-493 de la Figura 8.
- 35 26. El uso del anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 para la preparación de una composición para el tratamiento de la infección producida por el virus respiratorio sincitial en un ser humano.
- 40 27. El uso de la reivindicación 26, en el que la estructura de cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena pesada de MEDI-493 de la Figura 7.
- 45 28. El uso de la reivindicación 26, en el que la estructura de cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena ligera de MEDI-493 de la Figura 8.
29. El uso de la reivindicación 26, en el que la estructura de cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena ligera de MEDI-493 de la Figura 8 y la estructura de cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende la estructura de cadena pesada de MEDI-493 de la Figura 7.
30. El uso de la reivindicación 26, en el que la cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de MEDI-493 de la Figura 7.
31. El uso de la reivindicación 26, en el que la cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de MEDI-493 de la Figura 8.
32. El uso de la reivindicación 26, en el que la cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de cadena pesada de MEDI-493 de la Figura 7 y la cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende el polipéptido de cadena ligera de MEDI-493 de la Figura 8.

# FIG. 1A

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val	5	10	15	20	VH HV3 humano
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val					VH CDR-injertado
Glu Val Gln Leu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu					VH 1308F murino
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Ser Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala	25	30	35	40	
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala					
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg					
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr	45	50	55	60	
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Val Phe					
Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Val Phe					
Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr	65	70	71	75	
Asn Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr					
Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr					

UNIR A LA FIGURA 1B





# FIG. 2B

UNIR A LA FIGURA 2A

	65		70		75		80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro							
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro							
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Glu Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Phe							
	85		90		95		100
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser							
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys <u>Leu Gln Phe His Glu Phe Pro Tyr Thr</u> Phe Gly Gly							
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Phe His Glu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly							
	105						
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys							
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys							

CR 3

<<V / J>>

# FIG. 3A

gcgaattccatggactggacctggagggtc - 3'

MetAspTrpThrTrpArgValPheCysLeuLeuAlaValAlaProGlyAlaHisSerGln  
 5' ccATGGACTGGACCTGGAGGGCTCTCTGCTGGCTGTAGCACCCAGGTGCCCACTCCAG  
 1-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 3' TACCTGACCTGGACCTCCCAGAGACGAACGCCGACATCGTGGTCCACGGGTGAGGGTC

ValGlnLeuValGlnSerGlyAlaGluValLysLysProGlyAlaSerValLysValSer  
GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCCTGGAGCCTCAGTGAAGTTC  
 61-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CACGTCCGACCACGTCAGACCTCGACTCCACTTCTTCGGACCTCCGGAGTCACCTCCCAAGG

CysLysAlaSerGlyPheAsnIleLysAspTyrIleTyrIleTyrIleTyrValArgGlnAlaPro  
 TCCAAGGCATCTGGATTCAACATTAAGGACTACTACATTTACTGGGTCCGACAGGCTCCT  
 121-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ACGTTCCGTAGACCTAAGTGTATTCCTGATGATGTAATGACCCACCGCTGTCCGAGGA

GlyGlnGlyLeuGluTrpMetGlyTyrPileAspProGluAsnGlyAsnThrValPheAsp  
 GGACAAGGGCTCCGATGGATCGGTTGGATTGACCCCTGAGAAATGGTAATACTGTGTGTGAC  
 181-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CCTGTTCCTCCGAGCTCACCTACCCCAACCTAACTGGGACTCTTACCATTATGACACAACCTG

UNIR A LA FIGURA 3B

UNIR A LA FIGURA 3A

FIG. 3B

ProLysPheGlnGlyArgValThrMetThrArgAspThrSerThrSerThrValTyrMet  
CCGAACTTCCAGGGCAGAGTCCACCATGACCAGGGACACCTCCACGAGCACAGTCTACATG  
 241-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GGCTTCAAGGTCCCGTCTCAGTGGTACTGGTCCCTGTCCAGGGTGGCTGGTGCAGATGTAC

GluLeuSerSerLeuArgSerGluAspThrAlaValTyrTyrCysAlaTyrTyrGlyThr  
GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCCGTGTATTACTGTGCGTACTACGGTACA  
 301-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CTCGACTCGTCGGACTCTAGACTCCTGTGGCCGGCCACATAATGACACCGCATGATGCCATGT

SerSerPheAspPheTrpGlyGlnGlyThrThrLeuThrValSerSer  
 AGCTCCTTTGACTTCTGGGGCCCAAGGCCACCCTCTCACAGTGAGCTCA  
 361-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
TCGAGGAAGAACTGAGAGACCCCGGTCCCGTGGTGAGAGTGCCTCGAGTatttcctagg 5'  
 ggtgagagtgtcactcgagtatttcctagggc



# FIG. 4A

```

cgcggatccatggacatgagggtcccc - 3'

MetAspMetArgValProAlaGlnLeuLeuGlyLeuLeuLeuLeuLeuTribLeuProGlyAla
CCATGGACATGAGGTCCTCCGCTCAGCTCCCTGGGCTCCCTGCTCTGGCTCCAGGTGCC
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACCTGTACTCCCAGGGCGGAGTCGAGGACCCCGAGGACCGAGACCGAGGGTCCACCG

LysCysAspIleGlnMetThrGlnSerProSerThrLeuSerAlaSerValGlyAspArg
AAATGTGATATCCAGATGACCCAGTCTCTCCACCCCTGCTGCTCATCTGTAGGACACAGA
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTACACTATAGGTCTACTGGGTCCAGAGGAGGGTGGGACAGACGTAGACATCTCTGTCCT

ValThrIleThrCysLysAlaSerGlnAspIleAsnArgTyrLeuAsnTyrTyrGlnGln
GTCACCATCCTTGCAGCGGAGTCAGGACATTAATAGGTATTTAAACTGGTACCCAGCCAG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
_CAGTGGTAGTGACGTTCCGGCTCAGTCCGTAATATATCCATAAATTGACCATGGTCCGTC

LysProGlyLysAlaProLysLeuLeuIleTyrArgAlaAsnArgLeuValAspGlyVal
AAAACCCCGGAAAGCCCTTAGCTCTGATCTATCGTGCBAACAGATGGGTAGATGGGGTC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTGGGCCCTTTCGGGGATTCCGAGGACTAGATAGCACCGTTTGTCTAACCATCTACCCCCAG

```

UNIR A LA FIGURA 4B



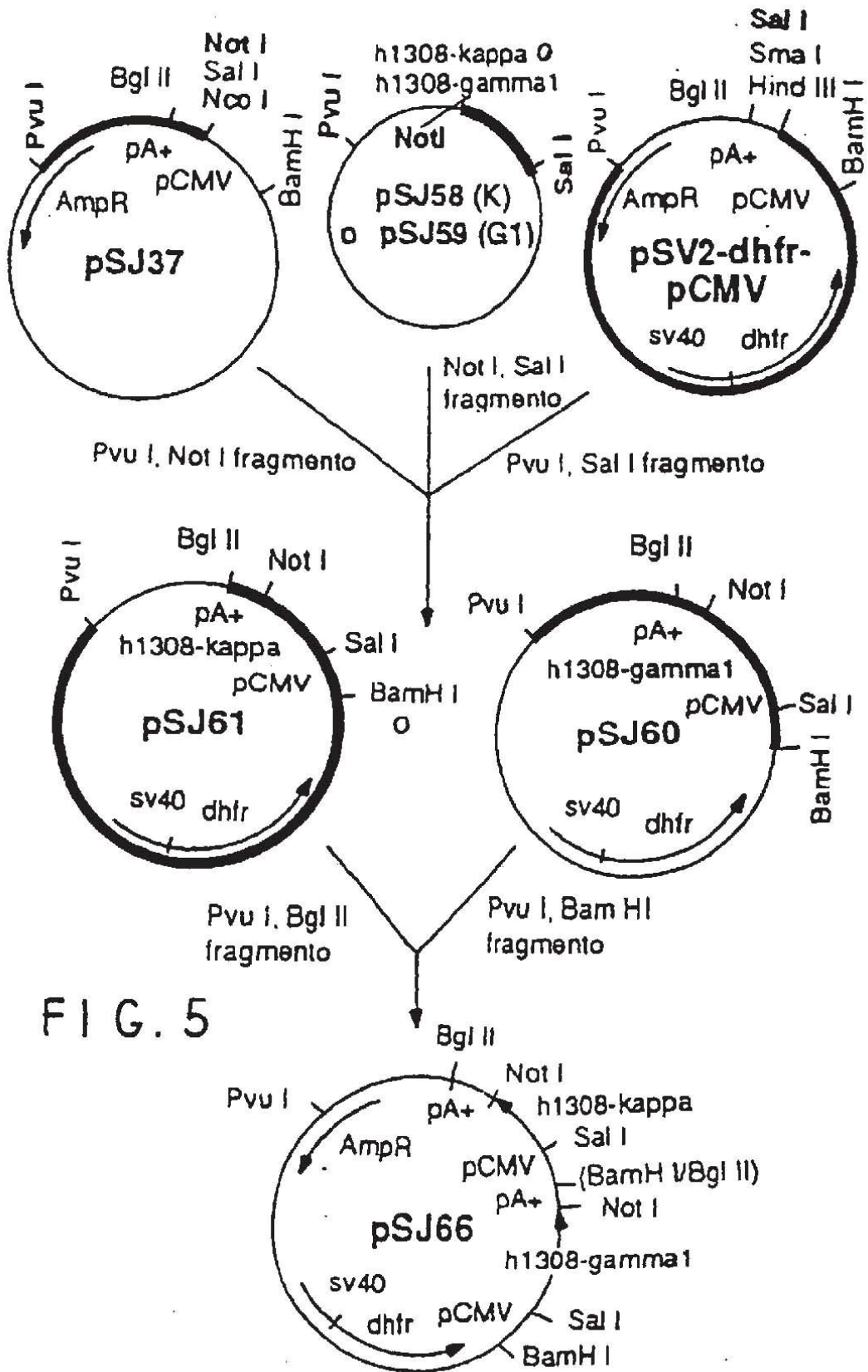
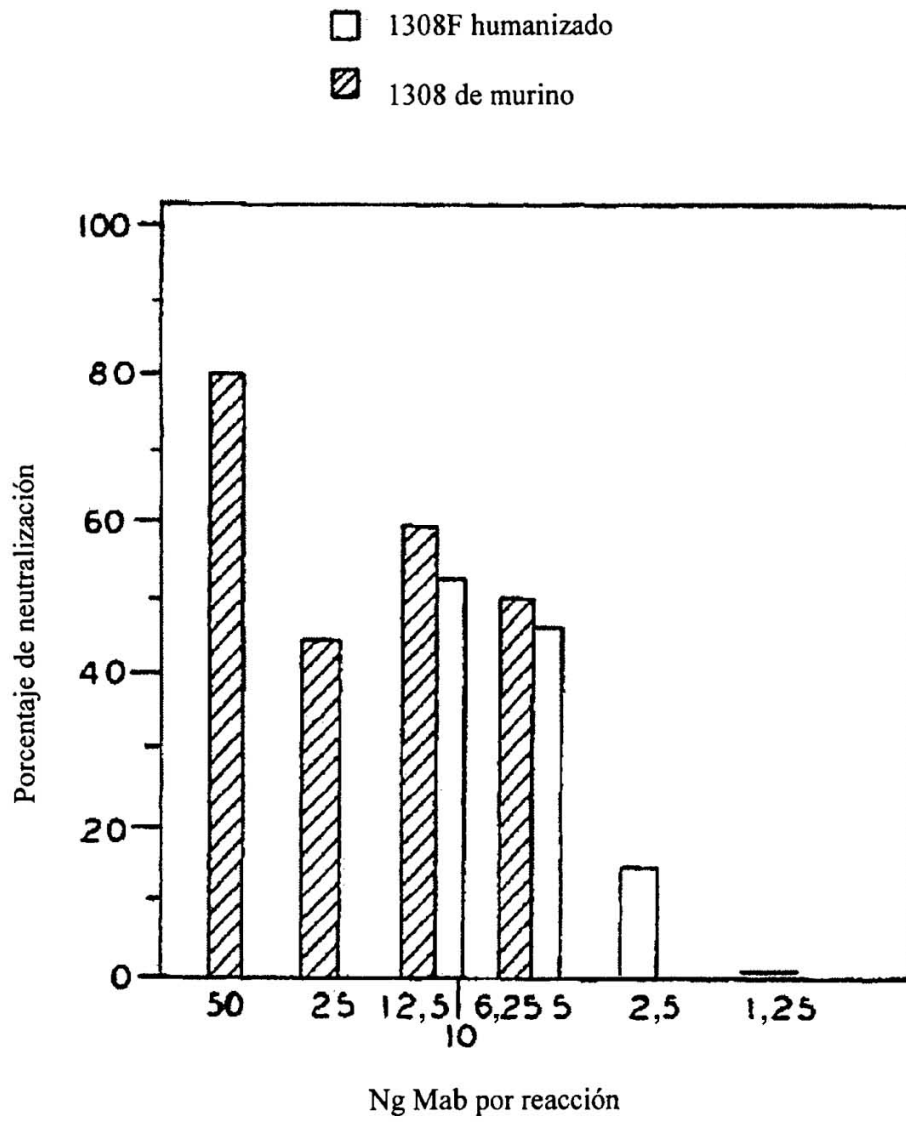


FIG. 5

FIG. 6





UNIR A LA FIGURA 7A **FIG. 7B**

Tyr Asn Thr Ser Leu Asp Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr  
 Tyr Asn Thr Ser Leu Asp Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr  
 61 Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr  
  
 Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr  
  
 Ser Lys Asn Gln Val Val - - Thr Thr Met Asp Pro Tyr  
 Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala  
 76 Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala  
  
 Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Gly Val Asp Thr Ala  
  
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Thr Val Ile Pro Ala Pro Ala Gly  
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Gln Val Thr Met Val Arg Val Met Ile Thr Ser Asn Ala  
 91 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp  
 CDR3  
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp  
  
 Tyr Met Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
 Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 106 Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
  
 Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser







FIG. 9A

SJ153	<p>CCATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTCTGCTGGCTGTAGCACCAGGTGCCCACTCCC-3'</p> <p style="text-align: center;">NcoI</p> <p style="text-align: center;">SJ150 5'-CCAG</p>	SJ153 5'-GGCGTCGACTCA-
SJ150	<p>GTCACCTTAAGGGAGTCTGGTCTGGCTGGTGAACCCACACAGACCCCTCACACTGACC</p> <p style="text-align: center;">3'-GGAGTGTGACTGG</p> <p>ValThrLeuArgGluSerGlyProAlaLeuValIysProThrGlnThrLeuThrLeuThr</p>	<p>MetAspTrpThrTrpArgValPheCysLeuLeuAlaValAlaProGlyAlaHisSerGln</p> <p style="text-align: center;">-1/1</p>
SJ150	<p>TGCACC-3'</p> <p>ACGTGGAAAGAGACCCAAAAGTGACTCGTGAAGACCACTACATCCGACCTAAGCAGTC</p> <p>CysThrPheSerGlyPheSerLeuSerThrSerGlyMetSerValGlyTrpIleArgGln</p>	<p>SJ151 5'-CAG</p> <p style="text-align: center;">SJ149</p>
SJ151	<p>CCCCCAGGGAAGCCCTGGAGTGGCTTGCAGACATTTGGTGGGATGACAAAAGGACTAT</p> <p>GGGGTCCCTTCCGGG-5' SJ149</p> <p>ProProGlyLysAlaLeuGluTrpLeuAlaAspIleTrpTrpAspAspLysLysAspTyr</p>	<p style="text-align: center;">3'-GATA</p> <p style="text-align: center;">SJ148</p>

UNIR A LA FIGURA 9B

# FIG. 9B

UNIR A LA FIGURA 9A

SJ151	AATCCATCCCTGAAG-3' TTAGGTAGGGACTTCTCGGCCGAGTGTTAGAGGTTCCCTATGGAGGTTTTTGGTCCACCAG AsnProSerLeuLysSerArgLeuThrIleSerLysAspThrSerLysAsnGlnValVal	SJ152 5'-GGTC SJ148
SJ152	CTTAAAGTGACCAACATGGACCCTGCTGATACTGCCACTTACTGTGCTCGGCTATG GAATTCACCTGGTTG-5' SJ148 LeuLysValThrAsnMetAspProAlaAspThrAlaThrTyrCysAlaArgSerMet	3'-TAC SJ147
SJ152	ATCACGAACTGGTAC-3' TAGTGCTTGACCATGAAGCTACAGACCCCGGGCCCTGGTCCAGTGGCACICGAGTCCG-5' IleThrAsnTrpTyrPheAspValTrpGlyAlaGlyThrThrValThrValSerSer	SacI SJ147

FIG. 10

