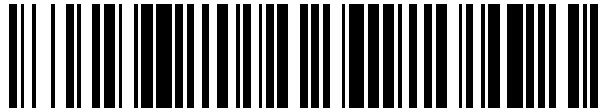


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 308**

51 Int. Cl.:

C07K 16/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2009 E 09720032 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2257571**

54 Título: **Composiciones y métodos para la terapia y diagnóstico de infecciones por citomegalovirus**

30 Prioridad:

10.03.2008 US 68798 P

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

04.08.2015

73 Titular/es:

**THERACLONE SCIENCES, INC. (100.0%)
1124 Columbia Street, Suite 300
Seattle, WA 98104, US**

72 Inventor/es:

OLSEN, OLE

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 542 308 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

Composiciones y métodos para la terapia y diagnóstico de infecciones por citomegalovirus

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a la terapia, diagnóstico y control de infección por citomegalovirus (CMV). La invención se refiere más específicamente a anticuerpos específicos de CMV humano (HCMV) y a su fabricación y uso. Dichos anticuerpos son útiles en composiciones farmacéuticas para la prevención y tratamiento de infección por CMV, y para el diagnóstico y control de infección por CMV.

Antecedentes de la invención

El CMV se asocia con morbilidad y mortalidad generalizadas. La infección con citomegalovirus (CMV) es común, y se ha estimado que entre el 50 % y el 85 % de personas en los Estados Unidos han tenido una infección por CMV cuando llegan a 40 años de edad. Aunque la infección por CMV generalmente no produce síntomas en adultos sanos, los grupos de alto riesgo, incluyendo receptores con trasplante de órganos inmunocomprometidos e individuos infectados por VIH, están en riesgo de desarrollar una enfermedad asociada con CMV. Además, el CMV es una causa importante de infección congénita en el mundo desarrollado, que conduce a retraso mental y discapacidades del desarrollo.

El CMV es un miembro de la familia de herpesvirus en cualquier especie. En seres humanos, el CMV, también denominado HCMV, se designa como herpesvirus humano 5 (HHV-5). El CMV es el mayor miembro de la familia del herpesvirus, con un genoma de ADN bicatenario de más de 240 kpb, capaz de codificar más de 200 productos proteicos potenciales. El CMV también se denomina un Betaherpesvirinae, ya que es un virus del herpes que infecta a células mononucleares y linfocitos. Los seres humanos son el único hospedador natural para infección por CMV, aunque otros mamíferos se infectan con otras formas del CMV.

El cuidado médico para pacientes que padecen enfermedad asociada con CMV consiste en apoyo nutricional, tratamiento complementario para síndromes de órganos finales (particularmente neumonía en pacientes inmunocomprometidos) y terapia antiviral específica. Al menos tres terapias antivirales están aprobadas por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para tratamiento o prevención de infección por CMV. Estas incluyen los nucleósidos: ganciclovir (GCV) y cidofovir, así como foscarnet. GCV se usa habitualmente como terapia preventiva en receptores de trasplantes con alto riesgo de desarrollar enfermedad. También se ha usado aciclovir como profilaxis para trasplante de órganos sólidos, pero la biodisponibilidad es escasa, y no hay datos que apoyen su uso en niños. También se han usado inmunoglobulinas como inmunización pasiva para la prevención de enfermedad asociada con CMV. En general, aunque estos agentes han mostrado eficacia en el tratamiento o prevención de infección por CMV, los nucleósidos, en particular, se asocian con efectos secundarios graves, incluyendo anemia y otros problemas sanguíneos. En consecuencia, su uso en niños está limitado.

Claramente, existe la necesidad en la técnica de nuevos agentes útiles para el tratamiento y prevención de infección por CMV sintomática y enfermedades asociadas, particularmente para el tratamiento de niños.

45 Sumario de la invención

La invención proporciona un anticuerpo anti-CMV aislado o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo incluye: I: (a) una región V_H que incluye (i) una región V_H CDR1 que incluye la secuencia de aminoácidos de SSNGIH (SEC ID N°: 57); (ii) una región V_H CDR2 que incluye la secuencia de aminoácidos de VISSDANDKQYADSVKQ (SEC ID N°: 58); (iii) una región V_H CDR3 que incluye la secuencia de aminoácidos de DGTCSGGNCYSGLIDY (SEC ID N°: 59); y (b) una región V_L que incluye (i) una región V_L CDR1 que incluye la secuencia de aminoácidos de RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43); (ii) una región V_L CDR2 que incluye la secuencia de aminoácidos de ASIRAT (SEC ID N°: 64); (iii) una región V_L CDR3 que incluye la secuencia de aminoácidos de HQRSNWPPLT (SEC ID N°: 65); o VISKDGTNAHYADSVRG (SEC ID N°: 68); II: (a) una región V_H que incluye (i) una región V_H CDR1 que incluye la secuencia de aminoácidos de GFTFSS (SEC ID N°: 60); (ii) una región V_H CDR2 que incluye la secuencia de aminoácidos de VISSDANDKQ (SEC ID N°: 61); (iii) una región V_H CDR3 que incluye la secuencia de aminoácidos de DGTCSGGNCYSGLIDY (SEC ID N°: 59); y (b) una región V_L que incluye (i) una región V_L CDR1 que incluye la secuencia de aminoácidos de RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43); (ii) una región V_L CDR2 que incluye la secuencia de aminoácidos de ASIRAT (SEC ID N°: 64); (iii) una región V_L CDR3 que incluye la secuencia de aminoácidos de HQRSNWPPLT (SEC ID N°: 65).

La invención proporciona además un anticuerpo anti-CMV aislado incluyendo una secuencia de cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 56 y una secuencia de cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 63.

65

El anticuerpo anti-CMV de la invención se une con un epítipo de la proteína de envoltura de glucoproteína b (gB) del virus CMV. En un aspecto de la invención, el epítipo comprende el sitio 1 de determinante antigénico 2 de gB, gp116.

5 La invención proporciona una composición que incluye uno o más de los anticuerpos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, la composición también incluye un tratamiento anti-viral. Son ejemplos no limitantes de tratamientos antivirales ganciclovir, foscarnet, cidofovir, valganciclovir e inmunoglobulina intravenosa (IVIG). En otras realizaciones, la composición incluye además un segundo anticuerpo anti-CMV.

10 La invención proporciona además un anticuerpo anti-CMV, tal como los descritos en el presente documento, en el que el anticuerpo está unido operativamente con un agente terapéutico o un marcador detectable.

La invención proporciona un método para el tratamiento o prevención de una infección por CMV en un sujeto, que incluye administrar al sujeto la composición descrita en el presente documento. En un aspecto, este método incluye además administrar un tratamiento anti-viral. Los tratamientos anti-virales incluyen, pero sin limitación, los siguientes ejemplos: ganciclovir, foscarnet, cidofovir, valganciclovir, e inmunoglobulina intravenosa (IVIG). En otro aspecto del método anterior, la composición que contiene un anticuerpo anti-CMV se administra antes de o después de la exposición a CMV a una dosis suficiente para neutralizar la infección por CMV.

20 Se proporcionan métodos adicionales de la invención para determinar la presencia de una infección por CMV en un paciente, incluyendo las etapas de: (a) poner en contacto una muestra biológica obtenida del paciente con un anticuerpo descrito en el presente documento; (b) detectar una cantidad del anticuerpo que se une con la muestra biológica; y (c) comparar la cantidad de anticuerpo que se une con la muestra biológica con un valor de control, y a partir de esto determinar la presencia del virus de la gripe en el paciente.

25 La invención también proporciona un kit que incluye un anticuerpo descrito en el presente documento.

Como alternativa, o además, la invención desvela un anticuerpo monoclonal humano aislado, en el que el anticuerpo monoclonal se une con un epítipo en el dominio extracelular del complejo de glucoproteína gB de un citomegalovirus (CMV). En un aspecto preferido, el CMV es un CMV humano (HCMV). En otro aspecto preferido, el anticuerpo se aísla de una célula B de un donante humano.

30 En ciertos aspectos de la presente divulgación, el epítipo del anticuerpo monoclonal humano aislado incluye la región AD-2 del complejo de gB de CMV. Específicamente, el epítipo incluye los aminoácidos en las posiciones 70-88 de un polipéptido gB de CMV, en el que los números de posiciones de aminoácidos están de acuerdo con SEC ID N°: 30. Como alternativa, el epítipo incluye los aminoácidos en las posiciones 65-93 de un complejo gB de CMV, en el que los números de posiciones de aminoácidos están de acuerdo con SEC ID N°: 30. Un epítipo alternativo adicional incluye los aminoácidos en las posiciones 60-98 de un complejo de gB de CMV, en el que los números de posiciones de aminoácidos están de acuerdo con SEC ID N°: 30.

40 En ciertos aspectos, el epítipo del anticuerpo descrito en el presente documento comprende completa o parcialmente la secuencia de aminoácidos NETIYNTTLKYGDWGVN (SEC ID N°: 32) o NIX₃NX₄TX₅X₆X₇X₅X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₄ (SEC ID N°: 33) en la que X₁ = aminoácido E o T, X₂ = T o V, X₃ = S o R, X₄ = T o L, X₅ = L o A, X₆ = K o S, X₇ = Y o V, X₈ = G o D, X₉ = D o F, X₁₀ = V o S, X₁₁ = V o Q, X₁₂ = G o ninguno, X₁₃ = V o ninguno, y X₁₄ = N o ninguno. En una realización adicional, el epítipo incluye completa o parcialmente la secuencia de aminoácidos SHRANETIYNTTLKYGDTTGTNTTK (SEC ID N°: 31).

El anticuerpo monoclonal humano aislado de la invención es 2N9.

50 La invención también desvela un anticuerpo monoclonal humano aislado anti-CMV o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada (V_H) que incluye CDR1 y CDR2, en el que la región está codificada por una secuencia de línea germinal de V_H de IGHV3 humano, o una secuencia de ácido nucleico que es homóloga de dicha secuencia de gen de línea germinal de V_H. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico que es homóloga de la secuencia de línea germinal es al menos 90 % homóloga de la secuencia de línea germinal de IGHV3. El anticuerpo incluye además una región variable de cadena ligera (V_L) codificada por una secuencia de gen de línea germinal V_L de IGKV3 humana, o una secuencia de ácido nucleico que es homóloga de dicha secuencia de gen de línea germinal V_L. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico que es homóloga de la secuencia de línea germinal V_L es al menos 90 % homóloga de la secuencia de línea germinal de V_L de IGKV3.

60 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de los anticuerpos humanos anti-CMV indicados. La Figura 1A proporciona un alineamiento de las regiones variables de cadena pesada gamma, y la Figura 1B proporciona un alineamiento de las regiones variables de cadena ligera kappa. Se muestran secuencias consenso debajo de cada alineamiento. Rojo es D F W Y S o T; verde claro es P; azul claro es N o Q; amarillo es C o M, azul muy claro es A G I L o V; azul oscuro es R H o K.

Solamente una ayuda visual para comparar secuencias.

5 La Figura 2 es una gráfica que representa la unión del anticuerpo humano anti-CMV 2F10 con el péptido epitópico AD2 de gp116 de CMV, en presencia o ausencia de péptido competidor, según se indica. La gráfica muestra fluorescencia asociada con las concentraciones indicadas de anticuerpo.

10 La Figura 3 es una gráfica que representa la unión del anticuerpo humano anti-CMV 2M16 con el péptido epitópico AD2 de gp116 de CMV, en presencia o ausencia de péptido competidor, según se indica. La gráfica muestra fluorescencia asociada con las concentraciones indicadas de anticuerpo.

La Figura 4 es una gráfica que representa la unión del anticuerpo humano anti-CMV 2N9 con el péptido epitópico AD2 de gp116 de CMV, en presencia o ausencia de péptido competidor, según se indica. La gráfica muestra fluorescencia asociada con las concentraciones indicadas de anticuerpo.

15 La Figura 5 es una gráfica que representa la unión del anticuerpo humano anti-CMV 3C21 con el péptido epitópico AD2 de gp116 de CMV, en presencia o ausencia de péptido competidor, según se indica. La gráfica muestra fluorescencia asociada con las concentraciones indicadas de anticuerpo.

20 La Figura 6 es una gráfica que representa la unión del anticuerpo humano anti-CMV 3G7 con el péptido epitópico AD2 de gp116 de CMV, en presencia o ausencia de péptido competidor, según se indica. La gráfica muestra fluorescencia asociada con las concentraciones indicadas de anticuerpo.

25 La Figura 7 es una gráfica que representa la unión del anticuerpo humano anti-CMV 4P12 con el péptido epitópico AD2 de gp116 de CMV, en presencia o ausencia de péptido competidor, según se indica. La gráfica muestra fluorescencia asociada con las concentraciones indicadas de anticuerpo.

30 La Figura 8 es una gráfica que representa la unión del anticuerpo humano anti-CMV 5J12 con el péptido epitópico AD2 de gp116 de CMV, en presencia o ausencia de péptido competidor, según se indica. La gráfica muestra fluorescencia asociada con las concentraciones indicadas de anticuerpo.

La Figura 9 es una gráfica que representa la neutralización de virus CMV por el anticuerpo humano anti-CMV 2F10. Las gráficas muestran la cantidad de inhibición viral asociada con las concentraciones indicadas de anticuerpo.

35 La Figura 10 es una gráfica que representa la neutralización de virus CMV por el anticuerpo humano anti-CMV 2M16. Las gráficas muestran la cantidad de inhibición viral asociada con las concentraciones indicadas de anticuerpo.

40 La Figura 11 es una gráfica que representa la neutralización de virus CMV por el anticuerpo humano anti-CMV 2N9. Las gráficas muestran la cantidad de inhibición viral asociada con las concentraciones indicadas de anticuerpo.

45 La Figura 12 es una gráfica que representa la neutralización de virus CMV por el anticuerpo humano anti-CMV 3C21. Las gráficas muestran la cantidad de inhibición viral asociada con las concentraciones indicadas de anticuerpo.

50 La Figura 13 es una gráfica que representa la neutralización de virus CMV por el anticuerpo humano anti-CMV 3G7. Las gráficas muestran la cantidad de inhibición viral asociada con las concentraciones indicadas de anticuerpo.

La Figura 14 es una gráfica que representa la neutralización de virus CMV por el anticuerpo humano anti-CMV 4P12. Las gráficas muestran la cantidad de inhibición viral asociada con las concentraciones indicadas de anticuerpo.

55 La Figura 15 es una serie de gráficas del % de infecciosidad relativo frente a concentración de la cepa viral de citomegalovirus humano (HCMV) (VR1814) usando 6 anticuerpos anti-HCMV (2 filas superiores) y 2 controles (fila inferior) a diluciones que varían desde 30 a 0,003 mg/ml en tres líneas celulares humanas.

60 La Figura 16 es una serie de gráficas del % relativo de infecciosidad frente a concentración de las cepas virales de HCMV (8818, 8819 y 8824) usando 6 anticuerpos anti-HCMV (2 filas superiores) y 2 controles (fila inferior) a diluciones que varían de 30 a 0,003 mg/ml en líneas celulares de fibroblastos humanas.

65 La Figura 17 es una serie de gráficas del % relativo de infecciosidad frente a concentración del aislado clínico de HCMV (8819) usando 6 anticuerpos anti-HCMV (2 filas superiores) y 2 controles (fila inferior) en diversas concentraciones en líneas celulares humanas endoteliales y epiteliales .

La Figura 18 es una serie de gráficas del % relativo de infecciosidad frente a concentración de la cepa viral de CMV de cobaya (GPCMV) (V545/32) usando 6 anticuerpos anti-HCMV (2 filas superiores) y 2 controles (fila inferior) a diversas concentraciones en células JH4.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en general a composiciones y su uso en el diagnóstico, prevención y terapia de infección por citomegalovirus (CMV). Como se describe adicionalmente posteriormente, las composiciones ilustrativas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos específicos de HCMV y fragmentos y derivados de los mismos.

En una realización, los anticuerpos anti-CMV de la invención se unen completa o parcialmente con la secuencia de aminoácidos SHRANETIYNTTLKYGDTTGTNTTK (SEC ID N°: 31) o NETIYNTTLKYGDVVGVN (SEC ID N°: 32). Más preferentemente, los anticuerpos anti-CMV de la invención se unen completa o parcialmente con la secuencia de aminoácidos NIX₃NX₄TX₅X₆X₇X₅X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₄ (SEC ID N°: 33) en la que X₁ = aminoácido E o T, X₂ = T o V, X₃ = Y o R, X₄ = T o L, X₅ = L o A, X₆ = K o S, X₇ = Y o V, X₈ = G o D, X₉ = D o F, X₁₀ = V o S, X₁₁ = V o Q, X₁₂ = G o ninguno, X₁₃ = V o ninguno, y X₁₄ = N o ninguno. Son anticuerpos monoclonales anti-CMV ejemplares que se unen con este epítipo los anticuerpos 2F10, 2M16, 2N9, 4P12, 5P9, 9C16 descritos en el presente documento.

Los aminoácidos que abarcan las CDR como se definen en Chothia, C. *et al.* (1989, Nature, 342: 877-883) se presentan en cursiva y las definidas por Kabat E.A. *et al.* (1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, NIH Publicación N° 91-3242 Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos) se subrayan en negrita en las secuencias como se describe en los ejemplos del presente documento. Un experto habitual en la materia reconocerá fácilmente que hay varios métodos convencionales para definir CDR dentro de la región variable de un anticuerpo. Se muestran en el presente documento dos de los más ampliamente usados. El experto habitual en la técnica también reconocerá fácilmente que la invención abarca otros métodos reconocidos en la técnica para delimitar CDR.

El anticuerpo 2F10 incluye una región variable de cadena pesada (SEC ID N°: 35) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada posteriormente en SEC ID N°: 34, y una región variable de cadena ligera (SEC ID N°: 42) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEC ID N°: 41.

Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 2F10 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: SNHGIH (SEC ID N°: 36), VISSDGD^{DR}YADSVKG (SEC ID N°: 37) y DGRCGEPKCYSGLPDY (SEC ID N°: 38). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 2F10 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43), DASNRAT (SEC ID N°: 44) y LQRNTWPPLT (SEC ID N°: 45).

Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 2F10 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia: GFTFSN (SEC ID N°: 39), VISSDGD^{DR} (SEC ID N°: 40) y DGRCGEPKCYSGLPDY (SEC ID N°: 38). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 2F10 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia: RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43), DASNRAT (SEC ID N°: 44) y LQRNTWPPLT (SEC ID N°: 45).

El anticuerpo 2M16 incluye una región variable de cadena pesada (SEC ID N°: 47) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada posteriormente en SEC ID N°: 46, y una región variable de cadena ligera (SEC ID N°: 52) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N°: 94.

Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 2M16 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: SNYGMH (SEC ID N°: 48), VISSDGSNEHYADSVKG (SEC ID N°: 49) y DGRCPDVNCYSGLIDY (SEC ID N°: 50). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 2M16 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: RASQSVGRYLA (SEC ID N°: 53), DASNRAT (SEC ID N°: 44) y QQRSNWPPLT (SEC ID N°: 54).

Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 2M16 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia: GLTFSN (SEC ID N°: 118), VISSDGSNEH (SEC ID N°: 51) y DGRCPDVNCYSGLIDY (SEC ID N°: 50). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 2M16 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia: RASQSVGRYLA (SEC ID N°: 53), DASNRAT (SEC ID N°: 44) y QQRSNWPPLT (SEC ID N°: 54).

El anticuerpo 2N9 incluye una región variable de cadena pesada (SEC ID N°: 56) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada posteriormente en SEC ID N°: 55, y una región variable de cadena ligera (SEC ID N°: 63) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N°: 62.

Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 2N9 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: SSNGIH (SEC ID N°: 57), VISSDANDKQYADSVKG (SEC ID N°: 58) y DGTCSGGNCYSGLIDY (SEC ID N°: 59). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 2N9 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43), ASIRAT (SEC ID N°: 64) y HQRSNWPPLT (SEC ID N°: 65).

Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 2N9 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia:

GFTFSS (SEC ID N°: 60), VISSDANDKQ (SEC ID N°: 61) y DGTCSGGNCYSGLIDY (SEC ID N°: 59). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 2N9 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia: RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43), ASIRAT (SEC ID N°: 64) y HQRSSWPPLT (SEC ID N°: 65).

5 El anticuerpo 4P12 incluye una región variable de cadena pesada (SEC ID N°: 67) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada posteriormente en SEC ID N°: 66, y una región variable de cadena ligera (SEC ID N°: 73) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N°: 72.

10 Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4P12 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: SNHGIH (SEC ID N°: 36), VISKDGTNAHYADSVRG (SEC ID N°: 68) y EGRICIEENCYSGQIDY (SEC ID N°: 69). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 4P12 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: RASQSVGRYMA (SEC ID N°: 74), DASIRAT (SEC ID N°: 75) y QQRSSWPPLT (SEC ID N°: 76).

15 Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 4P12 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia: KFIFSN (SEC ID N°: 70), VISKDGTNAH (SEC ID N°: 71) y EGRICIEENCYSGQIDY (SEC ID N°: 69). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 4P12 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia: RASQSVGRYMA (SEC ID N°: 74), DASIRAT (SEC ID N°: 75) y QQRSSWPPLT (SEC ID N°: 76).

20 El anticuerpo 5P9 incluye una región variable de cadena pesada (SEC ID N°: 78) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada posteriormente en SEC ID N°: 77, y una región variable de cadena ligera (SEC ID N°: 82) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N°: 81.

25 Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 5P9 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: SNHGIH (SEC ID N°: 36), VISKDGTNAHYADSVRGR (SEC ID N°: 79) y EGRICIEEKCYSGQIDY (SEC ID N°: 80). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 5P9 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: RASQSVGRYMA (SEC ID N°: 74), DASIRAT (SEC ID N°: 75) y QQRSSWPPLT (SEC ID N°: 76).

30 Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 5P9 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia: KFIFSN (SEC ID N°: 70), VISKDGTNAH (SEC ID N°: 71) y EGRICIEEKCYSGQIDY (SEC ID N°: 80). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 5P9 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia: RASQSVGRYMA (SEC ID N°: 74), DASIRAT (SEC ID N°: 75) y QQRSSWPPLT (SEC ID N°: 76).

35 El anticuerpo 9C16 incluye una región variable de cadena pesada (SEC ID N°: 84) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada posteriormente en SEC ID N°: 83 y una región variable de cadena ligera (SEC ID N°: 91) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEC ID N°: 90.

40 Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 9C16 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: SDYGMH (SEC ID N°: 85), VISKDGTNTHYADSVRG (SEC ID N°: 86) y DGKCPDLKCYSGLIDY (SEC ID N°: 87). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 9C16 tienen las siguientes secuencias según la definición de Kabat: RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43), DASKRAT (SEC ID N°: 92) y HQRSSWPPLT (SEC ID N°: 93).

45 Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 9C16 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia: GLTFSD (SEC ID N°: 88), VISKDGTNTH (SEC ID N°: 89) y DGKCPDLKCYSGLIDY (SEC ID N°: 87). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 9C16 tienen las siguientes secuencias según la definición de Chothia: RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43), DASKRAT (SEC ID N°: 92) y HQRSSWPPLT (SEC ID N°: 93).

50 Un anticuerpo anti-CMV contiene una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 35, 47, 56, 67, 78 o 84 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 42, 52, 63, 73, 82 o 91. Preferentemente, las tres CDR de cadena pesada incluyen una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de SNHGIH (SEC ID N°: 36), VISSDGDNDRYADSVKG (SEC ID N°: 37), DGRCPDVCYSGLIDY (SEC ID N°: 38), SNYGMH (SEC ID N°: 48), VISSDGSNEHYADSVKG (SEC ID N°: 49), DGRCPDVCYSGLIDY (SEC ID N°: 50), SSNGIH (SEC ID N°: 57), VISSDANDKQYADSVKG (SEC ID N°: 58), DGTCSGGNCYSGLIDY (SEC ID N°: 59), VISKDGTNAHYADSVRG (SEC ID N°: 68), EGRICIEENCYSGQIDY (SEC ID N°: 69), VISKDGTNAHYADSVRGR (SEC ID N°: 79), EGRICIEEKCYSGQIDY (SEC ID N°: 80), SDYGMH (SEC ID N°: 85), VISKDGTNTHYADSVRG (SEC ID N°: 86), DGKCPDLKCYSGLIDY (SEC ID N°: 87) (como se determina por el método de Kabat) o GFTFSS (SEC ID N°: 39), VISSDGDND (SEC ID N°: 51), DGRCPDVCYSGLIDY (SEC ID N°: 50), GFTFSS (SEC ID N°: 60), VISSDANDKQ (SEC ID N°: 61), DGTCSGGNCYSGLIDY (SEC ID N°: 59), KFIFSN (SEC ID N°: 70), VISKDGTNAH (SEC ID N°: 71), EGRICIEENCYSGQIDY (SEC ID N°: 69), EGRICIEEKCYSGQIDY (SEC ID N°: 80), GLTFSD (SEC ID N°: 88), VISKDGTNTH (SEC ID N°: 89), DGKCPDLKCYSGLIDY (SEC ID N°: 87), GLTFSD (SEC ID N°: 118) (como se determina por el método de Chothia) y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43), DASNRAT (SEC ID N°: 44), LQRNTWPPLT (SEC ID N°: 45), RASQSVGRYLA (SEC ID N°: 53), QQRSSWPPLT (SEC ID N°: 54), ASIRAT (SEC ID N°: 64), HQRSSWPPLT (SEC ID N°: 65), RASQSVGRYMA (SEC ID N°: 74), DASIRAT (SEC ID N°: 75), QQRSSWPPLT (SEC ID N°: 76), DASKRAT (SEC ID N°: 92), HQRSSWPPLT (SEC ID N°: 93) (como se determina por el método de Kabat) o RASQSVGGYLA (SEC ID

Nº: 43), DASNRAT (SEC ID Nº: 44), LQRNTWPPLT (SEC ID Nº: 45) , RASQSVGRYLA (SEC ID Nº: 53), QQRSNWPLT (SEC ID Nº: 54), ASIRAT (SEC ID Nº: 64), HQRSSWPPLT (SEC ID Nº: 65), RASQSVGRYLA (SEC ID Nº: 74), DASIRAT (SEC ID Nº: 75), QQRSSWPPLT (SEC ID Nº: 76), DASKRAT (SEC ID Nº: 92), HQRSSWPPLT (SEC ID Nº: 93) (como se determina por el método de Chothia). El anticuerpo se une con gB de CMV.

5 La cadena pesada de un anticuerpo anti-CMV deriva de un gen V (variable) de la línea germinal tal como, por ejemplo, el gen de línea germinal de IGHV3.

10 Los anticuerpos anti-CMV descritos en el presente documento incluyen una región de cadena pesada variable (V_H) codificada por una secuencia de gen de línea germinal de IGHV3 humana. Se muestran secuencias de genes de línea germinal de IGHV3, por ejemplo, en los números de referencia M99663, X92214, L06616, L06617, M77327 y M77339. Los anticuerpos anti-CMV de la invención incluyen una región V_H que está codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80 % homóloga de la secuencia del gen de línea germinal X. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 % homóloga de la secuencia del gen de línea germinal de IGHV3, y más preferentemente, al menos 98 %, 99 % homóloga de la secuencia del gen de línea germinal de IGHV3. La región V_H del anticuerpo anti-CMV es al menos 80 % homóloga de la secuencia de aminoácidos de la región V_H codificada por la secuencia del gen de línea germinal de V_H de IGHV3. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de región V_H del anticuerpo anti-CMV es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 % homóloga de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia del gen de línea germinal de IGHV3, y más preferentemente, al menos 98 %, 99 % homóloga de la secuencia codificada por la secuencia del gen de línea germinal de IGHV3.

25 Los anticuerpos anti-CMV descritos en el presente documento también incluyen una región de cadena ligera variable (V_L) codificada por una secuencia de gen de línea germinal de IGKV3 humana. Se muestra una secuencia de gen de línea germinal de V_L de IGKV3, por ejemplo, en los números de referencia X01668, K02768, X17264, L19271 y L19272. Como alternativa, los anticuerpos anti-CMV incluyen una región V_L que está codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80 % homóloga de la secuencia del gen de línea germinal de IGKV3. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 % homóloga de la secuencia del gen de línea germinal de IGKV3, y más preferentemente, al menos 98 %, 99 % homóloga de la secuencia del gen de línea germinal de IGKV3. La región V_L del anticuerpo anti-CMV es al menos 80 % homóloga de la secuencia de aminoácidos de la región V_L codificada por la secuencia del gen de línea germinal de IGKV3. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de la región V_L del anticuerpo anti-CMV es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 % homóloga de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia del gen de línea germinal de IGKV3, y más preferentemente, al menos 98 %, 99 % homóloga de la secuencia codificada por la secuencia del gen de línea germinal de IGKV3.

40 A no ser que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en relación con la presente invención tienen los significados que se entienden habitualmente por los expertos habituales en la materia. Además, a no ser que se requiera de otro modo por contexto, los términos singulares incluyen pluralidades y los términos plurales incluyen los singulares. En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, y química de proteínas y oligo o polinucleótidos e hibridación descritas en el presente documento son las bien conocidas y usadas habitualmente en este campo. Se usan técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza habitualmente en este campo o como se describe en el presente documento.

50 La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de virología, inmunología, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro de la experiencia de este campo, muchos de los cuales se describen posteriormente con el fin de ilustrar. Estas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); Maniatis *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I y II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames y S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames y S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984).

55 Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritos en el presente documento son las bien conocidas y usadas habitualmente en este campo. Se usan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro, y tratamiento de pacientes.

60 Las siguientes definiciones son útiles en el entendimiento de la presente invención:

65 El término "anticuerpo" (Ab) incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa indistintamente con "anticuerpo" en el presente documento.

Un "anticuerpo aislado" es uno que se ha separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purifica: (1) a más del 95 % en peso del anticuerpo como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente más de 99 % en peso; (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria; o (3) hasta su homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, se prepara anticuerpo aislado por al menos una etapa de purificación.

La unidad de anticuerpo de cuatro cadenas básica es una glucoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y por lo tanto contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes que incluyen 2-5 de las unidades de 4 cadenas básicas junto con cadena J. En el caso de IgG, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L está unida con una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también tiene enlaces disulfuro intracatenarios separados de forma regular. Cada cadena H tiene en el extremo N terminal un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N terminal, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Los restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L entre sí forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton y Lange, Norwalk, Conn., 1994, página 71, y Capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrado se asigna a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de sus dominios constantes (C_L). Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases basándose en diferencias relativamente menores en la secuencia y función de C_H , por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios V difieren extensivamente en su secuencia entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente en todo el tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En su lugar, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones marco conservadas (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que son cada una de 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectados por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

La expresión "región hipervariable" se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable incluye en general restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, en torno a aproximadamente los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el V_L , y en torno a aproximadamente 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el V_H cuando se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)); y/o los restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el V_L , y 26-32 (H1), 52-56 (H2) y 95-101 (H3) en el V_H cuando se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Chothia; Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)); y/o los restos de un "bucle hipervariable"/CDR (por ejemplo, restos 27-38 (L1), 56-65 (L2) y 105-120 (L3) en el V_L , y 27-38 (H1), 56-65 (H2) y 105-120 (H3) en el V_H cuando se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de IMGT; Lefranc, M.P. *et al.* Nucl. Acids Res. 27: 209-212 (1999), Ruiz, M. *et al.* Nucl. Acids Res. 28: 219-221 (2000)). Opcionalmente el anticuerpo tiene inserciones simétricas en uno o más de los siguientes puntos, 28, 36 (L1), 63, 74-75 (L2) y 123 (L3) en el V_L , y 28, 36 (H1), 63, 74-75 (H2) y 123 (H3) en el V_H cuando se

numeran de acuerdo con AHO; Honneger, A. y Plunkthun, A. J. Mol. Biol. 309: 657-670 (2001)).

Por restos de "ácido nucleico de línea germinal" se entiende el resto de ácido nucleico que aparece de forma natural en un gen de línea germinal que codifica una región constante o variable. El "gen de línea germinal" es el ADN que se encuentra en una célula germinal (es decir, una célula destinada a convertirse en un óvulo o en el espermatozoide). Una "mutación de línea germinal" se refiere a un cambio heredable en un ADN particular que se ha producido en una célula germinal o el cigoto en el estadio unicelular, y cuando se transmite a la descendencia, dicha mutación se incorpora en cada célula del cuerpo. Una mutación de línea germinal se diferencia de una mutación somática que se adquiere en una única célula del cuerpo. En algunos casos se mutan nucleótidos en una secuencia de ADN de línea germinal que codifica una región variable (es decir, una mutación somática) y se reemplazan con un nucleótido diferente.

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que incluyen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminación por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que requiera producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención se preparan por la metodología de hibridoma descrita en primer lugar en Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975) o pueden prepararse usando métodos de ADN recombinante en células bacterianas, eucariotas animales o vegetales (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se aíslan de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos "quiméricos", en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas son idénticas a u homólogas de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (véase Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). La presente invención proporciona secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de anticuerpos humanos. En consecuencia, los anticuerpos quiméricos de interés primario incluyen anticuerpos que contienen una o más secuencias de unión a antígeno humanas (por ejemplo, CDR) y que contienen una o más secuencias derivadas de un anticuerpo no humano, por ejemplo, una secuencia de región FR o C. Además, los anticuerpos quiméricos de interés primario en el presente documento incluyen los que incluyen una secuencia de unión a antígeno de dominio variable humana de una clase o subclase de anticuerpo y otra secuencia, por ejemplo, secuencia de región FR o C, derivada de otra clase o subclase de anticuerpo. Los anticuerpos quiméricos de interés también incluyen los que contienen secuencias de unión a antígeno de dominio variable relacionadas con las descritas en el presente documento o derivadas de una especie diferente, tales como un primate no humano (por ejemplo, Mono del Viejo Mundo, Simio, etc.). Los anticuerpos quiméricos también incluyen anticuerpos primatizados y humanizados.

Además, los anticuerpos quiméricos pueden incluir restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. Para más detalles, véase Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

Se considera en general que un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo humano que tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable "importado". Se realiza tradicionalmente humanización siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo con secuencias de región hipervariables importadas las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, estos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), en los que se ha sustituido menos que un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que contiene solamente secuencias presentes en un anticuerpo producido de forma natural por un ser humano. Además, un anticuerpo humano de la invención es un anticuerpo humano nativo, en el que el anticuerpo es de origen natural en un ser humano, a diferencia de un anticuerpo humano recombinante, en el que las cadenas pesadas y ligeras individuales se aíslan de seres humanos pero se ensamblan aleatoriamente creando todas las formas de anticuerpos naturales y no naturales (de los que un número insignificante de combinaciones se han aislado de un ser humano).

Específicamente, son anticuerpos humanos nativos los que se surgen de forma natural como resultado del funcionamiento de un sistema inmunitario humano intacto. La utilidad de los anticuerpos nativos para el tratamiento de enfermedades virales humanas se ha establecido mediante la experiencia con globulinas humanas hiperinmunitarias. Los anticuerpos nativos, como clase, difieren en algunos aspectos de los obtenidos por métodos de biblioteca recombinante (fago o ratón transgénico) y poseen propiedades definidas que pueden hacerlos productos terapéuticos ideales para enfermedades humanas (véase Dessain *et al.*, Exploring the Native Human Antibody Repertoire to Create Antiviral Therapeutics in Current Topics in Microbiology and Immunology 317: 155-183 (2008), © Springer-Verlag Nueva York). Específicamente, existe una ventaja específica de las bibliotecas de anticuerpos nativos expresadas a partir de linfocitos B humanos sobre anticuerpos derivados de fagos, debido a las limitaciones en un enfoque de fagos para recrear todos los emparejamientos de cadena pesada: cadena ligera originales o nativos, evitando de este modo la incorporación de estructuras de anticuerpo importantes en una biblioteca generada por fagos. Por lo tanto, es deseable obtener anticuerpos humanos nativos de alta calidad expresados de linfocitos B humanos para detección, diagnóstico, tratamiento y terapia de patógenos por un método de alto rendimiento.

Los anticuerpos humanos de la invención, sin embargo, contienen restos o modificaciones no hallados en un anticuerpo humano de origen natural, incluyendo las modificaciones y secuencias variantes descritas en el presente documento. Estas se realizan típicamente para refinar adicionalmente o potenciar el rendimiento del anticuerpo.

Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende un sitio de unión a antígeno así como un C_L y al menos dominios constantes de cadena pesada C_H 1, C_H 2 y C_H 3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Un "fragmento de anticuerpo" incluye una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase Patente de Estados Unidos N° 5.641.870; Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La expresión "fragmento funcional o análogo" de un anticuerpo es un compuesto que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento funcional o análogo de un anticuerpo anti-IgE es uno que puede unirse con una inmunoglobulina IgE de tal manera que evite o reduzca sustancialmente la capacidad de dicha molécula para poder unirse con el receptor de alta afinidad, Fc_εRI.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab" y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad para cristalizar rápidamente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento F(ab')₂ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab con enlaces disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y aún tiene capacidad de reticulación con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de fragmentos Fab por tener pocos restos adicionales en el extremo carboxilo terminal del dominio C_H1 incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Se produjeron originalmente fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ como pares de fragmentos de Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se muestran otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

El fragmento "Fc" incluye las partes carboxilo terminal de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc, siendo dicha región también la parte reconocida por receptores de Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígenos y de unión a antígenos completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación no covalente, estrecha. A partir del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (tres bucles cada uno de la cadena H y L) que contribuyen con los restos de aminoácidos para unión a antígeno y confieren especificidad de unión a antígenos al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que incluye solamente tres CDR específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse con el antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión completo.

"Fv monocatenario", también abreviado como "sFv" o "scFv", son fragmentos de anticuerpo que contienen los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido sFv incluye además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995,

mencionado posteriormente.

El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños preparados construyendo fragmentos sFv (véase párrafo anterior) con enlazadores cortos (de aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios V_H y V_L de modo que se consigue emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, dando como resultado un fragmento bivalente, es decir, fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv “de cruce” en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Se describen diacuerpos en más detalle en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

Un anticuerpo que “se internaliza” es uno que se capta por (es decir, entra en) la célula tras la unión con un antígeno en una célula de mamífero (por ejemplo, un polipéptido de superficie celular o receptor). El anticuerpo de internalización incluye fragmentos de anticuerpo, anticuerpo humano o quimérico, y conjugados de anticuerpos. Para ciertas aplicaciones terapéuticas, se contempla la internalización *in vivo*. El número de moléculas de anticuerpo internalizadas es suficiente o adecuado para destruir una célula o inhibir su crecimiento, especialmente una célula infectada. Dependiendo de la potencia del anticuerpo o conjugado de anticuerpo, en algunos casos, la captación de una única molécula de anticuerpo en la célula es suficiente para destruir la célula diana con la que se une el anticuerpo. Por ejemplo, ciertas toxinas son muy potentes en la destrucción de modo que la internalización de una molécula de la toxina conjugada con el anticuerpo es suficiente para destruir la célula infectada.

Se dice que un anticuerpo es “inmuno-específico”, “específico para” o “se une específicamente con” un antígeno si reacciona a un nivel detectable con el antígeno, preferentemente con una constante de afinidad, K_a, mayor de o igual a aproximadamente 10⁴ M⁻¹ o mayor de o igual a aproximadamente 10⁵ M⁻¹, mayor de o igual a aproximadamente 10⁶ M⁻¹, mayor de o igual a aproximadamente 10⁷ M⁻¹ o mayor de o igual a 10⁸ M⁻¹. La afinidad de un anticuerpo por su antígeno afín también se expresa habitualmente como una constante de disociación K_D, y en ciertas realizaciones, el anticuerpo HuM2e se une específicamente con M2e si se une con una K_D menor de o igual a 10⁻⁴ M, menor de o igual a aproximadamente 10⁻⁵ M, menor de o igual a aproximadamente 10⁻⁶ M, menor de o igual a 10⁻⁷ M, o menor de o igual a 10⁻⁸ M. Las afinidades de los anticuerpos se determinan fácilmente usando técnicas convencionales, por ejemplo las descritas en Scatchard *et al.* (Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 51: 660 (1949)).

Las propiedades de unión de un anticuerpo con antígenos, células o tejidos de los mismos se determinan y se evalúan usando métodos de inmunodetección incluyendo, por ejemplo, ensayos basados en inmunofluorescencia, tales como inmunohistoquímica (IHC) y/o separación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Un anticuerpo que tiene una “característica biológica” de un anticuerpo designado es una que posee una o más de las características biológicas de ese anticuerpo que lo distingue de otros anticuerpos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un anticuerpo con una característica biológica de un anticuerpo designado se une con el mismo epítipo que con el que se une en el anticuerpo designado y/o tiene una función efectora común con el anticuerpo designado.

La expresión anticuerpo “antagonista” se usa en su sentido más amplio e incluye un anticuerpo que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de un epítipo, polipéptido o célula con el que se une específicamente. Los métodos para identificar anticuerpos antagonistas incluyen poner en contacto un polipéptido o célula que se une específicamente con un anticuerpo antagonista candidato con el anticuerpo antagonista candidato y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido o la célula.

Un anticuerpo que “induce apoptosis” es uno que induce muerte celular programada como se determina por la unión de anexina V, fragmentación de ADN, encogimiento celular, dilatación de retículo endoplásmico, fragmentación celular, y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). Preferentemente la célula es una célula infectada. Están disponibles diversos métodos para evaluar los acontecimientos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de fosfatidil serina (PS) puede medirse por unión con anexina; la fragmentación de ADN puede evaluarse mediante marcadores de ADN; y la condensación nuclear/de cromatina junto con fragmentación de ADN se evalúa por cualquier aumento en las células hipodiploides. Preferentemente, el anticuerpo que induce la apoptosis es uno que da como resultado aproximadamente 2 a 50 veces, preferentemente aproximadamente 5 a 50 veces, y más preferentemente aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de unión a anexina en relación con la célula no tratada en un ensayo de unión a anexina.

Las “funciones efectoras” del anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión con C1q y citotoxicidad dependiente de complemento; unión con el receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

- “Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo” o “ADCC” se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretada unida a receptores de Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos Citolíticos Naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente con una célula diana portadora de antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos “arman” a las células citotóxicas y se requieren para dicha destrucción. Las células primarias para mediar en la ADCC, linfocitos NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.500.362 o Patente de Estados Unidos N° 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos Citolíticos Naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se evalúa *in vivo*, por ejemplo en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.*, *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).
- “Receptor de Fc” o “FcR” describe un receptor que se une con la región Fc de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el FcR es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une con un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de las mismas. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático. (véase revisión M. en Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). Se revisan FcRs en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término “FcR” en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternos al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)).
- Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen PBMC, linfocitos NK, monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; prefiriéndose PBMC y linfocitos NK. Las células efectoras se aíslan de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.
- La “citotoxicidad dependiente de complemento” o “CDC” se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta de complemento clásica se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) con anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos con su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se realiza un ensayo CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).
- El término “citomegalovirus”, también conocido como CMV, indica un miembro de la familia del herpes virus en cualquier especie, incluyendo ser humano. El CMV también se denomina un Betaherpesvirinae, porque es un virus del herpes que infecta a células mononucleares y linfocitos.
- La expresión “citomegalovirus humano o HCMV” indica un miembro de la familia CMV que infecta a seres humanos. El HCMV es un herpesvirus humano beta con un tamaño de genoma de 230 Kpb, que codifica más de 70 proteínas virales. El HCMV también se designa como herpesvirus humano 5 (HHV-5).
- Un “mamífero” para fines de tratamiento de una infección, se refiere a cualquier animal, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas, tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.
- “Tratar” o “tratamiento” o “alivio” se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas; en los que el objetivo es prevenir o ralentizar (reducir) la afección o trastorno patológico diana. Las personas que necesiten tratamiento incluyen las que ya tienen el trastorno así como las propensas a tener el trastorno o en las que deba prevenirse el trastorno. Un sujeto o mamífero se “trata” con éxito para una infección si, después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo de acuerdo con los métodos de la presente invención, el paciente muestra una reducción observable y/o medible en o ausencia de uno o más de los siguientes: reducción del número de células infectadas o ausencia de las células infectadas; reducción del porcentaje de células totales que están infectadas; y/o alivio en alguna medida, de uno o más de los síntomas asociados con la infección específica; morbilidad y mortalidad reducidas, y mejora de problemas de calidad de vida. Los parámetros anteriores para evaluar el tratamiento y mejora exitosos en la enfermedad son fácilmente medibles por procedimientos rutinarios con los que está familiarizado un médico.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo o un fármaco eficaz para “tratar” un trastorno o enfermedad en un sujeto o mamífero. Véase la definición precedente de “tratar”.

5 La administración “crónica” se refiere a la administración del agente o los agentes en un modo continuo a diferencia de un modo agudo, para mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo de tiempo prolongado. La administración “intermitente” es un tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

10 La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

15 Los “vehículos” incluyen vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se expone a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Con frecuencia el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución de pH tamponado acuosa. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG) TWEEN™ y PLURONICS™.

25 La expresión “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. Se pretende que la expresión incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, R¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes de intercalación, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos desvelados posteriormente. Otros agentes citotóxicos se describen posteriormente.

35 Un agente “inhibidor del crecimiento” se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, bien *in vitro* o bien *in vivo*. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular, tales como agentes que inducen detención en G1 y detención en fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen los alcaloides de la vinca (vincristina, vinorelbina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también se extienden a detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” por Murakami *et al.* (W B Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados ambos del tejo. El docetaxel (TAXOTERE™, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan microtúbulos evitando la despolimerización, que da como resultado la inhibición de mitosis en células.

50 El “marcador” se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo para generar un anticuerpo “marcado”. El marcador es detectable en sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, cataliza una alteración química de un compuesto o una composición sustrato que es detectable.

55 La expresión “con marcaje epitópico” se refiere a un polipéptido quimérico que incluye un polipéptido fusionado con un “polipéptido marcador”. El polipéptido marcador tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo contra el que puede prepararse un anticuerpo, pero es suficientemente corto de modo que no interfiera con la actividad del polipéptido con el que se fusiona. El polipéptido marcador también es preferentemente bastante único de modo que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos marcadores adecuados generalmente tienen al menos seis restos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácidos).

60 Se define que una “molécula pequeña” tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Dalton.

65 Las expresiones “ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan indistintamente para hacer referencia a ARN, ADN o polímeros mixtos mono o bicatenarios. Los polinucleótidos incluyen secuencias genómicas, secuencias extragenómicas y plasmídicas y segmentos génicos modificados técnicamente más pequeños que expresan, o se adaptan para expresar polipéptidos.

Un “ácido nucleico aislado” es un ácido nucleico que está sustancialmente separado de otras secuencias de ADN del genoma así como proteínas o complejos tales como ribosomas y polimerasas, que acompañan de forma natural una secuencia activa. La expresión abarca una secuencia de ácido nucleico que se ha retirado de su ambiente de origen natural, e incluye aislados de ADN recombinante o clonado y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos. Un ácido nucleico sustancialmente puro incluye formas aisladas del ácido nucleico. Por supuesto, esto se refiere al ácido nucleico como se aisló originalmente y no excluye genes o secuencias añadidas posteriormente al ácido nucleico aislado por la mano del hombre.

El término “polipéptido” se usa en su significado convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no se limitan a una longitud específica del producto. Se incluyen péptidos, oligopéptidos y proteínas dentro de la definición de polipéptido, y dichos términos se usan indistintamente a no ser que se indiquen específicamente de otro modo. Este término tampoco se refiere a ni excluye modificaciones post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones o similares, así como otras modificaciones conocidas en este campo, tanto de origen natural como de origen no natural. Un polipéptido puede ser una proteína completa, o una subsecuencia de la misma. Los polipéptidos particulares de interés en el contexto de la presente invención son subsecuencias de aminoácidos que incluyen CDR y que son capaces de unirse con CMV o una célula infectada por CMV.

Un “polipéptido aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o se ha recuperado de un componente de su ambiente natural. En realizaciones preferidas, el polipéptido aislado se purificará (1) a más del 95 % en peso del polipéptido como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente más del 93 % en peso (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta su homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie, o, preferentemente, tinción de plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del polipéptido no está presente. Habitualmente, sin embargo, el polipéptido aislado se prepara por al menos una etapa de purificación.

Un polinucleótido de “secuencia nativa” es uno que tiene la misma secuencia de nucleótidos que un polinucleótido derivado de la naturaleza. Un polipéptido de “secuencia nativa” es uno que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) derivado de la naturaleza (por ejemplo, de cualquier especie). Dichos polinucleótidos y polipéptidos de secuencia nativa se aíslan de la naturaleza o se producen por medios recombinantes o sintéticos.

Una “variante” polinucleotídica es un polinucleótido que difiere típicamente de un polinucleótido desvelado específicamente en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes son de origen natural o se generan de forma sintética, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias polinucleotídicas de la invención y evaluando una o más actividades biológicas del polipéptido codificado como se describe en el presente documento y/o usando cualquiera de varias técnicas bien conocidas en este campo.

Una variante “polipeptídica” es un polipéptido que difiere típicamente de un polipéptido desvelado específicamente en el presente documento en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse de forma sintética, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias polipeptídicas anteriores de la invención y evaluando una o más actividades biológicas del polipéptido como se describe en el presente documento y/o usando cualquiera de varias técnicas bien conocidas en este campo.

Se realizan modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención y se obtiene aún una molécula funcional que codifica un polipéptido variante o derivado con características deseables. Cuando se desea alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear una variante equivalente, o incluso una mejorada, o parte de un polipéptido de la invención, un experto en la materia típicamente cambia uno o más de los codones de la secuencia de ADN codificante.

Por ejemplo, ciertos aminoácidos sustituyen a otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de su capacidad para unirse con otros polipéptidos (por ejemplo, antígenos) o células. Ya que es la capacidad de unión y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de esa proteína, pueden realizarse ciertas sustituciones de secuencias de aminoácidos en una secuencia proteica y, por supuesto, su secuencia codificante de ADN subyacente, y no obstante obtener una proteína con propiedades similares. Se contempla por lo tanto que se realicen diversos cambios en las secuencias peptídicas de las composiciones desveladas, o secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos péptidos sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica.

En muchos casos, una variante polipeptídica contiene una o más sustituciones conservativas. Una “sustitución conservativa” es una en la que un aminoácido sustituye a otro aminoácido que tiene propiedades similares, de modo que un experto en la materia de la química peptídica esperaría que la estructura secundaria y naturaleza hidropática del polipéptido permanecieran sustancialmente sin cambios.

Al realizar dichos cambios, se tiene en cuenta el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de aminoácidos al conferir la función biológica interactiva en una proteína se entiende en general en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. Se ha asignado a cada aminoácido un índice hidropático basándose en su hidrofobicidad y características de carga (Kyte y Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Se sabe en la técnica que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen una puntuación o índice hidropático similar y da como resultado aún una proteína con una actividad biológica similar, es decir obtener aún una proteína biológica funcionalmente equivalente. Al realizar dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están en un intervalo de ± 2 , se prefieren particularmente los que están en un intervalo de ± 1 , y se prefieren aún más particularmente los que están en un intervalo de $\pm 0,5$. También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse eficazmente basándose en la hidrofilia. La Patente de Estados Unidos 4.154.101 indica que el mayor promedio local de hidrofilia de una proteína, como se determina por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína.

Como se detalla en la Patente de Estados Unidos 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a los restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1); glutamato (+3,0 \pm 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 \pm 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede sustituir a otro que tenga un valor de hidrofilia similar y obtener aún una proteína biológicamente equivalente, y en particular, una inmunológicamente equivalente. En dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia están en un intervalo de ± 2 , se prefieren particularmente los que están en un intervalo de ± 1 , y se prefieren aún más particularmente los que están en el intervalo de $\pm 0,5$.

Como se ha indicado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan en general por lo tanto en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofilia, carga, tamaño y similares. Los expertos en la materia conocen bien sustituciones ejemplares que tienen en cuenta diversas de las características anteriores e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Se realizan adicionalmente sustituciones de aminoácidos basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabezas polares sin carga que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservativos incluyen (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. Una variante también, o como alternativa, puede contener cambios no conservativos. En una realización preferida, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia nativa por sustitución, delección o adición de cinco aminoácidos o menos. Las variantes también (o como alternativa), se modifican, por ejemplo, mediante la delección o adición de aminoácidos que tienen mínima influencia en la inmunogenicidad, estructura secundaria y naturaleza hidropática del polipéptido.

Los polipéptidos incluyen una secuencia señal (o líder) en el extremo N terminal de la proteína, que dirige de forma co-traduccional o post-traduccional la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede conjugarse, por ejemplo, fusionarse en fase con un enlazador u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His), o para potenciar la unión del polipéptido con un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido se conjuga con una región Fc de inmunoglobulina.

Cuando se comparan secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas, se dice que dos secuencias son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de las dos secuencias es la misma cuando se alinean para máxima correspondencia, como se describe posteriormente. Se realizan típicamente comparaciones entre dos secuencias comparando las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, habitualmente de 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en el que una secuencia se compara con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de alinearse óptimamente las dos secuencias.

Puede realizarse alineamiento óptimo de secuencias para comparación usando el programa Megalign en el conjunto

de programas de Bioinformática Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando los parámetros por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins-Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Supl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5: 151-153; Myers, E.W. y Muller W. (1988) CABIOS 4: 11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor 11: 105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4: 406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J. (1983) Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80: 726-730.

Como alternativa, se realiza alineamiento óptimo de secuencias para comparación mediante el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman (1981) Add. APL. Math 2: 482, mediante el algoritmo de identidad de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, mediante los métodos de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Un ejemplo preferido de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de secuencia de identidad de secuencia y de similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 que se describen en Altschul *et al.* (1977) Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402 y Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410, respectivamente. Se usan BLAST y BLAST 2.0 por ejemplo, con los parámetros descritos en el presente documento para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los polinucleótidos y polipéptidos de la invención. El software para realizar análisis de BLAST está públicamente disponible a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

En un ejemplo ilustrativo, se calculan puntuaciones acumuladas usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para restos desapareados; siempre <0). La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada cae por la cantidad X desde su valor máximo obtenido; la puntuación acumulada llega hasta cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST, W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, y expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915), alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas.

Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada cae por la cantidad X desde su valor máximo obtenido; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros del algoritmo de BLAST, W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento.

En un enfoque, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en las que la parte de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos, habitualmente del 5 al 15 por ciento, o del 10 al 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en la que aparecen bases de ácido nucleico o restos de aminoácidos idénticos en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando los resultados por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

"Homología" se refiere al porcentaje de restos en la variante de secuencia polinucleotídica o polipeptídica que son idénticos a la secuencia no variante después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el porcentaje máximo de homología. En realizaciones particulares, las variantes polinucleotídicas y polipeptídicas tienen al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de homología de polinucleótido o polipéptido con un polinucleótido o polipéptido descrito en el presente documento.

El "vector" incluye vectores lanzadera y de expresión. Típicamente, la construcción plasmídica también incluirá un origen de replicación (por ejemplo, el origen de replicación ColEI) y un marcador seleccionable de (por ejemplo, resistencia a ampicilina o tetraciclina), para replicación y selección, respectivamente, de los plásmidos en bacterias. Un "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene las secuencias de control o elementos reguladores

necesarios para la expresión de los anticuerpos incluyendo fragmento de anticuerpo de la invención, en células bacterianas o eucariotas. Se desvelan posteriormente vectores adecuados.

5 Como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un" y "el" incluyen referencias plurales a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa.

Anticuerpos

10 La presente invención también desvela anticuerpos específicos de CMV y CMV incluyendo un polipéptido de la presente invención, incluyendo los polipéptidos codificados por una secuencia polinucleotídica expuesta en el Ejemplo 1 y secuencias de aminoácidos expuestas en el Ejemplo 1 y la Figura 1, y fragmentos y variantes de los mismos. En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo designado en el presente documento 2F10, 2M16, 2N9, 3C21, 4P12, 5P9 o 9C16. Estos anticuerpos se unen preferentemente con o se unen específicamente con células infectadas por CMV en comparación con células de control no infectadas del mismo tipo celular. En aspectos 15 preferidos, estos anticuerpos se unen con la glucoproteína B (gB) de CMV. En realizaciones particulares, los anticuerpos de la presente invención se unen con el sitio I del epítipo AD2 de gp116 de CMV que tiene la secuencia de aminoácidos SHRANETIYNTTLKYGDTTGTNTTK (SEC ID N°: 31).

20 Como se entenderá por el experto en la materia, la descripción general de anticuerpos del presente documento y métodos para preparar y usar los mismos también se aplican a constituyentes polipeptídicos de anticuerpo individuales y fragmentos de anticuerpo.

25 Los anticuerpos desvelados en el presente documento son anticuerpos policlonales o monoclonales. Sin embargo, en aspectos preferidos, son monoclonales. En aspectos particulares, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos humanos. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales y se describen en general, en la Patente de Estados Unidos N° 6.824.780. Típicamente, los anticuerpos de la presente invención se producen de forma recombinante, usando vectores y métodos disponibles en la técnica, como se describe adicionalmente posteriormente. También se generan anticuerpos humanos por linfocitos B activados *in vitro* (véase Patentes de Estados Unidos N° 5.567.610 y 5.229.275).

30 También se producen anticuerpos humanos en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de región de unión de cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones mutantes de línea germinal y quiméricos da como resultado la inhibición completa de la producción 35 de anticuerpo endógena. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno., 7: 33 (1993); Patentes de Estados Unidos N° 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todos de Gen-Pharm); Patente de Estados Unidos N° 5.545.807; y documento 40 WO 97/17852. Dichos animales se modifican por ingeniería genética para producir anticuerpos humanos incluyendo un polipéptido de la presente invención.

45 En ciertos aspectos, los anticuerpos de la presente divulgación son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias derivadas de fuentes tanto humanas como no humanas. En aspectos particulares, estos anticuerpos quiméricos son humanizados o primatized™. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

50 En el contexto de la presente divulgación, los anticuerpos quiméricos también incluyen anticuerpos completamente humanos en los que la región hipervariable humana o una o más CDR se conservan, pero se han reemplazado una o más regiones de secuencia adicionales por secuencias correspondientes de un animal no humano.

55 La elección de secuencias no humanas, tanto ligeras como pesadas, para usar en la preparación de los anticuerpos quiméricos es importante para reducir la antigenicidad y respuestas de anticuerpo humano anti no humano cuando se pretende que el anticuerpo sea para uso terapéutico humano. Es importante además que los anticuerpos quiméricos conserven afinidad de alta unión por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferido, se preparan anticuerpos quiméricos por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos quiméricos conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias humanas y no humanas parentales. Están disponibles habitualmente y los 60 expertos en la materia están familiarizados con modelos de inmunoglobulina tridimensionales. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse con su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse restos de FR y combinarse de las secuencias receptoras e importadas de modo 65 que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos

diana. En general, los restos de región hipervariable están implicados directamente y más sustancialmente en la modificación de la unión a antígeno.

5 Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos (o inmunoglobulinas) pueden dividirse en cinco clases diferentes, basándose en diferencias en las secuencias de aminoácidos en la región constante de las cadenas pesadas. Todas las inmunoglobulinas dentro de una clase dada tienen regiones constantes de cadena pesada muy similares. Estas diferencias pueden detectarse por estudios de secuencia o más habitualmente por medios serológicos (es decir mediante el uso de anticuerpos dirigidos a estas diferencias). Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la presente invención son de cualquier clase, y pueden, por lo tanto, tener una cadena pesada 10 gamma, mu, alfa, delta o épsilon. Una cadena gamma es gamma 1, gamma 2, gamma 3 o gamma 4; y una cadena alfa es alfa 1 o alfa 2.

15 En una realización preferida, un anticuerpo de la presente invención, o fragmento del mismo, es un IgG. IgG se considera la inmunoglobulina más versátil, porque es capaz de llevar a cabo todas las funciones de las moléculas de inmunoglobulina. IgG es la Ig principal en suero, y la única clase de Ig que cruza la placenta. IgG también fija el complemento, aunque la subclase IgG4 no. Los macrófagos, monocitos, PMN y algunos linfocitos tienen receptores de Fc para la región Fc de IgG. No todas las subclases se unen igual de bien; IgG2 e IgG4 no se unen con receptores de Fc. Una consecuencia de la unión con los receptores de Fc en PMN, monocitos y macrófagos es que la célula puede internalizar ahora mejor el antígeno. IgG es una opsonina que potencia la fagocitosis. La unión de 20 IgG con receptores de Fc en otros tipos de células da como resultado la activación de otras funciones. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser de cualquier subclase de IgG.

25 En otra realización preferida, un anticuerpo, o fragmento del mismo, de la presente invención es un IgE. IgE es la Ig menos común en el suero ya que se une muy estrechamente con receptores de Fc en basófilos y mastocitos incluso antes de interactuar con el antígeno. Como consecuencia de su unión con basófilos y mastocitos, IgE está implicado en reacciones alérgicas. La unión del alérgeno con el IgE en las células da como resultado la liberación de diversos mediadores farmacológicos que dan como resultado síntomas alérgicos. IgE también desempeña un papel en enfermedades de helmintos parasitarios. Los eosinófilos tienen receptores de Fc para IgE y la unión de eosinófilos con helmintos recubiertos con IgE da como resultado la destrucción del parásito. IgE no fija el 30 complemento.

35 En diversas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención, y fragmentos de los mismos, contienen una cadena ligera variable que es kappa o lambda. La cadena lambda es de cualquier subtipo, incluyendo, por ejemplo, lambda 1, lambda 2, lambda 3 y lambda 4.

40 Como se ha observado anteriormente, la presente invención proporciona además fragmentos de anticuerpo que incluyen un polipéptido de la presente invención. En ciertas circunstancias existen ventajas para el uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. Por ejemplo, el menor tamaño de los fragmentos permite una rápida eliminación, y conduce a acceso mejorado a ciertos tejidos, tales como tumores sólidos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen: fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

45 Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se han derivado mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv pueden todos expresarse en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 50 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse fragmentos F(ab')₂ directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Se describen fragmentos Fab y F(ab')₂ con semivida *in vivo* aumentada incluyendo restos de epítopos de unión a un receptor de recuperación en la Patente de Estados Unidos N° 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para el experto en la materia.

55 En otras realizaciones, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase documento WO 93/16185; Patentes de Estados Unidos N° 5.571.894; y 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes. Por lo tanto, son adecuados para unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión sFv para producir fusión de una proteína efectora en el extremo amino o el carboxilo terminal de un sFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, mencionado anteriormente. El fragmento de anticuerpo también es un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

65 En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención son biespecíficos o multiespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes.

Los anticuerpos biespecíficos ejemplares se unen con dos epítopos diferentes de un único antígeno. Otros de estos anticuerpos combinan un primer sitio de unión a antígeno con un sitio de unión para un segundo antígeno. Como alternativa, una rama anti CMV se combina con una rama que se une con una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD3), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), para centrar y localizar los mecanismos de defensa celular en la célula infectada. También se usan anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células infectadas. Estos anticuerpos poseen una rama de unión a CMV y una rama que se une con el agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti interferón α , alcaloide de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Se preparan anticuerpo biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti ErbB2/anti FcγRIII y la Patente de Estados Unidos N° 5.837.234 desvela un anticuerpo biespecífico anti ErbB2/anti FcγRI. Se muestra un anticuerpo biespecífico anti ErbB2/Fc α en el documento WO98/02463. La Patente de Estados Unidos N° 5.821.337 enseña un anticuerpo biespecífico anti ErbB2/anti CD3.

Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la clasificación aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se realiza por etapas de cromatografía de afinidad, es más bien complicada, y los rendimientos de productos son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, se fusionan dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferentemente, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de Ig, que incluye al menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para enlace con cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Se insertan ADN que codifican fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en una célula hospedadora adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas polipeptídicas en un único vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no tienen un efecto significativo en el rendimiento de la combinación de cadena deseada.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solamente la mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo de separación fácil. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse técnicamente para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio C_H 3. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se acopla con avidina, el otro con biotina. Se ha propuesto que dichos anticuerpos, por ejemplo, dirigen células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980) y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Se preparan anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes de entrecruzamiento convenientes se conocen bien en la técnica, y se desvelan en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

También se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden de forma proteolítica anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente que forman complejo con ditiol, arsenita sódica, para estabilizar ditioles vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte después al Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que puede acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizada. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse con células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron con las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita en Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado con un V_L por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a los dominios V_H y V_L de un fragmento a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se han indicado otra estrategia para realizar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv). Véase Gruber *et al.*, J. Immunol., 152: 5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se preparan anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147: 60 (1991). Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno con el que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos multivalentes con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente por expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente contiene un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido incluye una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo contiene una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales de la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido incluye de tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente incluye al menos una cadena polipeptídica (y preferentemente dos cadenas polipeptídicas), en la que la cadena o las cadenas polipeptídicas contienen dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas incluyen VD1-(X1)_n, -VD2-(X2)_n-Fc, en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas incluyen: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente incluye además preferentemente al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente, por ejemplo, contiene de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento incluyen un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, contienen además un dominio C_L.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen además anticuerpos monocatenarios.

En realizaciones particulares, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos de internalización.

Se contemplan una modificación o modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, se mejoran la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en un polinucleótido que codifica el anticuerpo, o una cadena del mismo, o por síntesis peptídica. Las modificaciones ejemplares incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se realiza cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar al anticuerpo final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar procesos posttraduccionales del anticuerpo, tales como cambiar el

número de posición de sitios de glucosilación. Se incluye cualquiera de las variaciones y modificaciones descritas anteriormente para polipéptidos de la presente invención en anticuerpos de la presente invención.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones de un anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe en Cunningham y Wells en *Science*, 244: 1081-1085 (1989). En el presente documento, se identifican un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido con carga negativa o neutro (más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con antígeno PSCA. Las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo otras variantes o variantes adicionales en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza exploración de ala o mutagénesis aleatoria en el codón o la región diana y las variantes anti anticuerpo expresadas se exploran con respecto a la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en su longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de un anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N o C terminal del anticuerpo con una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Se contemplan sustituciones conservativas y no conservativas.

Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral.

Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también se sustituye, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el entrecruzamiento aberrante. Por el contrario, se añaden un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental. Generalmente, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tienen propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental del que se generan. Un modo conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica maduración de afinidad usando presentación de fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de este modo se presentan de una manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se exploran después con respecto a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Para identificar sitios de región hipervariable candidatos para modificación, se realiza mutagénesis de exploración de alanina para identificar restos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión con antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, se analiza una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y un antígeno o célula infectada. Estos restos de contacto y restos cercanos son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas desarrolladas en el presente documento. Una vez que se han generado estas variantes, el panel de variantes se somete a exploración como se describe en el presente documento y se seleccionan anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por alterar se entiende suprimir uno o más restos de carbohidrato hallados en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de anticuerpos es típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de una de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-

hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también se realiza mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

El anticuerpo de la invención se modifica con respecto a su función efectora, por ejemplo, para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, se introducen un resto o restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener capacidad de internalización mejorada y/o destrucción celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas. Véase Caron *et al.*, J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). También se preparan anticuerpos homodiméricos con actividad antiinfección potenciada usando agentes de reticulación heterobifuncionales como se describen en Wolff *et al.*, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, se modifica técnicamente un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y por lo tanto puede tener lisis del complemento y capacidades de ADCC potenciadas. Véase Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

Para aumentar la semivida en suero de un anticuerpo, se incorpora un epítipo de unión a receptor de recuperación en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.739.277, por ejemplo. La expresión "epítipo de unión a receptor de recuperación" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula IgG.

Los anticuerpos de la presente invención también se modifican para incluir un marcador o etiqueta de epítipo, por ejemplo, para su uso en aplicaciones de purificación o diagnóstico. La invención también se refiere a terapia con inmunoconjugados incluyendo un anticuerpo conjugado con un agente antineoplásico tal como un agente citotóxico o un agente inhibidor de crecimiento. Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados.

También se contemplan en el presente documento conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, auristatina, un tricoteno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

En una realización preferida, un anticuerpo (longitud completa o fragmentos) de la invención se conjuga con una o más moléculas de maitansinoides. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto Africano oriental *Maytenus serrata* (Patente de Estados Unidos Nº 3.896.111). Posteriormente, se ha descubierto que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (Patente de Estados Unidos Nº 4.151.042). Se desvelan maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

En un intento de mejorar su índice terapéutico, se han conjugado maitansina y maitansinoides con anticuerpos que se unen específicamente con antígenos de células tumorales. Se desvelan inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.208.020, 5.416.064 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describió inmunoconjugados que incluían un maitansinoide designado DM1 unido con el anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para células de cáncer de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*.

Se preparan conjugados de anticuerpo-maitansinoide uniendo químicamente un anticuerpo con una molécula de maitansinoide sin reducir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula de maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por cada molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en la potenciación de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, incluso aunque se esperaría que una molécula de toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Se conocen bien en la técnica maitansinoides y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se desvelan maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones no de patente indicadas anteriormente en el presente documento. Son maitansinoides preferidos maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para realizar conjugados de anticuerpo, incluyendo, por

ejemplo, los desvelados en la Patente de Estados Unidos N° 5.208.020 o Patente de EP 0 425 235 B1 y Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos de enlace incluyen grupos de disulfuro, grupos de tioéter, grupos lábiles por ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles por peptidasa o grupos lábiles por esterasa, como se desvela en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose grupos de disulfuro y tioéter.

Se realizan inmunoconjugados usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis-(*p*-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173: 723-737 [1978]) y *N*-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro. Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietiltri-aminopentaacético marcado con Carbono 14 (MX-DTPA) es una gente quelante ejemplar para conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase documento WO94/11026. El enlazador es un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil por ácido, (Cancer Research 52: 127-131 (1992); Patente de Estados Unidos N° 5.208.020).

Otro inmunoconjugado de interés incluye un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de caliqueamicina de antibióticos es capaz de producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véase Patentes de Estados Unidos N° 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Otro fármaco con el que se conjuga el anticuerpo es el antifolato, QFA. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes mediante internalización mediada por anticuerpo potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

Los ejemplos de otros agentes que se conjugan con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de Estados Unidos N° 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (Patente de Estados Unidos N° 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se usan incluyen, por ejemplo, cadena de difteria A, fragmentos activos no de unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, documento WO 93/21232.

La presente invención abarca además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Para destrucción selectiva de células infectadas, el anticuerpo contiene un átomo altamente radiactivo. Se dispone de una diversidad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos anti-PSCA radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Rn¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para diagnóstico, contienen un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo tc^{99m} o I¹²³, o un marcador de espín para captura de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como captura de imágenes de resonancia magnética, irm), tal como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

El radiomarcador u otro marcador se incorporan en el conjugado por medios conocidos. Por ejemplo, el péptido se biosintetiza o sintetiza por síntesis de aminoácidos química usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Se unen marcadores tales como tc^{99m} o I¹²³, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸ e In¹¹¹ mediante un resto de cisteína en el péptido. Puede unirse Itrio-90 mediante un resto de lisina. El método IODOGEN (Fraker *et al.* (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) se usa para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros método en detalle.

Como alternativa, se prepara una proteína de fusión que incluye el anticuerpo y agente citotóxico, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis peptídica. El tramo de ADN incluye regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado bien adyacentes entre sí o bien separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

Los anticuerpos de la presente invención también se usan en terapia de profármaco mediada por enzima

dependiente de anticuerpo (ADEPT) conjugando un anticuerpo con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase documento WO81/01145) en un fármaco antineoplásico activo (véase, por ejemplo, documento WO 88/07378 y Patente de Estados Unidos N° 4.975.278).

El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar en un profármaco de tal manera que lo convierta en su forma más activa, citotóxica. Las enzimas que son útiles en el método de la presente invención incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco antineoplásico, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de *serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptido en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que escinden carbohidratos tales como β -galactosidasa y neuroaminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasa, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos de fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Pueden prepararse conjugados de anticuerpo-abzima como se describe en el presente documento para suministro de la abzima a una población celular infectada.

Las enzimas de la presente invención se unen covalentemente con los anticuerpos por técnicas bien conocidas en este campo tales como el uso de los reactivos de reticulación heterobifuncionales analizados anteriormente. Como alternativa, se construyen proteínas de fusión incluyendo al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención unida con al menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la invención usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en este campo (véase, por ejemplo, Neuberger *et al.*, Nature, 312: 604-608 (1984)).

Se contemplan en el presente documento otras modificaciones del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo se une con uno de una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también se atrapa en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente), en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Los anticuerpos desvelados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o un tensioactivo que es útil para el suministro de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de membranas biológicas. Se preparan liposomas que contienen el anticuerpo por métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); Patentes de Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545; y documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Se desvelan liposomas con tiempo de circulación potenciado en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.556.

Se generan liposomas particularmente útiles por el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que incluye fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Se extruyen liposomas a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Pueden conjugarse fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención con los liposomas como se describe en Martin *et al.*, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) mediante reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está contenido opcionalmente dentro del liposoma. Véase Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989).

Los anticuerpos de la presente invención, o fragmentos de los mismos, pueden poseer cualquiera de una diversidad de características biológicas o funcionales. En ciertas realizaciones, estos anticuerpos son anticuerpos específicos de CMV, lo que indica que se unen específicamente con o se unen preferentemente con CMV o HCMV, respectivamente, en comparación con otros virus.

En realizaciones particulares, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo antagonista, que bloquea o inhibe parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido o célula con el que se une específica o preferentemente. En otras realizaciones, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo inhibidor del crecimiento, que bloquea o inhibe parcial o completamente el crecimiento de una célula infectada con la que se une. En otra realización, un anticuerpo de la presente invención induce apoptosis. En otra realización más, un anticuerpo de la presente invención induce o promueve citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo o

citotoxicidad dependiente de complemento.

Polinucleótidos

5 La presente invención, en otros aspectos, desvela composiciones de polinucleótidos. En realizaciones preferidas, estos polinucleótidos codifican un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, una región de una cadena variable de un anticuerpo que se une con CMV. Como se reconocerá también por el experto en la materia, los polinucleótidos de la invención son monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARN^h, que
10 contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN una a una, y moléculas de ARN^m, que no contienen intrones. Pueden estar presentes, pero no es necesario, secuencias codificantes o no codificantes adicionales dentro de un polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede estar unido, pero no es necesario, con otras moléculas y/o materiales de apoyo. Se usan polinucleótidos de la presente invención, por ejemplo, en ensayos de hibridación para detectar la presencia de un anticuerpo específico de CMV en una muestra biológica, y en la
15 producción recombinante de polipéptidos de la presente invención.

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se desvelan composiciones de polinucleótidos que incluyen parte de o toda una secuencia polinucleotídica expuesta en el Ejemplo 1, complementos de una secuencia polinucleotídica expuesta en el Ejemplo 1, y variantes degradadas de una secuencia polinucleotídica expuesta en el Ejemplo 1. En ciertos aspectos preferidos, las secuencias polinucleotídicas expuestas en el presente documento codifican polipéptidos capaces de unirse preferentemente con una célula infectada por CMV en comparación con una célula no infectada de control normal, incluyendo un polipéptido que tiene una secuencia expuesta en el Ejemplo 1 o la Figura 1. Además, la presente invención contempla todos los polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido de la presente invención.
20

25 En otras realizaciones relacionadas, las variantes de polinucleótidos de la presente invención que tienen identidad sustancial con las secuencias expuestas en el Ejemplo 1 (o una parte de las mismas que codifican una región variable o dominio funcional), por ejemplo, las que incluyen al menos 70 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más identidad de secuencia en comparación con una secuencia polinucleotídica de la presente divulgación (o fragmento de la misma que codifica una región variable o dominio funcional de un polipéptido de la presente invención), como se determina usando los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, análisis de BLAST usando parámetros convencionales). Un experto en la materia reconocerá que estos valores pueden ajustarse apropiadamente para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración codónica, similitud de aminoácidos, situación en la fase de lectura, y similares.
30
35

Típicamente, las variantes de polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, preferentemente de modo que las propiedades de unión inmunogénicas del polipéptido codificado por el polinucleótido de variante no se reduzcan sustancialmente en relación con un polipéptido codificado por una secuencia polinucleotídica expuesta específicamente en el presente documento.
40

En aspectos adicionales, la presente invención desvela fragmentos polinucleotídicos que incluyen diversas longitudes de tramos contiguos de secuencia idéntica a o complementaria de una o más de las secuencias desveladas en el presente documento. Por ejemplo, se desvelan polinucleótidos que incluyen al menos aproximadamente 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 o 1000 o más nucleótidos contiguos de una o más de las secuencias desveladas en el presente documento así como todas las longitudes intermedias entre ellas. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores indicados, tales como 16, 17, 18, 19, etc.; 21, 22, 23, etc.; 30, 31, 32, etc.; 50, 51, 52, 53, etc.; 100, 101, 102, 103, etc.; 150, 151, 152, 153, etc.; incluyendo todos los números enteros hasta 200-500; 500-1.000, y similares.
45
50

En otro aspecto de la invención, se desvelan composiciones de polinucleótidos que son capaces de hibridar en condiciones de rigurosidad moderada a alta con una secuencia polinucleotídica proporcionada en el presente documento, o un fragmento de la misma, o una secuencia complementaria de la misma. Se conocen bien en el campo de la biología molecular técnicas de hibridación. Para fines de ilustración, las condiciones moderadamente rigurosas adecuadas para ensayar la hibridación de un polinucleótido de la presente divulgación con otros polinucleótidos incluyen prelavar en una solución de SSC 5 X, SDS 0,5 %. EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridar a 50 °C-60 °C, SSC 5 X, durante una noche; seguido de lavar dos veces a 65 °C durante 20 minutos con cada uno de SSC 2X, 0,5X y 0,2X que contiene SDS 0,1 %. Un experto en la materia entenderá que la rigurosidad de la hibridación puede manipularse fácilmente, tal como alterando el contenido de sal de la solución de hibridación y/o la temperatura a la que se realiza la hibridación. Por ejemplo, en otra realización, las condiciones de hibridación altamente rigurosas adecuadas incluyen las descritas anteriormente, con la excepción de que aumenta la temperatura de hibridación, por ejemplo, a 60-65 °C o 65-70 °C.
55
60

En aspectos preferidos, el polipéptido codificado por la variante polinucleotídica o fragmento tiene la misma especificidad de unión (es decir, se une específica o preferentemente con CMV) que el polipéptido codificado por el polinucleótido nativo. En ciertos aspectos preferidos, los polinucleótidos descritos anteriormente, por ejemplo,
65

variantes polinucleotídicas, fragmentos y secuencias de hibridación, codifican polipéptidos que tienen un nivel de actividad de unión de al menos aproximadamente 50 %, preferentemente al menos aproximadamente 70 %, y más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de la de una secuencia polipeptídica expuesta específicamente en el presente documento.

5 Los polinucleótidos, o fragmentos de los mismos, independientemente de la longitud de la secuencia codificante en sí misma, se combinan con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiples, otros segmentos codificantes, y similares, de modo que su longitud general varía considerablemente. Se emplea un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando la longitud total preferentemente limitada por el caso de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante pretendido. Por ejemplo, son útiles segmentos de polinucleótidos ilustrativos con longitudes totales de aproximadamente 10.000, aproximadamente 5000, aproximadamente 3000, aproximadamente 2.000, aproximadamente 1.000, aproximadamente 500, aproximadamente 200, aproximadamente 100, aproximadamente 50 pares de bases de longitud, y similares (incluyendo todas las longitudes intermedias) en muchas implementaciones de la presente invención.

20 Los expertos en la materia apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos portan una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, se contemplan específicamente por la presente invención polinucleótidos que codifican un polipéptido de la presente invención pero que varían debido a diferencias en el uso codónico. Además, los alelos de los genes que incluyen las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento están dentro del alcance de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y proteína resultantes pueden tener, pero no es necesario, una estructura o función alterada. Se identifican alelos usando técnicas convencionales (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias de base de datos).

30 En ciertos aspectos, los inventores contemplan la mutagénesis de las secuencias polinucleotídicas desveladas para alterar una o más propiedades del polipéptido codificado, tales como su especificidad de unión o fuerza de unión. Se conocen bien en este campo técnicas para mutagénesis, y se usan ampliamente para crear variantes tanto de polipéptidos como de polinucleótidos. Se emplea un enfoque de mutagénesis, tal como mutagénesis específica, para la preparación de variantes y/o derivados de los polipéptidos descritos en el presente documento. Por este enfoque, se realizan modificaciones específicas en una secuencia polipeptídica mediante mutagénesis de los polinucleótidos subyacentes que las codifican. Estas técnicas proporcionan un enfoque sencillo para preparar y ensayar variantes de secuencia, por ejemplo, incorporando una o más de las consideraciones anteriores, introduciendo uno o más cambios de secuencia de nucleótidos en el polinucleótido.

40 La mutagénesis específica permite la producción de mutantes mediante el uso de secuencias oligonucleotídicas específicas que incluyen la secuencia de nucleótidos de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebador de tamaño y complejidad de secuencias suficientes para formar una doble cadena estable en ambos lados del punto de unión de deleción que se atraviesa. Se emplean mutaciones en una secuencia polinucleotídica seleccionada para mejorar, alterar, reducir, modificar o cambiar de otro modo las propiedades del polinucleótido en sí mismo, y/o alterar las propiedades, actividad, composición, estabilidad o secuencia primaria del polipéptido codificado.

45 En otros aspectos, las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento se usan como sondas o cebadores para hibridación de ácido nucleico, por ejemplo, como cebadores de PCR. La capacidad de dichas sondas de ácido nucleico para hibridar específicamente con una secuencia de interés permitirá que sean útiles en la detección de la presencia de secuencias complementarias en una muestra dada. Sin embargo, también se prevén otros usos, tales como el uso de la información de secuencia para la preparación de cebadores de especies mutantes o cebadores para su uso en la preparación de otras construcciones genéticas. Como tales, se contempla que los segmentos de ácido nucleico que incluyen una región de secuencia de una secuencia contigua de al menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud que tiene la misma secuencia que, o es complementaria de, una secuencia contigua de 15 nucleótidos de longitud desvelada en el presente documento son particularmente útiles.

50 También se usan en ciertas realizaciones secuencias idénticas o complementarias contiguas más largas, por ejemplo, las de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000 (incluyendo todas las longitudes intermedias) e incluso hasta secuencias de longitud completa.

60 Se contemplan particularmente moléculas polinucleotídicas que tienen regiones de secuencia que incluyen tramos de nucleótidos contiguos de 10-14, 15-20, 30, 50 o incluso de 100-200 nucleótidos o similares (incluyendo longitudes intermedias también), idénticas o complementarias de una secuencia polinucleotídica desvelada en el presente documento, como sondas de hibridación para su uso en, por ejemplo, transferencia de Southern y Northern, y/o cebadores para su uso, por ejemplo, en la región en cadena de la polimerasa (PCR). El tamaño total del fragmento, así como el tamaño del tramo o los tramos complementarios, dependerán en última instancia del uso pretendido o aplicación del segmento de ácido nucleico particular. Se usan fragmentos más pequeños en realizaciones de hibridación, en las que la longitud de la región complementaria contigua puede variarse, tal como entre

aproximadamente 15 y aproximadamente 100 nucleótidos, pero pueden usarse tramos de complementariedad contigua mayores, de acuerdo con la longitud de secuencias complementarias para detectar.

El uso de una sonda de hibridación de aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud permite la formación de una molécula bicatenaria que es tanto estable como selectiva. Generalmente se prefieren moléculas que tienen secuencias complementarias contiguas sobre tramos mayores de 12 bases de longitud, sin embargo, para aumentar la estabilidad y selectividad del híbrido, y por lo tanto mejorar la calidad y grado de las moléculas híbridas específicas obtenidas. Se prefieren moléculas de ácido nucleico que tengan tramos complementarios del gen de 15 a 25 nucleótidos contiguos, o incluso más largos.

Se seleccionan sondas de hibridación de cualquier parte de cualquiera de las secuencias desveladas en el presente documento. Todo lo que se requiere es revisar las secuencias expuestas en el presente documento, o para cualquier parte continua de las secuencias, de aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud hasta e incluyendo la secuencia de longitud completa, que se desea utilizar como una sonda o cebador. La elección de secuencias de sonda y cebador puede estar gobernada por diversos factores. Por ejemplo, se puede desear emplear cebadores más cercanos al extremo de la secuencia total.

Se preparan polinucleótidos, o fragmentos o variantes de los mismos, fácilmente, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento por medios químicos, como se practica habitualmente usando un sintetizador de oligonucleótidos automático. Además, pueden obtenerse fragmentos mediante la aplicación de tecnología de reproducción de ácido nucleico, tal como la tecnología de PCR™ de la Patente de Estados Unidos 4.683.202, introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para producción recombinante, y por otras técnicas de ADN recombinante conocidas en general por los expertos en la materia de la biología molecular.

Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

La invención desvela vectores y células hospedadoras que incluyen un ácido nucleico de la presente invención, así como técnicas recombinantes para la producción de un polipéptido de la presente invención. Los vectores de la invención incluyen los capaces de replicar en cualquier tipo de célula u organismo, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, fagos, cósmidos y minicromosomas. En diversos aspectos, los vectores que incluyen un polinucleótido descrito en el presente documento son vectores adecuados para propagación o replicación del polinucleótido, o vectores adecuados para expresar un polipéptido de la presente invención. Dichos vectores se conocen en la técnica y están disponibles en el mercado.

Se sintetizan polinucleótidos, completos o en partes que después se combinan, y se insertan en un vector usando técnicas de biología molecular y celular rutinarias, incluyendo, por ejemplo, subclonar el polinucleótido en un vector linealizado usando sitios de restricción y enzimas de restricción apropiados. Los polinucleótidos pueden amplificarse por reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores oligonucleotídicos complementarios de cada cadena del polinucleótido. Estos cebadores también pueden incluir sitios de escisión de enzimas de restricción para facilitar la subclonación en un vector. Los componentes del vector replicable generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación y uno o más genes marcadores o seleccionables.

Para expresar un polipéptido, las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido, o equivalentes funcionales, se insertan en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Se usan métodos bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control de la transcripción y traducción apropiados. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook, J., *et al.* (2001) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y., y Ausubel, F. M. *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y.

Se utiliza una diversidad de sistemas de vector de expresión/hospedador para contener y expresar secuencias polinucleotídicas. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófagos, plásmidos o cósmidos recombinantes; levadura transformada con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión de virus (por ejemplo virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacteriana (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales.

Dentro de un aspecto, las regiones variables de un gen que expresa un anticuerpo monoclonal de interés se amplifican a partir de una célula de hibridoma usando cebadores de nucleótidos. Estos cebadores pueden sintetizarse por un experto habitual en la materia, o pueden obtenerse de fuentes disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, Stratagene (La Jolla, California), que comercializa cebadores para amplificar regiones variables de ratón y humanas. Los cebadores se usan para amplificar regiones variables de cadena pesada o ligera, que se

insertan después en vectores tales como ImmunoZAP™ H o ImmunoZAP™ L (Stratagene), respectivamente. Estos vectores se introducen después en sistemas basados en *E. coli*, levadura o mamífero para expresión. Pueden producirse grandes cantidades de una proteína monocatenaria que contiene una fusión de los dominios V_H y V_L usando estos métodos (véase Bird *et al.*, Science 242: 423-426 (1988)).

Los “elementos de control” o “secuencias reguladoras” presentes en un vector de expresión son las regiones no traducidas del vector, por ejemplo, potenciadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3', que interactúan con proteínas celulares del hospedador para llevar a cabo transcripción y traducción. Estos elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y hospedador utilizado, se usa cualquier variedad de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles.

Los ejemplos de promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor phoA, sistemas de promotores de β-lactamasa y lactosa, promotor de fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (trp), y promotores híbridos tales como el promotor de tac. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contienen habitualmente una secuencia de Shine-Dalgarno unida operativamente con el ADN que codifica el polipéptido. Pueden usarse promotores inducibles tales como el promotor de lacZ híbrido del fagémido pBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, Calif.) o plásmido pSPORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) y similares.

Se conoce una diversidad de secuencias promotoras para eucariotas y cualquiera puede usarse de acuerdo con la presente invención. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada de 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan convenientemente en vectores de expresión eucariotas.

En sistemas de células de mamífero, se prefieren en general promotores de genes de mamífero o de virus de mamífero. La expresión del polipéptido de vectores en células hospedadoras de mamífero puede controlarse, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (por ejemplo, Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (CMV), un retrovirus, virus de la hepatitis B y más preferentemente Virus de Simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras. Si es necesario generar una línea celular que contenga múltiples copias de la secuencia que codifica un polipéptido, pueden usarse provechosamente vectores basados en SV40 o VEB con un marcador seleccionable apropiado. Un ejemplo de un vector de expresión adecuado es pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), que incluye un promotor de CMV.

Están disponibles varios sistemas de expresión basados en virus para expresión de polipéptidos en mamíferos. Por ejemplo, en casos en los que se usa un adenovirus como un vector de expresión, se ligan secuencias que codifican un polipéptido de interés en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Se usa inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral para obtener un virus viable que sea capaz de expresar el polipéptido en células hospedadoras infectadas (Logan, J. y Shenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 3655-3659). Además, se usan potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (VSR), para aumentar la expresión en células hospedadoras de mamífero.

En sistemas bacterianos, se selecciona cualquiera de varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para el polipéptido expresado. Por ejemplo, cuando se desean grandes cantidades, se usan vectores que dirijan expresión de alto nivel de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, los vectores de clonación y expresión de *E. coli* multifuncionales tales como pET (Stratagene), en los que la secuencia que codifica el polipéptido de interés está ligada en el vector en fase con secuencias para el Met amino-terminal y los 7 restos posteriores de β-galactosidasa de modo que se produzca una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heeke, G. y S. M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264: 5503-5509); y similares. También se usan Vectores pGEX (Promega, Madison, WI) para expresar polipéptidos ajenos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante absorción con perlas de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Se diseñan proteínas realizadas en dichos sistemas para incluir sitios de escisión por heparina, trombina o factor Xa proteasa de modo que el polipéptido de interés clonado pueda liberarse del resto de GST a voluntad.

En la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, se usan varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH. Los ejemplos de otras secuencias promotoras adecuadas para uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa,

- fosfoglucoasa isomerasa y glucoquinasa. Para revisiones, véase Ausubel *et al.* (mencionado anteriormente) y Grant *et al.* (1987) *Methods Enzymol.* 153: 516-544. Otros promotores de levadura que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento incluyen las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Se describen adicionalmente vectores y promotores adecuados para su uso en expresión de levadura en el documento EP 73.657. Los potenciadores de levadura también se usan provechosamente con promotores de levadura.
- En casos en los que se usen vectores de expresión de plantas, la expresión de secuencias que codifican polipéptidos está conducida por cualquiera de varios promotores. Por ejemplo, se usan promotores virales tales como los promotores de 35S y 19S de CaMV solos o en combinación con la secuencia de líder omega de TMV (Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6: 307-311. Como alternativa, pueden usarse promotores vegetales tales como la subunidad pequeña de la RUBISCO o promotores de choque térmico (Coruzzi, G. *et al.* (1984) *EMBO J.* 3: 1671-1680; Broglie, R. *et al.* (1984) *Science* 224: 838-843; y Winter, J., *et al.* (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17: 85-105). Estas construcciones se introducen en células vegetales por transformación de ADN directa o transfección mediada por patógeno. Dichas técnicas se describen en varias revisiones disponibles en general (véase, por ejemplo, Hobbs, S. o Murry, L. E. en McGraw Hill *Yearbook of Science and Technology* (1992) McGraw Hill, Nueva York, N. Y.; pp. 191-196).
- Se usa también un sistema de insectos para expresar un polipéptido de interés. Por ejemplo, en uno de dichos sistemas, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes ajenos en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican el polipéptido pueden clonarse en una región no esencial del virus, tal como el gen de polihedrina, y colocarse bajo el control del promotor de polihedrina. La inserción exitosa de la secuencia codificante del polipéptido hace al gen de polihedrina inactivo y produce virus recombinantes sin proteína recubierta. Los virus recombinantes pueden después usarse para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que el polipéptido de interés puede expresarse (Engelhard, E. K. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 3224-3227).
- También pueden usarse señales de inicio específicas para conseguir una traducción más eficaz de secuencias que codifican un polipéptido de interés. Dichas señales incluyen el codón de inicio de ATG y secuencias adyacentes. En casos en los que se inserten secuencias que codifiquen el polipéptido, su codón de inicio y secuencias cadena arriba en el vector de expresión apropiado, pueden no ser necesarias señales de control de la transcripción o traducción adicionales. Sin embargo, en casos en los que se inserte solamente secuencia codificante, o una parte de la misma, se proporcionan señales de control de la traducción exógenas incluyendo el codón de inicio de ATG. Además, el codón de inicio está en la fase de lectura correcta para asegurar la traducción correcta del polinucleótido insertado. Los elementos de traducción exógenos y codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos.
- La transcripción de un ADN que codifica un polipéptido de la invención se aumenta con frecuencia insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen muchas secuencias potenciadoras, incluyendo, por ejemplo, las identificadas en genes que codifican globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina. Típicamente, sin embargo, se usa un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede dividirse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante de polipéptido, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' del promotor.
- Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o nucleadas de otros organismos multicelulares) típicamente contienen también secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3' de ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica anticuerpo anti PSCA. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de hormona del crecimiento bovina. Véase, documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.
- Son células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento las células procariotas, de levadura, de plantas o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los ejemplos de procariotas adecuadas para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P desvelado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas

tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes.

Saccharomyces cerevisiae, o la levadura de panadero común, es el más usado entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, están disponibles habitualmente varios otros géneros, especies y cepas y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Pichia methanolica*, *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

En ciertas realizaciones, se elige una cepa celular hospedadora por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la manera deseada. Dichas modificaciones del polipéptido incluyen, pero sin limitación, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraducciona que escinde una forma "prepro" de la proteína también puede usarse para facilitar la inserción, el plegamiento y/o la función correctos. Pueden elegirse diferentes células hospedadoras tales como CHO, COS, HeLa, MDCK, HEK293 y WI38, que tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales, para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína ajena.

También se conocen métodos y reactivos adaptados específicamente para la expresión de anticuerpos o fragmentos de los mismos y están disponibles en la técnica, incluyendo los descritos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nº 4816567 y 6331415. En diversas realizaciones, se expresan cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos, o fragmentos de las mismas, a partir de los mismos vectores de expresión o separados. En una realización, ambas cadenas se expresan en la misma célula, facilitando de este modo la formación de un anticuerpo funcional o fragmento del mismo.

Pueden producirse anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo y proteínas de fusión de anticuerpo en bacterias, en particular cuando no es necesaria la glucosilación y función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un aceite citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunocóncugado por sí solo muestra eficacia en la destrucción de células infectadas. Para expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nº 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523, que describe la región de inicio de la traducción (TIR) y secuencias señal para optimizar la expresión y la secreción. Después de la expresión, el anticuerpo se aísla de la pasta celular de *E. coli* en una fracción soluble y se purifica a través de, por ejemplo, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final se lleva a cabo usando un proceso similar al usado para purificar un anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos y anticuerpos glucosilados derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen plantas tales como por ejemplo leña y células de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están disponibles públicamente una diversidad de cepas bacterianas para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y dichos virus pueden usarse como los virus del presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También se usan como hospedadores cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

La propagación de polipéptidos de anticuerpo y fragmentos de los mismos en células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Son ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster Chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde Africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario humano (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather *et al.*, Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Se transforman células hospedadoras con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para la producción de polipéptidos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Para producción de alto rendimiento, a largo plazo, de proteínas recombinantes, se prefiere en general expresión estable. Por ejemplo, líneas celulares que expresan de forma estable un polinucleótido de interés pueden transformarse usando vectores de expresión que pueden contener orígenes virales de replicación y/o elementos de expresión endógena y un gen marcador seleccionable en el mismo vector o en uno separado. Después de la introducción del vector, puede permitirse que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarse a medio selectivo. El fin del marcador seleccionable es conferir resistencia a selección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan con éxito las secuencias introducidas. Los clones resistentes de células transformadas de forma estable pueden hacerse proliferar usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo celular.

Puede usarse cualquier variedad de sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero sin limitación, los genes de timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler, M. *et al.* (1977) Cell 11: 223-32) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy, I. *et al.* (1990) Cell 22: 817-23) que se emplean en células tk⁻ o aprt, respectivamente. Además, se usa resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicidas como base para la selección; por ejemplo, dhfr que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, M. *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 3567-70); npt, que confiere resistencia a los aminoglucósidos, neomicina y G-418 (Colbere-Garapin, F. *et al.* (1981) J. Mol. Biol. 150: 1-14); y als o pat, que confieren resistencia a clorosulfurón y fosfotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murry, mencionado anteriormente). Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo, trpB, que permiten que las células utilicen indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman, S. C. y R. C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8047-51). El uso de marcadores visibles ha aumentado en popularidad con marcadores tales como antocianinas, beta-glucuronidasa y su sustrato GUS, y luciferasa y su sustrato luciferina, que se usa ampliamente no solamente para identificar transformantes, sino también para cuantificar la cantidad de expresión proteica transitoria estable atribuible a un sistema de vector específico (Rhodes, C. A. *et al.* (1995) Methods Mol. Biol. 55: 121-131).

Aunque la presencia/ausencia de expresión de gen marcador sugiere que el gen de interés también está presente, puede ser necesario confirmar su presencia y expresión. Por ejemplo, si la secuencia que codifica un polipéptido se inserta dentro de una secuencia de gen marcador, las células recombinantes que contienen secuencias pueden identificarse por la ausencia de función de gen marcador. Como alternativa, un gen marcador puede colocarse en tándem con una secuencia codificante de polipéptidos bajo el control de un único promotor. La expresión del gen marcador en respuesta a inducción o selección habitualmente indica también expresión del gen en tándem.

Como alternativa, se identifican células hospedadoras que contienen y expresan una secuencia polinucleotídica deseada por una diversidad de procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitación, hibridaciones de ADN-ADN o ADN-ARN y técnicas de bioensayos o inmunoensayos de proteínas que incluyen, por ejemplo, tecnologías basadas en membrana, solución o microplaca para la detección y/o cuantificación de ácido nucleico o proteína.

Se conocen en la técnica una diversidad de protocolos para detectar y medir la expresión de productos codificados por polinucleótidos, usando anticuerpos bien policlonales o bien monoclonales específicos para el producto. Los ejemplos incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Puede preferirse un inmunoensayo basado en anticuerpo monoclonal, de dos sitios, utilizando anticuerpos monoclonales reactivos para dos epítomos no interferentes en un polipéptido dado para algunas aplicaciones, pero también puede emplearse un ensayo de unión competitiva. Estos y otros ensayos se describen, entre otros sitios, en Hampton, R. *et al.* (1990; Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, Minn.) y Maddox, D. E. *et al.* (1983; J. Exp. Med. 158: 1211-1216).

Los expertos en la materia conocen diversos marcadores y técnicas de conjugación y pueden usarse en diversos ensayos de ácido nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir sondas de PCR o hibridación marcadas para detectar secuencias relacionadas con polinucleótidos incluyen oligomarcaje, traslación de muesca, marcaje de extremos o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado. Como alternativa, las secuencias, o cualquier parte de las mismas pueden clonarse en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Dichos vectores se conocen en la técnica, están disponibles en el mercado, y pueden usarse para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de una ARN polimerasa apropiada tal como T7, T3 o SP6 y nucleótidos marcados. Estos procedimientos pueden realizarse usando una diversidad de kits disponibles en el mercado. Las moléculas indicadoras o marcadores adecuados que se usan incluyen radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

El polipéptido producido por una célula recombinante se secreta o está contenido intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usado. Como se entenderá por los expertos en la materia, los vectores que contienen polinucleótidos de la invención pueden diseñarse para que contengan secuencias señal que dirigen la secreción del polipéptido codificado a través de una membrana celular procariota o eucariota.

En ciertos aspectos, un polipéptido de la presente invención se produce como un polipéptido de fusión que incluye además un dominio polipeptídico que facilitará la purificación de proteínas solubles. Dichos dominios que facilitan la purificación incluyen, pero sin limitación, péptidos quelantes metálicos tales como módulos de histidina-triptófano,

que permiten la purificación en metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación en inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación de afinidad/extensión de FLAGS (Amgen, Seattle, WA). La inclusión de secuencias enlazadoras escindibles tales como las específicas para Factor XA o enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, CA) entre el dominio de purificación y el polipéptido codificado puede usarse para facilitar la purificación. Uno de dichos vectores de expresión posibilita la expresión de una proteína de fusión que contiene un polipéptido de interés y un ácido nucleico que codifica 6 o más restos de histidina que preceden a un sitio de escisión de enteroquinasa o una tiorredoxina. Los restos de histidina facilitan la purificación en IMIAC (cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados) como se describe en Porath, J. *et al.* (1992, Prot. Exp. Purif. 3: 263-281) mientras que el sitio de escisión de enteroquinasa proporciona un medio para purificar el polipéptido deseado a partir de la proteína de fusión. Se proporciona un análisis de vectores útiles para producir proteínas de fusión en Kroll, D. J. *et al.* (1993; DNA Cell Biol. 12: 441-453).

En ciertos aspectos, se fusiona un polipéptido de la presente invención con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína madura o el polipéptido. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y se procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariontas, la secuencia señal puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, 1pp, o líderes de enterotoxina II termoestable. Para secreción de levadura, la secuencia señal puede seleccionarse de, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, líder de factor α (incluyendo líderes de factor α de *Saccharomyces* y de *Kluyveromyces*) o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión en células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero así como líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

Cuando se usan técnicas recombinantes, el polipéptido o anticuerpo puede producirse de forma intracelular, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el polipéptido o anticuerpo se produce de forma intracelular, como una primera etapa, los residuos en partículas, bien células hospedadoras o bien fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, se descongela pasta celular en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos celulares pueden retirarse por centrifugación. Cuando el polipéptido o anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran en primer lugar generalmente usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

El polipéptido o composición de anticuerpo preparado a partir de las células pueden purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el polipéptido o anticuerpo. La Proteína A puede usarse para purificar anticuerpos o fragmentos de los mismos que se basan en las cadenas pesadas γ_1 , γ_2 o γ_4 humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La Proteína G está recomendada para todos los isotipos de ratón y para γ_3 humano (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 15671575 (1986)). La matriz con la que se une el ligando de afinidad es con más frecuencia agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benzeno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el polipéptido o anticuerpo incluye un dominio C_H 3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para purificación. También están disponibles otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía de SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio dependiendo del polipéptido o anticuerpo para recuperar.

Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que incluye el polipéptido o anticuerpo de interés y contaminantes pueden someterse a cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferentemente realizada a concentraciones salinas bajas (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M).

Composiciones farmacéuticas

La presente invención incluye además formulaciones farmacéuticas que incluyen un anticuerpo de la presente invención, en un grado de pureza deseado, y un vehículo, excipiente o estabilizador farmacéuticamente aceptable (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)). En ciertas realizaciones, se preparan formulaciones farmacéuticas para potenciar la estabilidad del polipéptido o anticuerpo durante el almacenamiento, por ejemplo, en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, por ejemplo, tampones tales como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico); alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; tónicos tales como trehalosa y cloruro sódico; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensioactivos tales como polisorbato; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™ y PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). En ciertas realizaciones, la formulación terapéutica preferentemente incluye el polipéptido o anticuerpo a una concentración de entre 5-200 mg/ml, preferentemente entre 10-100 mg/ml.

Las formulaciones del presente documento también pueden contener uno o más agentes terapéuticos adicionales adecuados para el tratamiento de la indicación particular, por ejemplo, infección que se trata, o para prevenir efectos secundarios no deseados. Preferentemente, el agente terapéutico adicional tiene una actividad complementaria del polipéptido o anticuerpo de la presente invención, y los dos no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, además del polipéptido o anticuerpo de la presente invención, puede ser deseable incluir en una formulación, por ejemplo, un anticuerpo adicional, agente antiviral, agente antiinfeccioso y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes convenientemente en la formulación farmacéutica en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Los principios activos, por ejemplo, polipéptidos y anticuerpos de la presente invención y otros agentes terapéuticos, también puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de polimetilmetacrilato, respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semi-permeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D(-)-3-hidroxitubírico.

Las formulaciones para usar para administración *in vivo* son preferentemente estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Usos de diagnóstico

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención se unen específicamente o se unen preferentemente con células o tejidos infectados con CMV, en comparación con células y tejido de control normales. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para detectar células o tejidos infectados en un paciente, muestra biológica o población celular, usando cualquiera de una diversidad de métodos de diagnóstico y pronóstico, incluyendo los descritos en el presente documento. La capacidad de un anticuerpo anti-CMV para detectar células infectadas dependerá, por supuesto, de su especificidad de unión, que puede determinarse fácilmente ensayando su capacidad para unirse con células o tejidos infectados obtenidos de diferentes pacientes, y/o de pacientes infectados con diferentes cepas de CMV.

Los métodos de diagnóstico implican generalmente poner en contacto una muestra biológica obtenida de un paciente, tal como, por ejemplo, sangre, suero, saliva, orina, esputo, una muestra de hisopo celular, o una biopsia tisular, con un anticuerpo específico de CMV y determinar si el anticuerpo se une preferentemente con la muestra en comparación con una muestra de control o valor de punto de corte predeterminado, indicado de este modo la presencia de células infectadas. En realizaciones particulares, el anticuerpo al menos dos veces, tres veces o cinco veces más específico para CMV se une con una célula infectada en comparación con una muestra celular o tisular normal de control apropiada. Puede determinarse un valor de punto de corte predeterminado, por ejemplo, promediando la cantidad de anticuerpo específico de CMV que se une con varias muestras de control apropiadas diferentes en las mismas condiciones usadas para realizar el ensayo de diagnóstico de la muestra biológica que se ensaya.

Puede detectarse anticuerpo unido usando procedimientos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, se practican métodos de diagnóstico de la presente invención usando anticuerpos

específicos de CMV que se conjugan con un marcador detectable, por ejemplo, un fluoróforo, para facilitar la detección del anticuerpo unido. Sin embargo, se pueden practicar usando métodos de detección secundaria del anticuerpo específico de CMV. Estos incluyen, por ejemplo, RIA, ELISA, precipitación, aglutinación, fijación de complemento e inmunofluorescencia.

En ciertos procedimientos, los anticuerpos específicos de CMV se marcan. El marcador puede detectarse directamente, tal como radiomarcadores y fluorocromos, o pueden ser restos, tales como enzimas, que deben hacerse reaccionar o derivatizarse para detectarse. Son ejemplos de marcadores de isótopos ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P y ^{35}S . Los materiales fluorescentes que pueden usarse incluyen, por ejemplo, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, uramina, dansilo, umbeliferona, luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, lisozima, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Puede detectarse un marcador enzimático por cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas o gasométricas utilizadas en la actualidad. Se conocen y pueden utilizarse muchas enzimas que pueden usarse en estos procedimientos. Son ejemplos la peroxidasa, fosfatasa alcalina, β -glucuronidasa, β -D-glucosidasa, β -D-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa más peroxidasa, galactosa oxidasa más peroxidasa y fosfatasa ácida.

Los anticuerpos pueden marcarse con dichos marcadores por métodos conocidos. Por ejemplo, pueden usarse agentes de acoplamiento tales como aldehídos, carbodiimidas, dimaleimida, imidatos, succinimidas, benzatina bis-diazotizada y similares para marcar los anticuerpos con los marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes y enzimáticos anteriormente descritos. Una enzima está típicamente combinada con un anticuerpo usando moléculas de enlace tales como carbodiimidas, peryodato, diisocianatos, glutaraldehído y similares. Se describen diversas técnicas de marcaje en Morrison, *Methods in Enzymology* 32b, 103 (1974), Syvanen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 284, 3762 (1973) y Bolton y Hunter, *Biochem J.* 133, 529(1973).

Los anticuerpos específicos de CMV de la presente invención son capaces de diferenciar entre pacientes con y sin una infección por CMV, y determinar si un paciente tiene una infección, usando los ensayos representativos proporcionados en el presente documento. De acuerdo con un método, se obtiene una muestra biológica de un paciente que se sospecha que tiene o se sabe que tiene infección por CMV. En realizaciones preferidas, la muestra biológica incluye células del paciente. La muestra se pone en contacto con un anticuerpo específico de CMV, por ejemplo, durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el anticuerpo específico de CMV se una con células infectadas presentes en la muestra. La cantidad de anticuerpo específico de CMV unido se determina y se compara con un valor de control, que puede ser, por ejemplo, un valor predeterminado o un valor determinado a partir de una muestra tisular normal. Una cantidad aumentada de anticuerpo unido a la muestra del paciente en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia de células infectadas en la muestra del paciente.

En un método relacionado, una muestra biológica obtenida de un paciente se pone en contacto con un anticuerpo específico de CMV durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el anticuerpo se una con células infectadas. Después se detecta el anticuerpo unido, y la presencia del anticuerpo unido indica que la muestra contiene células infectadas. Esta realización es particularmente útil cuando el anticuerpo específico de CMV no se une con células normales a un nivel detectable.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos que se unen con una célula infectada generarán preferentemente una señal que indica la presencia de una infección en al menos aproximadamente el 20 % de los pacientes con la infección que se detecta, más preferentemente al menos el 30 % de los pacientes. Como alternativa, o además, el anticuerpo generará una señal negativa que indica la ausencia de infección en al menos aproximadamente el 90 % de individuos sin detectarse la infección. Cada anticuerpo debería satisfacer los criterios anteriores; sin embargo, los expertos en la materia reconocerán que pueden usarse anticuerpos de la presente invención en combinación para mejorar la sensibilidad.

La presente invención también incluye kits útiles en la realización de ensayo de diagnóstico y pronóstico usando los anticuerpos de la presente invención. Estos kits incluirán un recipiente adecuado incluyendo uno o más anticuerpos específicos de CMV de la presente invención en forma marcada o no marcada. Además, si el anticuerpo se proporciona en una forma marcada adecuada para un ensayo de unión indirecto, el kit puede incluir además reactivos útiles en la realización del ensayo indirecto apropiado. Por ejemplo, el kit puede incluir uno o más recipientes adecuados incluyendo sustratos enzimáticos o agentes derivatizantes, dependiendo de la naturaleza del marcador. También pueden incluirse muestras de control y/o instrucciones.

60 Usos terapéuticos

Los anticuerpos específicos de CMV y fragmentos de los mismos de la presente invención se unen específicamente o se unen preferentemente con células infectadas, en comparación con células y tejidos no infectados de control normales. Por lo tanto, estos anticuerpos específicos de CMV pueden usarse para dirigirse selectivamente a células o tejidos infectados en un paciente, muestra biológica o población celular. A la luz de las propiedades de unión específicas de infección de estos anticuerpos, la presente invención proporciona métodos para regular (por ejemplo,

inhibir) el crecimiento de células infectadas, métodos para destruir células infectadas, y métodos para inducir apoptosis de células infectadas. Estos métodos incluyen todos poner en contacto una célula infectada con un anticuerpo específico de CMV de la presente invención. Estos métodos pueden practicarse *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

5 Se administran composiciones farmacéuticas de la invención a poblaciones de pacientes diana, incluyendo, pero sin limitación, los muy jóvenes y los muy viejos, sujetos inmunocomprometidos (por ejemplo, sujetos con VIH/SIDA, otra enfermedad inmunosupresora o un trastorno genético que conduce a un sistema inmunitario insuficiente o comprometido), receptores de trasplante (incluyendo órgano completo, tejido y, particularmente, los pacientes que reciben un trasplante con reemplazo de una población de células madre hematopoyéticas o médula ósea), sujetos
10 que reciben terapia inmunosupresora (por ejemplo, sujetos que se medican para afecciones tales como artritis, rechazo de trasplantes y cáncer) y mujeres embarazadas CMV negativas que están en riesgo de exposición a o infección con CMV (el CMV se pasa al feto de estos sujetos provocando sordera y deficiencia cognitiva en casi el 1 % de todos los nacimientos).

15 En diversas realizaciones, los anticuerpos son terapéuticamente activos en sí mismos de forma intrínseca, y/o se conjugan con un agente citotóxico o agente inhibidor del crecimiento, por ejemplo, un radioisótopo o toxina, que es útil en el tratamiento de células infectadas que se unen con el anticuerpo.

20 En una realización, la presente invención proporciona métodos para tratar o prevenir la infección en un paciente, que incluyen proporcionar un anticuerpo específico de CMV de la presente invención a un paciente al que se ha diagnosticado que tiene, que está en riesgo de desarrollar, o que se sospecha que tiene una infección por CMV. Los métodos de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de primera línea de la infección, tratamiento de seguimiento o el tratamiento de una infección de recaída o refractaria. El tratamiento con un anticuerpo de la invención puede ser un tratamiento independiente, o puede ser un componente o una fase de un régimen de terapia
25 de combinación, en el que uno o más agentes terapéuticos adicionales también se usan para tratar al paciente.

Para tratamiento *in vivo* de pacientes humanos y no humanos, se administra al paciente habitualmente una formulación farmacéutica que incluye un anticuerpo específico de CMV de la presente invención. Cuando se usan para terapia *in vivo*, los anticuerpos de la invención objeto se administran al paciente en cantidades terapéuticamente eficaces (es decir, cantidades que eliminan o reducen la carga viral del paciente). Los anticuerpos se administran a un paciente humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un embolada o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Los anticuerpos pueden administrarse por vía parenteral, cuando sea posible, en el sitio de célula diana, o por vía
30 intravenosa. La administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo se prefiere en ciertas realizaciones.

Para administración parenteral, los compuestos pueden formularse en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión, emulsión), en asociación con un vehículo parenteral, farmacéuticamente aceptable. Son ejemplos de dichos vehículos agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, y albúmina de suero humano 5 %. También pueden usarse vehículos no acuosos tales como aceites fijos y etil oleato. También pueden usarse liposomas como vehículos. El vehículo puede contener cantidades menores de aditivos tales como sustancias que potencian la isotonicidad y estabilidad química, por ejemplo, tampones y conservantes. Los anticuerpos se formularán típicamente en dichos vehículos a concentraciones de aproximadamente 1 mg/ml a 10
35 mg/ml.

La dosis y el régimen de dosificación dependerán de una diversidad de factores fácilmente determinados por un médico, tales como la naturaleza de la infección y las características del agente citotóxico particular o agente inhibidor del crecimiento conjugado con el anticuerpo (cuando se use), por ejemplo, su índice terapéutico, el paciente, y el historial del paciente. En general, se administra a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo. En realizaciones particulares, la cantidad de anticuerpo administrado estará típicamente en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente. Dependiendo del tipo y gravedad de la infección, aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, aproximadamente 0,1-15 mg/kg/dosis) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para administración al paciente, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión
40 continua. El progreso de esta terapia puede controlarse fácilmente por ensayos y métodos convencionales y basándose en criterios conocidos por el médico u otros expertos en la materia.

En una realización particular, se administra al paciente un inmunoconjugado que incluye el anticuerpo conjugado con un agente citotóxico. Preferentemente, el inmunoconjugado se internaliza por la célula, dando como resultado eficacia terapéutica aumentada del inmunoconjugado en la destrucción de la célula con la que se une. En una realización, el agente citotóxico se dirige a o interfiere con el ácido nucleico en la célula infectada. Se han descrito anteriormente ejemplos de dichos agentes citotóxicos e incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.
50

65 Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración de un anticuerpo específico de CMV de la presente invención. La administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una

única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente hay un periodo de tiempo durante el que ambos (o todos) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Preferentemente dicha terapia combinada da como resultado un efecto terapéutico sinérgico.

5 En ciertas realizaciones, es deseable combinar la administración de un anticuerpo de la presente invención con otro anticuerpo dirigido contra otro antígeno asociado con el agente infeccioso

Aparte de la administración de la proteína de anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo por terapia génica. Dicha administración de ácido nucleico que codifica el anticuerpo está abarcada por la expresión “administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo”. Véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de PCT WO96/07321 que se refiere al uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

15 Ejemplo 1

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI CMV

Se produjeron de forma recombinante anticuerpos monoclonales humanos específicos para CMV como se describe posteriormente.

20 Se exploraron 89 muestras de plasma humano con respecto a la presencia de anticuerpos de CMV por ELISA usando un polipéptido correspondiente al sitio del epítipo AD2 de gp116 de CMV que tiene la secuencia de aminoácidos, SHRANETIYNTTLKYGDTTGTNTTK (SEC ID N°: 31). Dos muestras de plasma dieron resultado positivo, lo que indicaba la presencia de anticuerpos anti gp116 de CMV.

25 Se obtuvieron PBMC de una muestra de sangre de donante con una alta titulación de IgG para el epítipo AD2 de gp 116 de CMV. Las células CD19+ se enriquecieron y se mezclaron con una forma biotinilada del péptido AD2 de gp116 de CMV, y se enriquecieron linfocitos B específicos de antígeno usando microperlas recubiertas con estreptavidina. Estos linfocitos B seleccionados por antígeno se sembraron en placas de microtitulación a una densidad de más de una célula por pocillo y se cultivaron en condiciones favorables para la proliferación de linfocitos B y la activación para generar linfocitos B productores de anticuerpo, por ejemplo, en presencia de un mitógeno de linfocitos B, tal como lipopolisacárido (LPS) o ligando CD40. Después se ensayaron sobrenadantes celulares obtenidos de los linfocitos B con respecto a la presencia de anticuerpos que se unieron con el epítipo AD2 de gp116 de CMV, identificando de este modo 11 pocillos que contenían linfocitos B que producían anticuerpos específicos de antígeno.

40 Se produjeron anticuerpos recombinantes que incluían regiones de unión al antígeno de los anticuerpos específicos de antígeno subclonando el ADN que codificaba las regiones variables de las cadenas de anticuerpo en el vector de expresión pcDNA3.1+. Se realizaron transfecciones transitorias en células 293 FT para reconstituir y producir de forma recombinante estos anticuerpos. Los anticuerpos producidos de forma recombinante se ensayaron después con respecto a su capacidad para unirse con el epítipo AD2 de gp116 de CMV, y se identificaron 7 IgG recombinantes que se unían con este antígeno. Se generaron posteriormente dos anticuerpos anti CMV adicionales de acuerdo con estos mismos métodos. La afinidad de unión de los anticuerpos se determinó como se muestra en la

45

Tabla 1. Afinidades de unión de anticuerpos anti CMV clasificados por K_D y k_{off}

Clasificado por K_D			
Anticuerpo	de k_a ($M^{-1} s^{-1}$) x 10^5	k_d (s^{-1})	K_D (k_{off}/k_{on}), nM
CMV			
mAb G-ITC88	7,67(6)	0,00116(3)	1,51 (5)
mAb A-2F10	5,62(7)	0,001112(7)	1,98 (2)
mAb E-5P9	2,45(2)	0,00121(3)	4,9(1)
mAb F-9C16	5,83(9)	0,00286(8)	4,9(2)
mAb B-2M16	27(1)	0,023(1)	8,47 (5)
mAb D-4P12	1,75(1)	0,00190(3)	10,9(2)
mAb C-2N9	26(1)	0,030(2)	11,59(7)
Clasificado por k_{off}			
Anticuerpo	de k_a ($M^{-1} s^{-1}$) x 10^5	k_d (s^{-1})	K_D (k_{off}/k_{on}), nM
CMV			
mAb A-2F10	5,62(7)	0,001112(7)	1,98(2)
mAb G-ITC88	7,67(6)	0,00116(3)	1,51(5)
mAb E-5P9	2,45(2)	0,00121(3)	4,9(1)

mAb D-4P12	1,75(1)	0,00190(3)	10,9(2)
mAb F-9C16	5,83(9)	0,00286(8)	4,9(2)
mAb B-2M16	27(1)	0,023(1)	8,47(5)
mAb C-2N9	26(1)	0,030(2)	11,59(7)

Los números entre paréntesis representan el error típico en el último dígito indicado.

Las secuencias de los anticuerpos se determinaron, incluyendo las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesadas Gamma y ligeras Kappa de los anticuerpos designados 2F10, 2M16, 2N9, 3C21, 4P12, 5P9, 9C16. Además, se determinó la secuencia de cada uno de los polinucleótidos que codificaban las secuencias de anticuerpo. Se muestran a continuación las secuencias polipeptídicas y polinucleotídicas de las cadenas pesadas gamma y cadenas ligeras kappa, con los péptidos señal en negrita en el extremo N terminal (o extremo 5') y las regiones constantes en negrita en el extremo C terminal (o extremo 3') de las regiones variables, que se muestran en texto normal.

5

10 2F10 gamma:

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAAGAGGTGTCCAGTGT CAGGTAC
ATCTGGTGGAGTCGGGGGGAGGCGTCCAGCCTGGTAGGGCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC
CACTGGATTACATTTAGTAATCACGGCATA CATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
GAGTGGCTGGCAGTTATTTCAAGCGATGGAGATGATGACCGTTACGCAGACTCCGTGAAGGGTC
GATT CAGCGTCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACCGTGCATCTGCAGATGAATGGCCTGAGACC
TGACGACACGGCTATTTATTTCTGTGCGGAGATGGGAGGTGTGGTGAACCTAAGTGCTACTCA
GGGTTGCCTGATTACTGGGGCCGGGGACCCCTGGTCAACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAA TGGGCAGCCGGAGAACA AACTACAAGACCAGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC
TGTCTCCGGGTAAA (SEC ID N°: 1)

región variable de 2F10 gamma:

15

CAGGTACATCTGGTGGAGTCGGGGGGAGGCGTCTGCCAGCCTGGTAGGGCCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCCACTGGATTACATTTAGTAATCACGGCATAACATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA
GGGGCTGGAGTGGCTGGCAGTTATTTCAAGCGATGGAGATGATGACCGTTACGCAGACTCCGTG
AAGGGTCGATTCAGCGTCTCCAGAGACAATTTCCAAGAACACCGTGCATCTGCAGATGAATGGCC
TGAGACCTGACGACACGGCTATTTATTTCTGTGCGCGAGATGGGAGGTGTGGTGAACCTAAGTG
CTACTCAGGGTTGCCTGATTACTGGGGCCGGGGGACCCTGGTCACCGTCTCG (SEC ID N°:
34)

2F10 gamma:

**MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVHLVESGGGVVQPGRALRLSCAATGFTFSNHGIHWVRQAPGKGL
EWLAVISSDGDDDRYADSVKGRFSVSRDNSKNTVHLQMNGLRPDDTAIYFCARDGRCGEPKCY
GLPDYWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 2)**

5

región variable de 2F10 gamma: (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en cursiva en negrita):

QVHLVESGGGVVQPGRALRLSCAAT***GFTFSNHGIHWVRQAPGKGLEWLA***VISSDGDDDRYADSV
KGRFSVSRDNSKNTVHLQMNGLRPDDTAIYFCARD***DGRCGEPKCYSGLPDY***WGRGTLVTVS
(SEC ID N°: 35)

10

CDR de Kabat de cadena pesada de 2F10 gamma:

- CDR 1: SNHGIH (SEC ID N°: 36)
- CDR 2: VISSDGDDDRYADSVKG (SEC ID N°: 37)
- CDR 3: DGRCGEPKCYSGLPDY (SEC ID N°: 38)

15

CDR de Chothia de cadena pesada de 2F10 gamma:

- CDR 1: GFTFSN (SEC ID N°: 39)
- CDR 2: VISSDGDDDR (SEC ID N°: 40)
- CDR 3: DGRCGEPKCYSGLPDY (SEC ID N°: 38)

20

2F10 kappa:

**ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGCTACCACCGGAGAGA
TTGTTTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGACAGAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCGGGTACTTAGCCTGGTATCAACAAAAGCCTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCCTCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTAGTGGCAGTG
GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCACCTTATTA
CTGTCTTCAGCGTAACACGTGGCCTCCGCTCACTTTCCGGGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
T (SEC ID N°: 3)**

región variable de 2F10 kappa:

GAGATTGTTTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGACAGAGCCACCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCGGGTACTTAGCCTGGTATCAACAAAAGCCTGGCCAGGC
TCCCAGGCTCCTCCTCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTAGTGGC
AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCACCTT
ATTACTGTCTTCAGCGTAACACGTGGCCTCCGCTCACTTTCCGGGGAGGGACCAAGGTGGAGAT
CAAACGTACG (SEC ID N°: 41)

5

2F10 Kappa:

**MEAPAQLLFLLLLWLPATTGEIVLTQSPATLSLSPGDRATLSCRASQSVGGYLAWYQOKPGQAP
RLLLYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFALYYCLQRNTWPPLTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°: 4)**

10

región variable de 2F10 kappa (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en cursiva en negrita):

EIVLTQSPATLSLSPGDRATLSCRASQSVGGYLAWYQOKPGQAPRLLLYDASN RATGIPARFSG
SGSGTDFTLTISSLEPEDFALYYCLQRNTWPPLTFGGGTKVEIKRT (SEC ID N°: 42)

15

CDR de Kabat de cadena ligera de 2F10 kappa:

- CDR 1: RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43)
- CDR 2: DASN RAT (SEC ID N°: 44)
- CDR 3: LQRNTWPPLT (SEC ID N°: 45)

20

CDR de Chothia de cadena ligera de 2F10 kappa:

- CDR 1: RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43)
- CDR 2: DASN RAT (SEC ID N°: 44)
- CDR 3: LQRNTWPPLT (SEC ID N°: 45)

25

2M16 gamma:

**ATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGCCAGGTGC
AGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCATGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTCAGC
CTCTGGACTCACCTTCAGCAATTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
GAGTGGGTGGCAGTTATATCAAGTGATGGAAGTAATGAGCACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACTATCTCCAGAGACAATTTCAACAACATGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC
TGAGGACACGGCTGTCTATTACAGTGCGAGAGATGGGAGGTGTCTGATGTTAACTGCTACTCA
GGGTTGATTGACTATTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCAGCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAACAAGCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA (SEC ID N°: 5)**

5 región variable de 2M16 gamma:

CAGGTGCAGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCATGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTTTACGCTCTGGACTCACCTTCAGCAATTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA
GGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCAAGTGATGGAAGTAATGAGCACTACGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGACAATTTCAACAACATGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGAGAGCTGAGGACACGGCTGTCTATTACAGTGCGAGAGATGGGAGGTGTCTGATGTTAACTG
CTACTCAGGGTTGATTGACTATTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCG (SEC ID N°:
46)

2M16 gamma:

10

**MELGLCWVFLVALLRGVQCQVQLVDSGGGMVQFGRSLRLSCSASGLTFSNYGMHWVRQAPGKGL
EWWAVISSDGSNEHYADSVKGRFTISRDNFNMMLYLQMNLSLAEDTAVVYSARDGRCPDVNCYS**

GLIDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEC ID N°: 6)

región variable de 2M16 gamma (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en cursiva en negrita):

QVQLVDSGGGMVQPGRSLRLSCSAS ***GLTFS****SNYGMHWVRQAPGKGLEWVA****VISSDGSNEHYADSV***
*KGRFTISRDNFNNMLYLQMNSLRRAEDTAVYY SAR****DGRCPDVNCYSGLIDY***WGQGLTVTVS
(SEC ID N°: 47)

5

CDR de Kabat de cadena pesada de 2M16 gamma:

10

CDR 1: SNYGMH (SEC ID N°: 48)
CDR 2: VISSDGSNEHYADSVKG (SEC ID N°: 49)
CDR 3: DGRCPDVNCYSGLIDY (SEC ID N°: 50)

CDR de Chothia de cadena pesada de 2M16 gamma:

15

CDR 1: GLTFSN (SEC ID N°: 118)
CDR 2: VISSDGSNEH (SEC ID N°: 51)
CDR 3: DGRCPDVNCYSGLIDY (SEC ID N°: 50)

2M16 kappa:

20

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATAACCACCGGAGAAA
TTGTCTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCAGATACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAGGTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGTTTCAAGTGGCAGTG
GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCGACAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTA
CTGT CAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGTCCAAGGTGGAGATCAAA
CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT

GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
T (SEC ID N°: 7)

región variable de 2M16 kappa:

GAAATTGTCTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCAGATACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAGGTGGCCAGGC
TCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGC
AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCGACAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTT
ATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTCCGGCGAGGGTCCAAGGTGGAGAT
CAAACGTACG (SEC ID N°: 94)

2M16 Kappa:

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGRYLAWYQQKGGQAP
RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIDSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGSKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
5 **TYSLSS**TLTSLKADYEEKHKVYACEFVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°: 8)

región variable de 2M16 kappa (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en cursiva en negrita):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGRYLAWYQQKGGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG
SGSGTDFTLTIDSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGSKVEIKRT (SEC ID N°: 52)

CDR de Kabat de cadena ligera de 2M16 kappa:

- CDR 1: RASQSVGRYLA (SEC ID N°: 53)
- CDR 2: DASNRAT (SEC ID N°: 44)
- CDR 3: QQRSNWPPLT (SEC ID N°: 54)

CDR de Chothia de cadena ligera de 2M16 kappa:

- CDR 1: RASQSVGRYLA (SEC ID N°: 53)
- CDR 2: DASNRAT (SEC ID N°: 44)
- CDR 3: QQRSNWPPLT (SEC ID N°: 54)

2N9 gamma:

**ATGGAGTTGGGGCTGCGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT CAGGTGC
AGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC
CTCTGGATTCACCTTCAGTAGTAATGGCATACACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
GACTGGGTGGCAGTTATATCATCTGATGCAAATGATAAACAATACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTACCCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACATGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGT
TGAAGACACGGCTGTCTATTTCTGTGCGAGAGATGGGACGTGCAGTGGTGGTAACTGCTACTCA
GGGTTGATTGACTATTGGGGCCGGGAATTCTGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA (SEC ID N°: 9)**

5 región variable de 2N9 gamma:

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTAATGGCATACACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA
GGGGCTGGACTGGGTGGCAGTTATATCATCTGATGCAAATGATAAACAATACGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACATGGTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGAGAGTTGAAGACACGGCTGTCTATTTCTGTGCGAGAGATGGGACGTGCAGTGGTGGTAACTG
CTACTCAGGGTTGATTGACTATTGGGGCCGGGAATTCTGGTCACCGTCTCG (SEC ID N°:
55)

2N9 gamma:

**MELGLRWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGL
DWVAVISSDANDKQYADSVKGRFTISRDN SKNMVYLQMNLSLRVEDTAVYFCARDGTCSSGGNCYS
GLIDYWGRGILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 10)**

5 región variable de 2N9 gamma (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en cursiva en negrita):

**QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGLDWVAVISSDANDKQYADSV
KGRFTISRDN SKNMVYLQMNLSLRVEDTAVYFCARDGTCSSGGNCYSGLIDYWGRGILVT VS
(SEC ID N°: 56)**

CDR de Kabat de cadena pesada de 2N9 gamma:

10

CDR 1: SSNGIH (SEC ID N°: 57)
CDR 2: VISSDANDKQYADSVKG (SEC ID N°: 58)
CDR 3: DGTCSGGNCYSGLIDY (SEC ID N°: 59)

15 CDR de Chothia de cadena pesada de 2N9 gamma:

CDR 1: GFTFSS (SEC ID N°: 60)
CDR 2: VISSDANDKQ (SEC ID N°: 61)
CDR 3: DGTCSGGNCYSGLIDY (SEC ID N°: 59)

20

2N9 kappa:

**ATGGACATGAGGGTCCCAGCTCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCG
GAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCTTGTCTTTGTCTCCAGGTGAAAGAGCCACCCT
CTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCGGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAG
GCTCCCAGGCTCCTCATCTACGATGCCTCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTG
GCAGTGGGTCTGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGT
TTATTACTGTCACCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAT
ATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
CTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG
GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG
TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG
AGAGTGT (SEC ID N°: 11)**

región variable de 2N9 kappa:

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCTTGTCTTTGTCTCCAGGTGAAAGAGCCACCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCGGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGC
TCCCAGGCTCCTCATCTACGATGCCTCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTT CAGTGGC
AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTT
ATTACTGTCACCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGATAT
CAAACGTACG (SEC ID N°: 62)

5 2N9 kappa:

MRVPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGGYLA~~WYQQKPGQAP~~
RLLIYDASIRATGIPARFSGSGSDFTLT~~ISSLEPEDFAVYYCHQRSNWPPLTFGGG~~TKVDIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV~~VCLLN~~FYPREAKVQW~~KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS~~
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°: 12)

10 región variable de 2N9 kappa (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en cursiva en negrita):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGGYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASIRATGIPARFSG
SGSGDFTLT~~ISSLEPEDFAVYYCHQRSNWPPLTFGGG~~TKVDIKRT (SEC ID N°: 63)

CDR de Kabat de cadena ligera de 2N9 kappa:

15 CDR 1: RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43)
CDR 2: ASIRAT (SEC ID N°: 64)
CDR 3: HQRSNWPPLT (SEC ID N°: 65)

CDR de Chothia de cadena ligera de 2N9 kappa:

20 CDR 1: RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43)
CDR 2: ASIRAT (SEC ID N°: 64)
CDR 3: HQRSNWPPLT (SEC ID N°: 65)

4P12 gamma:

**ATGGAGTTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCCAGGTGC
AGCTGGTGGAGTCGGGGGGAGGCGTGATCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTTGC
CTCTAAATTCATCTTCAGTAACCATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
GAGTGGGTGGCGGTTATATCAAAAGATGGGACTAATGCACACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCC
GATTTAGCATCTCCAGAGACAACTCCAAGGACACTGTCTTTCTGGAAATGCGCAGCCTGCGACC
TGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGCCGGTGTATTGAAGAAAACCTGCTACTCC
GGACAGATTGACTATTGGGGCCAGGGATCCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCAAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCACTCTTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTA** (SEC ID N°: 13)

5 región variable de 4P12 gamma:

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGGGGAGGCGTGATCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGTTGCCTCTAAATTCATCTTCAGTAACCATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA
GGGGCTGGAGTGGGTGGCGGTTATATCAAAAGATGGGACTAATGCACACTACGCAGACTCCGTG
AGGGGCCGATTTAGCATCTCCAGAGACAACTCCAAGGACACTGTCTTTCTGGAAATGCGCAGCC
TGCGACCTGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGCCGGTGTATTGAAGAAAACCTG
CTACTCCGGACAGATTGACTATTGGGGCCAGGGATCCCTGGTCACCGTCTCG (SEC ID N°:
66)

4P12 gamma:

MELGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVIQPGRSLRLSCVASKFIFSNHGIHWVRQAPGKGL
EWWAVISKDGTNAHYADSVRGRFSISRDNKDTVFLEMRLRPEDTAVYYCAREGRCIEENCYS
GQIDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 14)

5 región variable de 4P12 gamma (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en cursiva en negrita):

QVQLVESGGGVIQPGRSLRLSCVASKFIFSNHGIHWVRQAPGKGLEWVA ***VISKDGTNAHYADSV***
RGRFSISRDNKDTVFLEMRLRPEDTAVYYCAREGRCIEENCYSGQIDYWGQGLVTVS
(SEC ID N°: 67)

CDR de Kabat de cadena pesada de 4P12 gamma:

10

- CDR 1: SNHGIH (SEC ID N°: 36)
- CDR 2: VISKDGTNAHYADSVRG (SEC ID N°: 68)
- CDR 3: EGRRCIEENCYSGQIDY (SEC ID N°: 69)

CDR de Chothia de cadena pesada de 4P12 gamma:

15

- CDR 1: KFIFSN (SEC ID N°: 70)
- CDR 2: VISKDGTNAH (SEC ID N°: 71)
- CDR 3: EGRRCIEENCYSGQIDY (SEC ID N°: 69)

20

4P12 kappa:

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAA
TTCTATTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCAGGTACATGGCCTGGTATCAACAGAGACCTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTG
GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGCAATTTATTA
CTGTCCAGCAGCGTAGCAGCTGGCCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
T (SEC ID N°: 15)

región variable de 4P12 kappa:

GAAATTCTATTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCAGGTACATGGCCTGGTATCAACAGAGACCTGGCCAGGC
TCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGC
AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGCAATTT
ATTACTGTCAGCAGCGTAGCAGCTGGCCCCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGAT
CAAACGTACG (SEC ID N°: 72)

5 4P12 kappa:

MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTGEI LLTQSPATLSLSPGERATLS**CRASQSVGRYMAWYQQRPGQAP**
RLLIYDASIRATGIPARFSGSGSGTDFTLT**ISSLQPEDFAIYYCQQRSSWPPLTFGGG**TKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV**VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS**
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°: 16)

10 región variable de 4P12 kappa (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en cursiva en negrita):

EILLTQSPATLSLSPGERATLS**CRASQSVGRYMAWYQQRPGQAP**RLLIY**DASIRATGIPARFSG**
SGSGTDFTLT**ISSLQPEDFAIYYCQQRSSWPPLTFGGG**TKVEIKRT (SEC ID N°: 73)

CDR de Kabat de cadena ligera de 4P12 kappa:

15 CDR 1: RASQSVGRYMA (SEC ID N°: 74)
CDR 2: DASIRAT (SEC ID N°: 75)
CDR 3: QQRSSWPPLT (SEC ID N°: 76)

CDR de Chothia de cadena ligera de 4P12 kappa:

20 CDR 1: RASQSVGRYMA (SEC ID N°: 74)
CDR 2: DASIRAT (SEC ID N°: 75)
CDR 3: QQRSSWPPLT (SEC ID N°: 76)

5P9 gamma:

**ATGGAGTTGGGGCTGCGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCCAGGTGC
AGCTGGTGGAGTCGGGGGGAGGCGTGATCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTTGC
CTCTAAATTCATCTTCAGTAACCATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
GAGTGGGTGGCGGTTATATCAAAGGATGGGACTAATGCACACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCC
GATTTAGCATCTCCAGAGACAACTCCAAGGACACTGTCTTTCTGGAAATGCGCAGCCTGCGACC
TGAAGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGAGAGGGCCGGTGTATTGAAGAAAAGTGCTACTCC
GGACAGATTGACTATTGGGGGCAGGGATCCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTC

CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA (SEC ID N°: 17)**

5 región variable de 5P9 gamma:

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGGGGAGGCGTGATCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGTTGCCTCTAAATTCATCTTCAGTAACCATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA
GGGGCTGGAGTGGGTGGCGGTTATATCAAAGGATGGGACTAATGCACACTACGCAGACTCCGTG
AGGGGCCGATTTAGCATCTCCAGAGACAACTCCAAGGACACTGTCTTTCTGGAAATGCGCAGCC
TGCGACCTGAAGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGAGAGGGCCGGTGTATTGAAGAAAAGTG
CTACTCCGGACAGATTGACTATTGGGGGCAGGGATCCCTGGTCACCGTCTCG (SEC ID N°:
77)

5P9 gamma:

MELGLRWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVIQGRSLRLSCVASKFIFSNHGIHWVRQAPGKGL
EWWAVISKDGTNAHYADSVRGRFSISRDNKSDTVFLEMRLRPEDTAVYYCAREGRCIEEKCY
GQIDYWGQGS LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 18)

5 región variable de 5P9 gamma (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en cursiva en negrita):

QVQLVESGGGVIQGRSLRLSCVASK***KFIFSNHGIHWVRQAPGKGLEWVA***VISKDGTNAHYADSV
RGRFSISRDNKSDTVFLEMRLRPEDTAVYYCAR***EGRCIEEKCYSGQIDYWGQGS***LVTV
(SEC ID N°: 78)

CDR de Kabat de cadena pesada de 5P9 gamma:

10

CDR 1: SNHGIH (SEC ID N°: 36)
CDR 2: VISKDGTNAHYADSVRGR (SEC ID N°: 79)
CDR 3: EGRCIEEKCYSGQIDY (SEC ID N°: 80)

CDR de Chothia de cadena pesada de 5P9 gamma:

15

CDR 1: KFIFSN (SEC ID N°: 70)
CDR 2: VISKDGTNAH (SEC ID N°: 71)
CDR 3: EGRCIEEKCYSGQIDY (SEC ID N°: 80)

20

5P9 kappa:

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAA
TTCTATTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCAGGTACATGGCCTGGTATCAACAGAGACCTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTAGTGGCAGTG
GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGACTGAAGATTTTGAATTTATTA
CTGTCTCAGCAGCGTAGCAGCTGGCCCCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAA
CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
T (SEC ID N°: 19)

región variable de 5P9 kappa:

GAAATTCTATTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCAGGTACATGGCCTGGTATCAACAGAGACCTGGCCAGGC
TCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGC
AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGACTGAAGATTTTGCAATTT
ATTACTGTCTCAGCAGCGTAGCAGCTGGCCCCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGAT
CAAACGTACG (SEC ID N°: 81)

5 5P9 kappa:

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEI LLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVGRYMAWYQQRPGQAP
RLLIYDASIRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQTEDFAIYYCQQRSSWPPLTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°: 20)

región variable de 5P9 kappa (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en cursiva en negrita):

10

EILLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVGRYMAWYQQRPGQAPRLLIY ***DASIRAT***GIPARFSG
SGSGTDFTLTISSLQTEDFAIYYC QQRSSWPPLTTFGGGTKVEIKRT (SEC ID N°: 82)

CDR de Kabat de cadena ligera de 5P9 kappa:

15

CDR 1: RASQSVGRYMA (SEC ID N°: 74)
CDR 2: DASIRAT (SEC ID N°: 75)
CDR 3: QQRSSWPPLT (SEC ID N°: 76)

CDR de Chothia de cadena ligera de 5P9 kappa:

20

CDR 1: RASQSVGRYMA (SEC ID N°: 74)
CDR 2: DASIRAT (SEC ID N°: 75)
CDR 3: QQRSSWPPLT (SEC ID N°: 76)

9C16 gamma:

**ATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT CAGGTGC
AGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC
CTCTGGACTCACCTTCAGTGATTATGGTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG
GAGTGGGTGGCAGTCATCTCAAAGGATGGAAC TAACACACACTATGCAGACTCCGTGAGGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACA ACTCCAAGAACATTTTCTATCTGCAAATGAACGGCCTGAGAGC
TGAGGACACGGCTGTCTATTACAGTGGGAGAGATGGGAAGTGTCTCTGATCTTAAGTGCTACTCA
GGGTTGATTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCACCCTGTC**

5 región variable de 9C16 gamma:

CAGGTGCAGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCCTCTGGACTCACCTTCAGTGATTATGGTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA
GGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTCATCTCAAAGGATGGAAC TAACACACACTATGCAGACTCCGTG
AGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA ACTCCAAGAACATTTTCTATCTGCAAATGAACGGCC
TGAGAGCTGAGGACACGGCTGTCTATTACAGTGGGAGAGATGGGAAGTGTCTCTGATCTTAAGTG
CTACTCAGGGTTGATTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCG (SEC ID N°:
83)

9C16 gamma:

10

**MELGLCWVFLVALLRGVQCQVQLVDSGGVVQPGRSLRLSCAASGLTFSDYGMHWVRQAPGKGL
EWWAVISKDGTNTHYADSVRGRFTISRDN SKNI FYLQMNGLRAEDTAVYYSGRDGKCPDLKCYS
GLIDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 22)**

región variable de 9C16 gamma (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en cursiva en negrita):

QVQLVDSGGVVQPGRSLRLSCAAS ***GLTFSDYGMHWVRQAPGKGL***EWVA ***VISKDGTNTHYADSV***
RGRFTISRDN SKNI FYLQMNGLRAEDTAVYYSGR***DGKCPDLKCYSGLIDYWGQGLVTVS***

15

(SEC ID N°: 84)

CDR de Kabat de cadena pesada de 9C16 gamma:

5 CDR 1: SDYGMH (SEC ID N°: 85)
CDR 2: VISKDGTNTHYADSVRG (SEC ID N°: 87)
CDR 3: DGKCPDLKCYSGLIDY (SEC ID N°: 87)

CDR de Chothia de cadena pesada de 9C16 gamma:

10 CDR 1: GLTFSD (SEC ID N°: 88)
CDR 2: VISKDGTNTH (SEC ID N°: 89)
CDR 3: DGKCPDLKCYSGLIDY (SEC ID N°: 87)

9C16 kappa:

15 **ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAACCACCGGAGAAA
TTGTGTTGACACAGTCTCCGGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAGAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCGGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAAAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGTTTCAGTGGCAGTG
GGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCACCCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAATTTATTA
CTGTCACCAGCGTAGCAGCTGGCCTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGATATCAAA
CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
T (SEC ID N°: 23)**

región variable de 9C16 kappa:

20 **GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCGGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAGAGCCACCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCGGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGCCAGGC
TCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAAAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGTTTCAGTGGC
AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCACCCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAATT
ATTACTGTCACCAGCGTAGCAGCTGGCCTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGATA
CAAACGTACG (SEC ID N°: 90)**

9C16 kappa:

**MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGGYLAWYQQKPGQAI
RLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFTLTITSTLEPEDFAIYYCHQRSSWPPLTFGGGTKVDIF
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDE
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°: 24)**

ES 2 542 308 T3

región variable de 9C16 kappa (CDR de Kabat subrayadas, CDR de Chothia en cursiva en negrita):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGGYLAWYQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSC
SGSGTDFTLTISTLEPEDFAIYYCHQRSSWPPLTFGGGTKVDIKRT (SEC ID N°: 91)

5 CDR de Kabat de cadena ligera de 9C16 kappa:

CDR 1: RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43)

CDR 2: DASKRAT (SEC ID N°: 92)

10

CDR 3: HQRSSWPPLT (SEC ID N°: 93)

CDR de Chothia de cadena ligera de 9C16 kappa:

15

CDR 1: RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43)

CDR 2: DASKRAT (SEC ID N°: 92)

20

CDR 3: HQRSSWPPLT (SEC ID N°: 93)

Tabla 2: secuencias de CDR de anticuerpos anti CMV y secuencias consenso (como se determinan usando los métodos de Kabat y Chothia para la cadena pesada, cuyas CDR son idénticas para la cadena ligera).

	CDRH1 (Kabat)	SEC ID N°:	CDRH2 (Kabat)	SEC ID N°:	CDRH3 (Kabat)	SEC ID N°:
2F10	SNHGIH	36	VISSDGDYADSVKQ	37	DGRGEPKCYSGLPDY	38
2M16	SNYGMH	48	VISSDGSNEHYADSVKQ	49	DGRCPDVNCYSGGLIDY	50
2N9	SSNGIH	57	VISSDANDKQYADSVKQ	58	DGTCSSGNCYSGGLIDY	59
4P12	SNHGIH	36	VISKDGTNAHYADSVRG	68	EGRCIEENCYSGQIDY	69
5P9	SNHGIH	36	VISKDGTNAHYADSVRGR	79	EGRCIEEKCYSGQIDY	80
9C16	SDYGMH	85	VISKDGTNTHYADSVRG	86	DGKCPDLKCYSGGLIDY	87
Consenso A	SXXGXH	95	VISDXXXXXXYADSVRG	96	XCXCXXXCYSGXXDY	97
Consenso B	SXXGIH	98	VISDGNXNHYADSVXG	99	DGXCSXXXCYSG LXDY	100
Consenso C	SXYGMH	101			EGRCIEENCYSGQIDY	102
Consenso D					DGXCPDXXCYSGGLIDY	103
	CDRH1		CDRH2		CDRH3	
	(Chothia)		(Chothia)		(Chothia)	
2F10	GFTFSN	39	VISSDGDYADSVKQ	40	DGRGEPKCYSGLPDY	38
2M16	GLTFSN	118	VISSDGSNEH	51	DGRCPDVNCYSGGLIDY	50
2N9	GFTFSS	60	VISSDANDKQ	61	DGTCSSGNCYSGGLIDY	59
4P12	KFIFSN	70	VISKDGTNAH	71	EGRCIEENCYSGQIDY	69
5P9	KFIFSN	70	VISKDGTNAH	71	EGRCIEEKCYSGQIDY	80
9C16	GLTFSD	88	VISKDGTNTH	89	DGKCPDLKCYSGGLIDY	87
Consenso A	XXFX	104	VISDXXXXXX	105	XCXCXXXCYSGXXDY	106
Consenso B	GXTFSX	107	VISKDGTNXH	108	DGXCSXXXCYSG LXDY	109
Consenso C					EGRCIEENCYSGQIDY	110

	CDRL1		CDRL2		CDRL3	
2F10	RASQSVGGYLA	43	DASNRAT	44	LQRNTWPPLT	45
2M16	RASQSVGRYLA	53	DASNRAT	44	QQRSNWPPLT	54
2N9	RASQSVGGYLA	43	ASIRAT	64	HQRSNWPPLT	65
4P12	RASQSVGRYMA	74	DASIRAT	75	QQRSSWPPLT	76
5P9	RASQSVGRYMA	74	DASIRAT	75	QQRSSWPPLT	76
9C16	RASQSVGGYLA	43	DASKRAT	92	HQRSSWPPLT	93
Consenso A	RASQSVGXYYA	111	XASXRAT	112	XQRXXWPPLT	113
Consenso B	RASQSVGXYYLA	114	DASXRAT	115	HQRSXWPPLT	116
Consenso C					QQRXSXWPPLT	117

Ejemplo 2

IDENTIFICACIÓN DE REGIONES VARIABLES DE ANTICUERPO CONSERVADAS

5 Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera Kappa y cadena pesada Gamma de los siete anticuerpos producidos como se ha descrito en el Ejemplo 1 se alinearon para identificar regiones y restos conservados, como se muestra en las Figuras 1A y 1B.

10 Las regiones variables de los anticuerpos anti CMV generados estaban altamente conservadas. Por ejemplo, los anticuerpos designados 3C21 y 4P12 eran idénticos en la región variable de cadena pesada y tenían solamente una diferencia de un aminoácido en la cadena ligera kappa, que parece ser un artefacto de PCR, ya que la secuencia de 4P12 coincide con la línea germinal. La cadena gamma de 5P9 fue idéntica a la cadena gamma de 3G7 y tenía una diferencia de un aminoácido dentro de CD3 de las cadenas gamma de 3C21 y 4P12. La cadena kappa de 5P9 fue estrechamente coincidente (una diferencia de 1 aminoácido) con la cadena kappa de 5A11, 3C21 y 4P12 (las últimas dos cadenas son idénticas entre sí excepto por un cambio D/E). La cadena gamma de 9C16 era más similar a la cadena gamma de 2M16, y la cadena kappa de 9C16 era más similar a la cadena kappa de 2N9 (diferencias de solamente dos aminoácidos). La cadena kappa de 3G7 fue bastante diferente de las otras, incluyendo 5P9, lo que sugiere que la unión observada se debe a la cadena pesada.

20 Estos datos demuestran la naturaleza altamente conservada de anticuerpos que se unen específicamente con el epítipo AD2 de gp116 de CMV, e identifican regiones de anticuerpo importantes para dicha especificidad.

Ejemplo 3

25 UNIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES CON CMV

Los anticuerpos recombinantes, 2F10, 2M16, 2N9, 3C21, 3G7, 4P12 y 5J12, se produjeron en cantidades de mg por transfecciones transitorias a mayor escala en células 293 PEAK y se ensayaron con respecto a su capacidad para unirse con virus CMV inactivado por UV que recubre una placa por ELISA. La capacidad de unión de los anticuerpos se ensayó en ausencia y presencia del péptido epitópico AD2 de gp116 de CMV competidor, y también se comparó con la unión de un anticuerpo de control, ITC88, que también se une con el epítipo AD2 de gp116 de CMV. (Ohlin *et al.* 1993, J Virol 67: 703-710).

35 Se usó un anticuerpo secundario anti humano conjugado con HRP como el reactivo de detección.

Como se muestra en las Figuras 2-8, los anticuerpos 2F10, 2M16, 2N9, 3C21 y 4P12 se unían cada uno con CMV y competían por el péptido epitópico AD2 de gp116 de CMV. Estos datos demuestran que los anticuerpos recombinantes humanos generados contra el epítipo gp116 de CMV también son capaces de unirse específicamente con el virus CMV.

Ejemplo 4

NEUTRALIZACIÓN DE CMV POR ANTICUERPOS RECOMBINANTES.

45 Los anticuerpos recombinantes 2F10, 2M16, 2N9, 3C21, 3G7, 4P12, se ensayaron con respecto a su capacidad para inhibir hCMV mezclando virus hCMV con cada uno de los anticuerpos, y usando después la mezcla para infectar células. Después se representó la relación de células infectadas y células totales en función de la concentración de anticuerpo. Se contaron los núcleos celulares totales tiñendo con YOYO-1, y se determinaron los núcleos infectados por hCMV permeabilizando las células y determinando la unión del antígeno temprano inmediato de CMV con el anticuerpo monoclonal designado 1-K-10 (IgG2a de ratón; Meridian Life Science, Cincinnati, OH), que a su vez se detectó con anti IgG de ratón con alexafluor (AF) 647 (H&L) (Invitrogen; Carlsbad, CA). También se usó el anticuerpo de control ITC88 en cada experimento.

55 Como se muestra en las Figuras 9-14, los anticuerpos 2F10, 2M16, 2N9, 3C21 y 4P12 inhibieron cada uno hCMV hasta un nivel comparable al del anticuerpo ITC88 de control. Estos datos demuestran que los anticuerpos recombinantes humanos generados contra el epítipo AD2 de gp116 de CMV son capaces de neutralizar el virus CMV.

Ejemplo 5

60 POTENCIA Y ESPECTRO DE NEUTRALIZACIÓN DE ANTICUERPOS DE HCMV: DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS GENERALES

65 El CMV puede entrar en una amplia serie de tipos celulares humanos. Recientemente, se ha indicado que las interacciones de glucoproteína de CMV-receptor de hospedador varían con diferentes tipos celulares. Sin embargo, un problema central con respecto a la capacidad del CMV para entrar en todos los tipos celulares es la interacción

del complejo de glucoproteína gB (compuesto de las proteínas gp58 y gp116) con receptores de células hospedadoras.

5 Se generó una serie de anticuerpos anti HCMV mediante un procedimiento que implicaba la recogida de sangre de varios voluntarios humanos sanos, seguido de recogida y estimulación de linfocitos B, como se describe en el Ejemplo 1. Se ensayaron IgG secretados con respecto a sensibilidad al epítipo AD2 dentro del extremo amino terminal de gB. Las cadenas pesadas y ligeras se clonaron a partir de linfocitos B que expresaban IgG de unión a AD2. Se han determinado las afinidades de unión para cada anticuerpo.

10 Todos los anticuerpos ensayados neutralizaron potentemente la entrada de CMV independientemente de la cepa viral o el tipo celular de infección. Esto se diferencia de la infección por CMV de cobaya, en la que, como se esperaba, ninguno de los anticuerpos neutralizadores tuvo ningún efecto. La especificidad de los anticuerpos anti HCMV por gB de HCMV frente a gB de GPCMV se debe a secuencias divergentes dentro de estas proteínas que afectan a la eficacia de la unión con el anticuerpo (Tabla 3). Los datos descritos posteriormente apoyan ensayos
15 adicionales del conjunto actual de anticuerpos neutralizadores de CMV y dirección de otros complejos de glucoproteínas de CMV.

Materiales y métodos

20 Anticuerpos

Se obtuvieron anticuerpos 2N9, 5P9, 2F10, 4P12, 2M16 e ITC88 usando el método descrito anteriormente. Anticuerpo gH(1) es una referencia a anticuerpo anti glucoproteína H neutralizador. Cytotect™ es un producto terapéutico de CMV disponible en el mercado fabricado por Chong Lap (H.K.) CO. LTD.

25 Virus

Se obtuvo cepa VR1814 de HCMV a partir de las secreciones del cuello uterino de una mujer embarazada. Los tres aislados de HCMV clínicos 8818, 8819 y 8824 se aislaron del esputo, lavado alveolar bronquial y tejido pulmonar, respectivamente, de pacientes infectados y se propagaron en la línea celular endotelial ARPE-19. La cepa de CMV de Cobaya V545/82 se obtuvo de Mark Schleiss y contiene un gen indicador de GFP (McGregor A. y Schleiss M. R. (2001) Molecular Genetics and Metabolism 72(1): 15-26).

35 Líneas celulares

Las líneas celulares usadas en estos ensayos son la línea celular epitelial derivada de ser humano ARPE-19 (células del epitelio pigmentado retiniano, ATCC N° de catálogo CRL-2302), línea celular de fibroblastos derivados de ser humano NN-NHDF (fibroblastos dérmicos humanos normales neonatales, Lonza N° de catálogo CC-2509), línea celular endotelial derivada de ser humano HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana, Lonza N° de catálogo CC-2517), y línea celular de fibroblastos derivada de cobaya JH4 (fibroblasto de pulmón de cobaya, ATCC N° de catálogo CCL-158).

Ensayo de entrada

45 Se sembraron células ARPE-19, NN-NHDF, HUVEC y JH4 en placas de 96 pocillos a una concentración de 8×10^3 células por pocillo en un volumen de 100 μ l de medio de cultivo. Las células ARPE-19 se cultivaron en medio DMEM/F-12 completo, las células NN-NHDF se cultivaron en DMEM completo, las células HUVEC se cultivaron en medio EGM-2, y las células JH4 se cultivaron en medio F-12K. Las células se incubaron durante una noche a 37 °C y CO₂ 5 %. Al día siguiente, las células se infectaron en primer lugar retirando el medio de cultivo y lavando cada pocillo tres veces con 100 μ l de medio sin suero por pocillo. Las células ARPE-19 se lavaron con SF-DMEM/F-12, las células NN-NHDF se lavaron con SF-DMEM, las células HUVEC se lavaron con EBM-2 y las células JH4 se lavaron con medio SF-F-12K. Los anticuerpos se diluyeron en serie en el medio sin suero para cada línea celular respectiva (véase anteriormente) y se mezclaron con suficiente virus para infectar el 50 % de las células en 96 pocillos y se incubaron a 37 °C y CO₂ 5 % durante 1 hora. Los pocillos se infectaron añadiendo la mezcla de virus/anticuerpo en volúmenes de 50 μ l por pocillo por triplicado. Se incubaron las placas de ARPE y HUVEC a 37 °C y CO₂ 5 % durante 3 horas y las placas de NN-NHDF y JH4 se incubaron a 37 °C y CO₂ 5 % durante 1 hora. El medio que contenía virus/anticuerpo se retiró y los pocillos se lavaron tres veces con 100 μ l del medio completo apropiado (véase anteriormente) por pocillo. No se retiró el lavado final. Las placas se incubaron a 37 °C y CO₂ 5 % durante una noche.

60 Tinción con IE de VR1814 y aislados clínicos de HCMV

El medio se retiró y las células se fijaron con 100 μ l/pocillo de paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA). Después se retiró el paraformaldehído y las células se lavaron tres veces con 100 μ l/pocillo de PBS. Cada pocillo recibió 50 μ l de anticuerpo anti IE de CMV de ratón diluido a 1:2000 en PBS-GC que

contenía Triton X-100 0,1 % y se incubaron a TA durante 1 h.

El anticuerpo de IE se retiró y los pocillos se lavaron tres veces con 100 μ l/pocillo de PBS. Cada pocillo recibió 50 μ l de anticuerpo secundario y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en la misma etapa mezclando anticuerpo de cabra anti ratón Alexa Fluor 594 a 1:2000 en PBS-GC y DAPI 1:5000 en PBS-GC. Las placas se incubaron en oscuridad a TA durante 1 h. El anticuerpo secundario se retiró y los pocillos se lavaron tres veces con 100 μ l/pocillo de PBS. No se retiró el tercer lavado. Las placas se leyeron en una plataforma de captura de imágenes de alto contenido Cellomics ArrayScan@VTI.

10 Tinción de GPCMV

El medio se retiró y las células se fijaron con 100 μ l/pocillo de paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos a TA. Después se retiró el paraformaldehído y las células se lavaron tres veces con 100 μ l/pocillo de PBS. Cada pocillo recibió 50 μ l de DAPI 1:5000 en PBS-GC. Las placas se incubaron en oscuridad a TA durante 10 minutos. El DAPI se retiró y los pocillos se lavaron tres veces con 100 μ l/pocillo de PBS. El tercer lavado no se retiró. Las placas se leyeron en una plataforma de captura de imágenes de alto contenido en Cellomics ArrayScan@VTI.

Análisis

Los datos de los ensayos de neutralización se recogieron usando la plataforma de captura de imágenes de alto contenido Cellomics ArrayScan@VTI. Las placas se sellaron con sellos de placa adhesivos transparentes y se cargaron con un brazo robótico. Las placas infectadas con VR1814 y aislados clínicos de HCMV se analizaron usando el protocolo de Activación de Diana NB-TA-2CH (1000 objetos contados por pocillo). Las placas infectadas con GPCMV se analizaron usando el protocolo de Traslocación Molecular NB-MT-CMV de Cobaya (1000 objetos contados por pocillo). El % de infecciosidad se calculó dividiendo el número de células positivas para CMV (detectadas por IE o GFP dependiendo del virus) por pocillo por el número de células por pocillo y multiplicando por 100. El % de infecciosidad relativo para cada dilución se calculó tomando el % de infecciosidad de pocillos que no tenían anticuerpo (solamente virus) y dividiéndolo por el % de infecciosidad de cada dilución de cada anticuerpo y multiplicándolo por 100. El % de infecciosidad relativo se representa gráficamente frente a la concentración de los anticuerpos en μ g/ml y la concentración inhibidora semimáxima (CI50) se determina como la concentración de anticuerpo a la que el 50 % de los virus infecciosos observados en el control solamente con virus se neutralizan (infecciosidad relativa al 50 %).

Sumario

Los datos presentados en el presente documento muestran que los seis anticuerpos que se dirigen a la región AD-2 de DLD en glucoproteína B de HCMV son capaces de neutralizar la entrada de HCMV en líneas celulares de fibroblastos, epiteliales y endoteliales derivadas de seres humanos. Las CI50 de cada anticuerpo son uniformes entre las tres líneas celulares infectadas con VR1814 lo que demuestra su capacidad para neutralizar la entrada independientemente del tipo celular. Estos anticuerpos son capaces también de neutralizar la entrada de tres aislados clínicos de HCMV de pase bajo en NN-NHDF con casi ninguna diferencia en la potencia neutralizante observada entre cada anticuerpo. Este efecto también se ve en células HUVEC y ARPE-19 infectadas con el aislado clínico 8819 de HCMV. Ninguno de los anticuerpos ensayados fueron capaces de neutralizar la entrada de GPCMV en la línea celular de fibroblastos de cobaya JH4. Sin embargo, esto no era inesperado ya que hay una gran variabilidad de secuencia entre gB de GPCMV y gB de HCMV en la región AD-2 de esta proteína. Todos los anticuerpos anti gB de HCMV neutralizaron uniformemente todas las cepas de virus HCMV ensayadas en las tres líneas celulares derivadas de ser humano sin diferencias significativas en su potencia.

Ejemplo 6

LOS ANTICUERPOS DE HCMV NEUTRALIZAN POTENTEMENTE LA INFECCIÓN POR VR1814 DE CÉLULAS EPITELIALES HUMANAS (ARPE-19), CÉLULAS ENDOTELIALES (HUVEC) Y FIBROBLASTOS (NHDF)

Los anticuerpos anti HCMV se ensayaron a diluciones que variaban de 30 a 0,003 μ g/ml y fueron capaces de neutralizar la infección por HCMV VR1814 de los tres tipos celulares (Figura 15). Las CI50 registradas fueron entre 0,35 y 1,73 μ g/ml y fueron comparables con el control positivo, gH(1). Hubo pocas diferencias en la potencia de neutralización entre cada uno de los anticuerpos. Los seis anticuerpos mostraron una neutralización uniforme de VR1814 en todas las líneas celulares sin variabilidad significativa en las CI50.

Ejemplo 7

LOS ANTICUERPOS DE HCMV NEUTRALIZAN POTENTEMENTE LA INFECCIÓN DE FIBROBLASTOS DE AISLADOS TÉCNICOS DE HCMV 8818, 8819 Y 8824

Los anticuerpos anti HCMV se ensayaron en diluciones que variaban de 30 a 0,003 μ g/ml y fueron capaces de

neutralizar infecciones por fibroblastos de aislados clínicos de HCMV 8818, 8819 y 8824 (Figura 16). Las CI50 registradas fueron entre 0,19 y 0,83 µg/ml y fueron comparables con el control positivo, gH(1) con la excepción del aislado clínico 8824 que mostró una CI50 desplazada (mayor) en gH(1). Hubo pocas diferencias entre cada uno de los anticuerpos. Los seis anticuerpos muestran neutralización uniforme de las tres infecciones por aislados clínicos de fibroblastos sin variabilidad significativa en las CI50.

Ejemplo 8

LOS ANTICUERPOS DE HCMV NEUTRALIZAN POTENTEMENTE LAS INFECCIONES DE CÉLULAS ENDOTELIALES (HUVEC) Y EPITELIALES (ARPE-19) DEL AISLADO CLÍNICO DE HCMV 8819

Los aislados clínicos 8818 y 8824 no están completamente adaptados para infecciones por células endoteliales y células epiteliales y, por lo tanto, no tienen actualmente una titulación suficientemente alta para medir diferencias estadísticamente significativas en la infección de células HUVEC y ARPE-19. Por lo tanto, solamente estaba 8819 en estos tipos celulares. Los anticuerpos anti HCMV se ensayaron a diluciones que variaban de 30 a 0,003 µg/ml y fueron capaces de neutralizar potentemente infecciones de células epiteliales (ARPE-19) y endoteliales (HUVEC) del aislado clínico de HCMV 8819 (Figura 17). Las CI50 registradas fueron entre 0,19 y 0,83 µg/ml y fueron comparables con el control positivo, gH(1). Hubo poca diferencia entre cada uno de los anticuerpos. Los seis anticuerpos neutralizaron uniformemente el aislado clínico 8819 en ambas líneas celulares sin variabilidad significativa en las CI50. Las altas desviaciones típicas vistas en algunas de las muestras en células HUVEC se atribuyen a una baja cantidad de virus infecciosos. Aunque 8819 es capaz de infectar HUVEC, el % de infecciosidad es menor, lo que hace al % de infecciosidad relativo más variable.

Ejemplo 9

LOS ANTICUERPOS DE HCMV NO NEUTRALIZAN LA ENTRADA DE GPCMV EN CÉLULAS JH4

Ninguno de los anticuerpos anti HCMV fueron capaces de neutralizar la cepa V545/82 de GPCMV en células JH4 (Figura 18). Los anticuerpos anti HCMV no tuvieron ningún efecto observable en la entrada de GPCMV hasta 300 µg/ml, que fue la mayor concentración ensayada. La heparina fue el único compuesto capaz de inhibir la entrada de GPCMV en células JH4. La incapacidad de estos anticuerpos para bloquear la entrada de GPCMV se atribuye al alto grado de variabilidad de secuencia entre gB de GPCMV y las secuencias de gB en los otros aislados de HCMV ensayados (Tabla 3).

Tabla 3: alineamiento de Ad-2.

	65	70	80	90	100	110	
VR1814 gB	63	VSHRANETIYNTITLKYGVVGVNITTKYPYRVC	CSMAQGTDLIRFERNI	ICTPKRPI			SEC ID Nº: 25
8818 gB	63	VSHRANETIYNTITLKYGVVGVNITTKYPYRVC	CSMAQGTDLIRFERNI	ICTPKRPI			SEC ID Nº: 26
8819 gB	63	VSHGVNEIYNTITLKYGVVGVNITTKYPYRVC	CSMAQGTDLIRFERNI	ICTSKRPI			SEC ID Nº: 27
8824 gB	61	VSHRANETIYNTITLKYGVVGVNITTKYPYRVC	CSMAQGTDLIRFERNI	ICTPKRPI			SEC ID Nº: 28
GPCMV gB	58	S--ENNTVIRNLTASVDFSQ--RKL	YPYRCSKSEGTDLIRFARTIQCVFNP				SEC ID Nº: 29
Consenso	65	VSHRANETIYNTITLKYGVVGVNITTKYPYRVC	CSMAQGTDLIRFERNI	ICTPKRPI			SEC ID Nº: 30

La región AD-2 está destacada en negro

A partir de lo anterior se apreciará que, aunque en el presente documento se han descrito realizaciones específicas de la invención con fines ilustrativos, pueden realizarse diversas modificaciones. En consecuencia, la invención no está limitada salvo por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti CMV aislado o fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende:

- 5 (I)
- (a) una región V_H que comprende
- 10 (i) una región V_H CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SSNGIH (SEC ID N°: 57);
(ii) una región V_H CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VISSDANDKQYADSVKG (SEC ID N°: 58);
(iii) una región V_H CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DGTCSGGNCYSGLIDY (SEC ID N°: 59); y

- 15 (b) una región V_L que comprende
- (i) una región V_L CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43);
20 (ii) una región V_L CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de ASIRAT (SEC ID N°: 64);
(iii) una región V_L CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de HQRSNWPPLT (SEC ID N°: 65); o

- 25 (II)
- (a) una región V_H que comprende
- (i) una región V_H CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSS (SEC ID N°: 60);
30 (ii) una región V_H CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VISSDANDKQ (SEC ID N°: 61);
(iii) una región V_H CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DGTCSGGNCYSGLIDY (SEC ID N°: 59); y

- (b) una región V_L que comprende
- 35 (i) una región V_L CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSVGGYLA (SEC ID N°: 43);
(ii) una región V_L CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de ASIRAT (SEC ID N°: 64);
40 (iii) una región V_L CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de HQRSNWPPLT (SEC ID N°: 65).

2. El anticuerpo anti CMV de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende:

una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 56 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 63.

3. El anticuerpo anti CMV de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho anticuerpo se une con un epítipo de la proteína de envoltura de glucoproteína b (gB) del virus CMV.

4. El anticuerpo anti CMV de la reivindicación 3, en el que dicho epítipo comprende el sitio 1 de determinante antigénico 2 de gB, gp116.

5. Una composición que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1, 2, 3 o 4.

6. La composición de la reivindicación 5, que comprende además un agente antiviral, en el que dicho agente antiviral es opcionalmente ganciclovir, foscarnet, cidofovir, valganciclovir e inmunoglobulina intravenosa (IVIG).

7. La composición de la reivindicación 5, que comprende además un segundo anticuerpo anti CMV.

8. El anticuerpo de la reivindicación 1, 2, 3 o 4, en el que dicho anticuerpo está unido operativamente con un agente terapéutico o un marcador detectable.

9. La composición de la reivindicación 5 para uso en el tratamiento o prevención de una infección por CMV en un sujeto.

10. La composición para uso de la reivindicación 9, en la que la composición comprende además un agente antiviral.

11. La composición para uso de la reivindicación 10, en la que dicho agente antiviral es ganciclovir, foscarnet, cidofovir, valganciclovir e inmunoglobulina intravenosa (IVIG).
- 5 12. La composición para uso de la reivindicación 9, en la que dicha composición se administra antes de o después de la exposición a CMV.
13. La composición para uso de la reivindicación 9, en la que dicha composición se administra a una dosis suficiente para neutralizar la infección por CMV.
- 10 14. Un método para determinar la presencia de una infección por CMV en un paciente, que comprende las etapas de:
- 15 (a) poner en contacto una muestra biológica obtenida del paciente con el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3 o 4;
- (b) detectar una cantidad del anticuerpo que se une con la muestra biológica; y
- (c) comparar la cantidad de anticuerpo que se une con la muestra biológica con un valor de control, y determinar a partir de la misma la presencia del virus de la gripe en el paciente.
- 20 15. Un kit de diagnóstico que comprende el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3 o 4.

2F10 gamma	QVHLV	ESGG	GVVQ	PPGR	IALR	RLSC	AAAT	GFET	FSNH	GIHM	VRQA	PIGK	GL	EWLA	AVI	SSDG	DDDR	YAD	SVKGR	FRF																
2M16 gamma	QVQLV	DSGG	GMVQ	PPGR	SLR	LSCS	SASG	LTF	FSN	YGM	HMVR	QA	PIGK	GL	EMVA	AVI	SSDG	SNEH	YAD	SVKGR	FRF															
2N9 gamma	QVQLV	ESGG	GVVQ	PPGR	SLR	LSCA	AA	SGFT	FSS	NGI	HMVR	QA	PIGK	GL	DWVA	AVI	SSD	ANDK	QYAD	SVKGR	FRF															
3C21 gamma	QVQLV	ESGG	GVVQ	PPGR	SLR	LSCV	AS	KFT	FSNH	GIHM	VRQA	PIGK	GL	EMVA	AVI	SKDG	TNAH	YAD	SVRGR	FRF																
4P12 gamma	QVQLV	ESGG	GVVQ	PPGR	SLR	LSCV	AS	KFT	FSNH	GIHM	VRQA	PIGK	GL	EMVA	AVI	SKDG	TNAH	YAD	SVRGR	FRF																
5P9 gamma	QVQLV	ESGG	GVVQ	PPGR	SLR	LSCV	AS	KFT	FSNH	GIHM	VRQA	PIGK	GL	EMVA	AVI	SKDG	TNAH	YAD	SVRGR	FRF																
3G7 gamma	QVQLV	ESGG	GVVQ	PPGR	SLR	LSCV	AS	KFT	FSNH	GIHM	VRQA	PIGK	GL	EMVA	AVI	SKDG	TNAH	YAD	SVRGR	FRF																
9C16 gamma	QVQLV	DSGG	GVVQ	PPGR	SLR	LSCA	AA	SGLT	FSD	YGM	HMVR	QA	PIGK	GL	EMVA	AVI	SKDG	TNTH	YAD	SVRGR	FRF															
5I12 gamma	QVQLV	ESGG	GVVQ	PPGR	SLR	LSCV	AS	KFT	FSNH	GIHM	VRQA	PIGK	GL	EMVA	AVI	SKDG	TNAH	YAD	SVRGR	FRF																
Consenso	QVQLV	eS	GGV	iQ	PGR	sLR	LS	CvA	s	k	f	i	FS	n	h	G	IHM	VRQA	PIGK	GL	eM	v	AVI	s	KD	g	t	n	a	h	YAD	SV	r	G	R	F

2F10 gamma	SVSRD	NSK	NTVH	LQ	MNG	LR	P	DD	T	A	I	Y	F	C	A	R	D	G	R	C	G	E	P	K	C	Y	S	G	L	P	D	Y	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S												
2M16 gamma	TISRDN	S	FN	N	M	L	Y	LQ	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	S	A	R	D	G	R	C	P	D	V	N	C	Y	S	G	L	I	D	Y	W	G	Q	T	L	V	T	V	S						
2N9 gamma	TISRDN	S	K	N	M	V	Y	LQ	M	N	S	L	R	V	E	D	T	A	V	Y	F	C	A	R	D	G	T	C	S	G	N	C	Y	S	G	L	I	D	Y	W	G	R	G	I	L	V	T	V	S					
3C21 gamma	SISRDN	S	K	D	T	V	F	L	E	M	R	S	L	R	P	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	E	G	R	C	I	E	E	N	C	Y	S	G	Q	I	D	Y	W	G	Q	S	L	V	T	V	S					
4P12 gamma	SISRDN	S	K	D	T	V	F	L	E	M	R	S	L	R	P	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	E	G	R	C	I	E	E	N	C	Y	S	G	Q	I	D	Y	W	G	Q	S	L	V	T	V	S					
5P9 gamma	SISRDN	S	K	D	T	V	F	L	E	M	R	S	L	R	P	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	E	G	R	C	I	E	E	K	C	Y	S	G	Q	I	D	Y	W	G	Q	S	L	V	T	V	S					
3G7 gamma	SISRDN	S	K	D	T	V	F	L	E	M	R	S	L	R	P	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	E	G	R	C	I	E	E	K	C	Y	S	G	Q	I	D	Y	W	G	Q	S	L	V	T	V	S					
9C16 gamma	TISRDN	S	K	N	I	F	Y	LQ	M	N	G	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	S	G	R	D	G	K	C	P	D	L	K	C	Y	S	G	L	I	D	Y	W	G	Q	T	L	V	T	V	S						
5I12 gamma	SISRDN	S	K	D	T	V	F	L	E	M	R	S	L	R	P	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	E	G	R	C	I	E	E	N	C	Y	S	G	Q	I	D	Y	W	G	Q	S	L	V	T	V	S					
Consenso	s	I	S	R	D	N	s	k	d	t	v	f	l	e	m	r	s	l	r	p	e	d	t	a	v	y	c	a	r	e	g	r	c	i	e	e	n	c	y	s	g	q	i	d	y	w	g	q	s	l	v	t	v	s

Fig. 1A

EI	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	D	R	A	T	L	S	C	R	A	S	S	V	G	G	Y	L	A	M	Y	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	D	A	S	N	R	A	T	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G
EI	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	S	V	G	R	Y	L	A	M	Y	Q	K	G	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	D	A	S	N	R	A	T	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G
EI	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	S	V	G	G	Y	L	A	M	Y	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	D	A	S	I	R	A	T	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G
EI	L	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	S	V	G	R	Y	M	A	M	Y	Q	R	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	D	A	S	I	R	A	T	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G
EI	L	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	S	V	G	R	Y	M	A	M	Y	Q	R	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	D	A	S	I	R	A	T	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G
EI	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	S	V	G	G	Y	L	A	M	Y	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	D	A	S	N	R	A	T	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G
D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	I	T	C	R	A	S	S	I	S	S	Y	L	N	M	Y	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	
EI	L	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	S	V	G	R	Y	M	A	M	Y	Q	R	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	D	A	S	I	R	A	T	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G
EI	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	S	V	G	G	Y	L	A	M	Y	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	D	A	S	K	R	A	T	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G

- 2F10 kappa
- 2M16 kappa
- 2N9 kappa
- 3C21 kappa
- 4P12 kappa
- ITC88 kappa
- 3G7 kappa
- 5P9 kappa
- 9C16 kappa

Consenso

e	I	V	I	T	Q	S	P	a	t	L	S	I	S	p	G	e	R	a	t	L	S	C	R	A	S	v	g	X	Y	I	A	M	Y	Q	k	p	G	q	A	P	r	L	L	i	Y	d	A	S	X	r	a	t	G	i	P	a	R	F	S	G	S	G
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

T	D	F	T	L	T	I	S	L	E	P	E	D	F	F	A	L	Y	C	L	Q	R	N	T	W	P	P	L	T	F	G	G	T	K	V	E	I	K	R	T	100	
T	D	F	T	L	T	I	S	L	E	P	E	D	F	F	A	V	Y	C	Q	Q	R	S	N	W	P	P	L	T	F	G	G	G	S	K	V	E	I	K	R	T	110
T	D	F	T	L	T	I	S	L	E	P	E	D	F	F	A	V	Y	C	H	Q	R	S	N	W	P	P	L	T	F	G	G	T	K	V	D	I	K	R	T		
T	D	F	T	L	T	I	S	L	Q	P	E	D	F	F	A	I	Y	C	Q	Q	R	S	S	W	P	P	L	T	F	G	G	T	K	V	D	I	K	R	T		
T	D	F	T	L	T	I	S	L	Q	P	E	D	F	F	A	I	Y	C	Q	Q	R	S	S	W	P	P	L	T	F	G	G	T	K	V	E	I	K	R	T		
T	D	F	T	L	T	I	S	L	A	P	E	D	F	F	A	V	Y	F	C	Q	Q	R	S	S	W	P	P	L	T	F	G	G	T	K	V	E	I	K	R	T	
T	D	F	T	L	T	I	S	L	Q	P	E	D	F	F	A	T	Y	C	Q	Q	R	S	Y	S	·	T	H	W	T	F	G	Q	T	K	V	D	I	K	R	T	
T	D	F	T	L	T	I	S	L	Q	T	E	D	F	F	A	I	Y	C	Q	Q	R	S	S	W	P	P	L	T	F	G	G	T	K	V	E	I	K	R	T		
T	D	F	T	L	T	I	S	L	E	P	E	D	F	F	A	I	Y	C	H	Q	R	S	S	W	P	P	L	T	F	G	G	T	K	V	D	I	K	R	T		

- 2F10 kappa
- 2M16 kappa
- 2N9 kappa
- 3C21 kappa
- 4P12 kappa
- ITC88 kappa
- 3G7 kappa
- 5P9 kappa
- 9C16 kappa

Consenso

T	D	F	T	L	I	s	L	X	p	E	D	F	A	X	Y	y	C	q	Q	r	s	W	p	p	I	T	F	G	g	T	K	V	e	I	K	R	T
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Fig. 1B

ELISA VIRAL DE HCMV

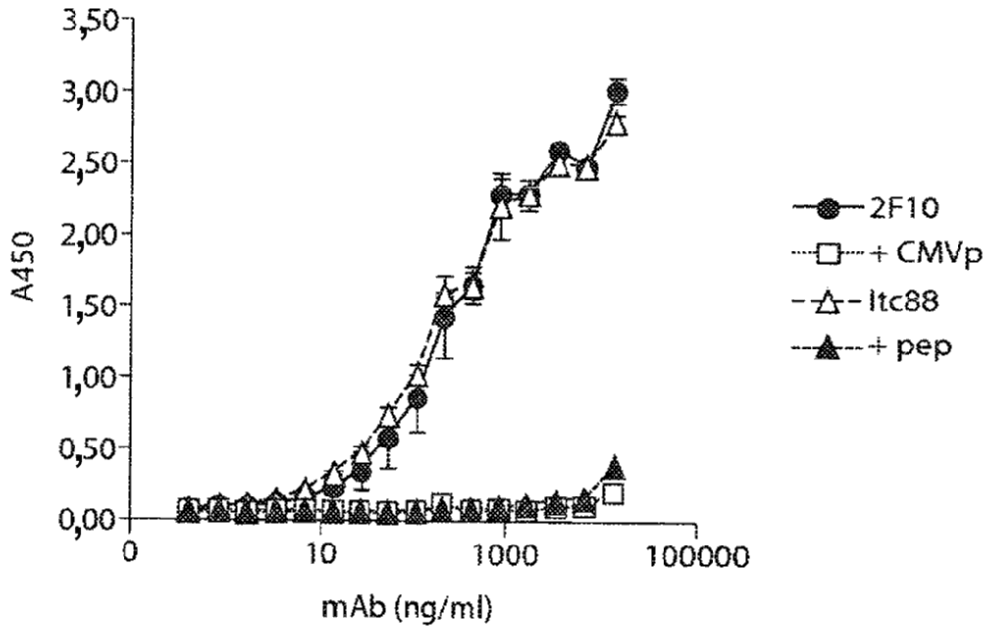


Fig. 2

ELISA VIRAL DE HCMV

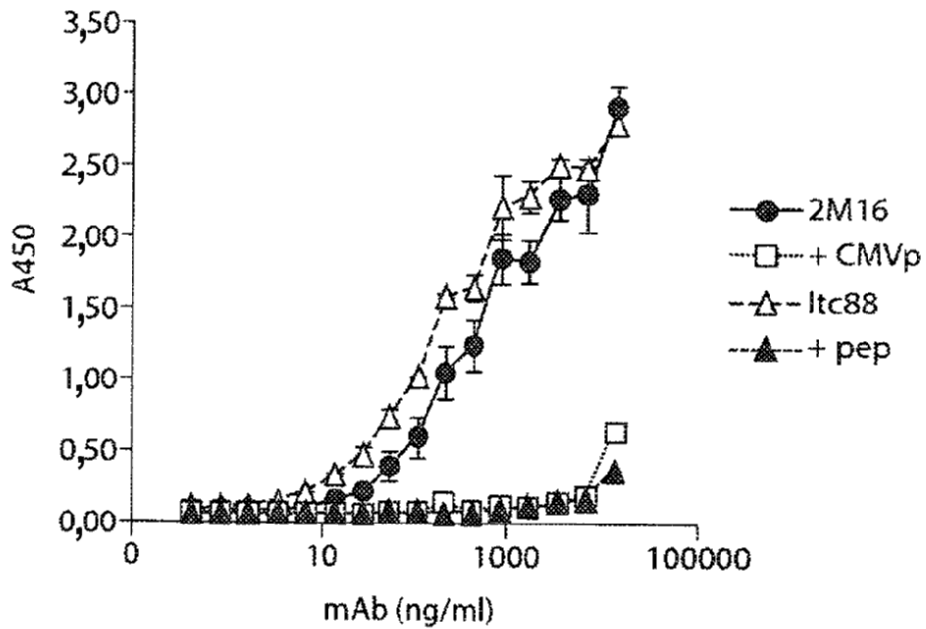


Fig. 3

ELISA VIRAL DE HCMV

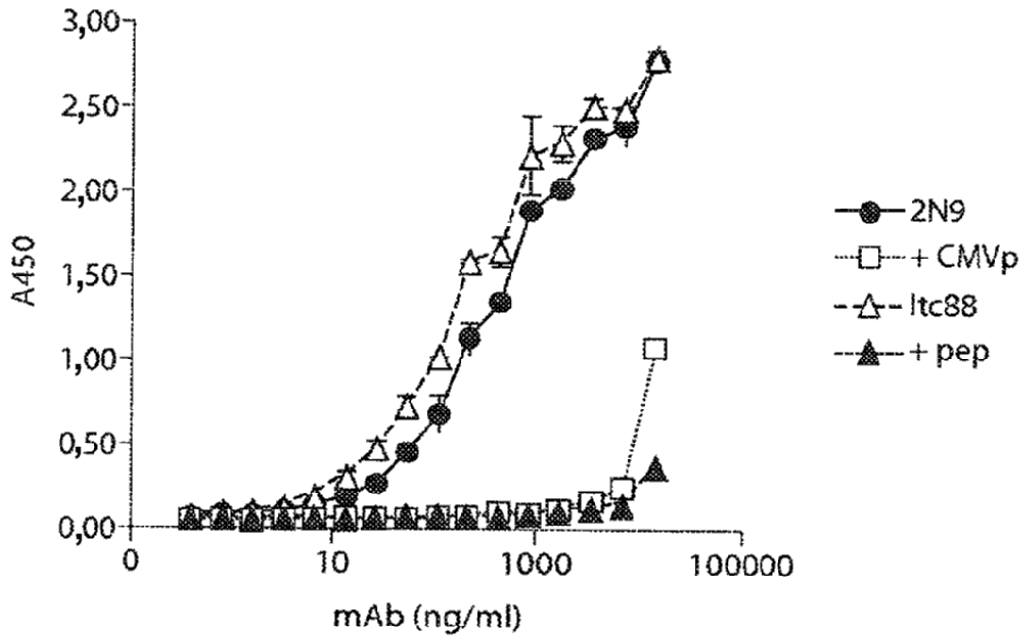


Fig. 4

ELISA VIRAL DE HCMV

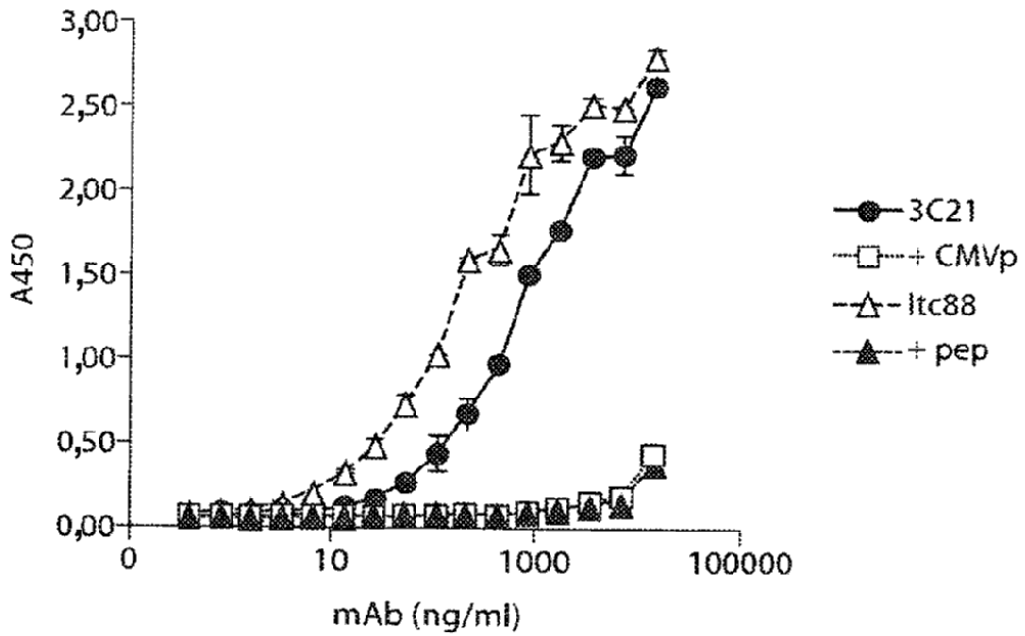


Fig. 5

ELISA VIRAL DE HCMV

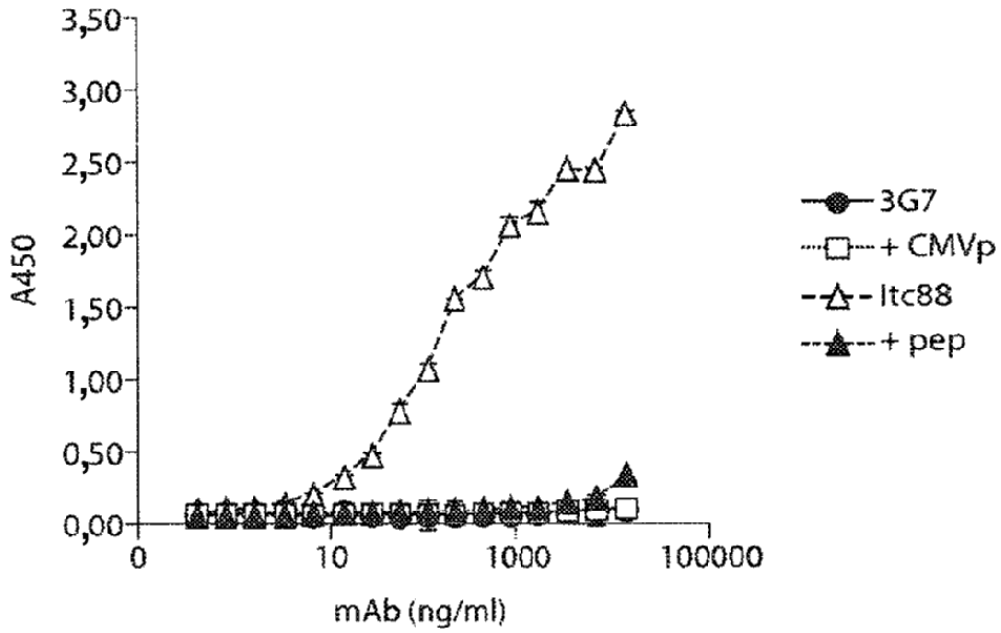


Fig. 6

ELISA VIRAL DE HCMV

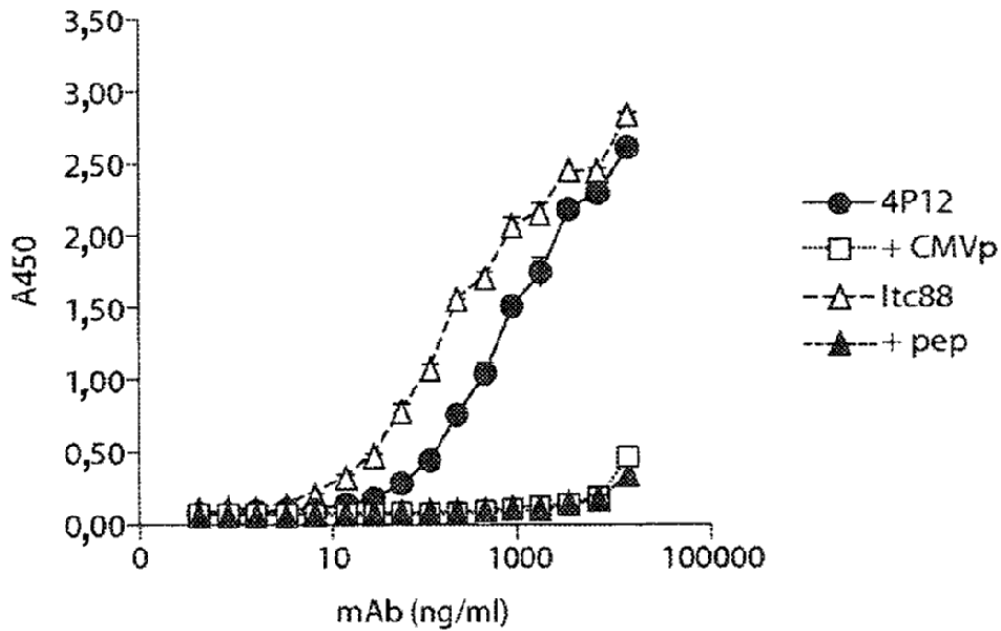


Fig. 7

ELISA VIRAL DE HCMV

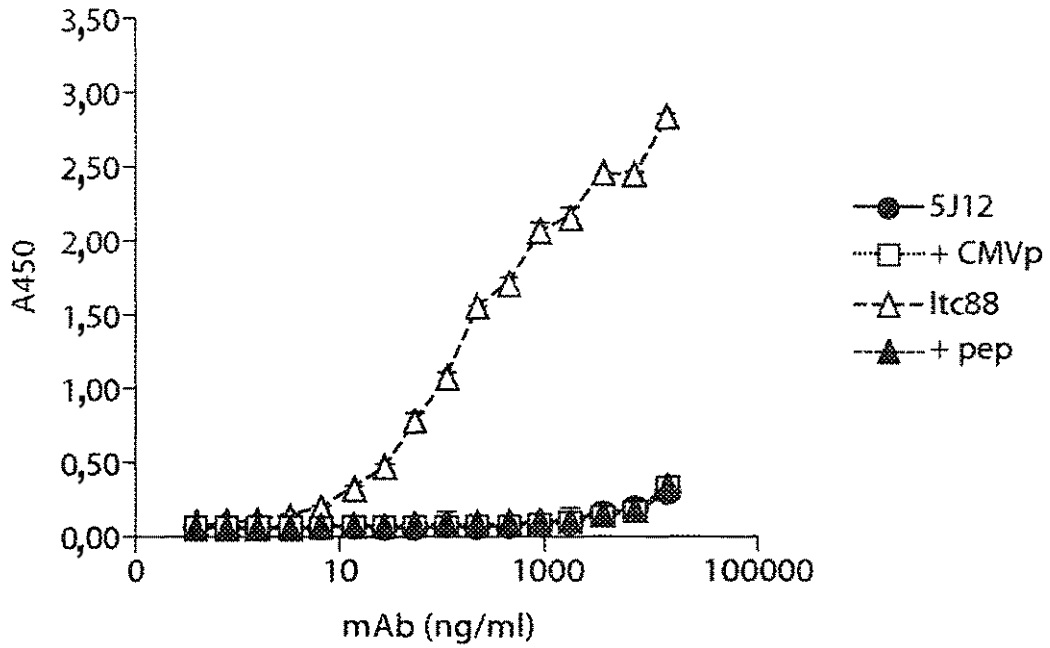


Fig. 8

INHIBICIÓN DE hCMV POR 2F10

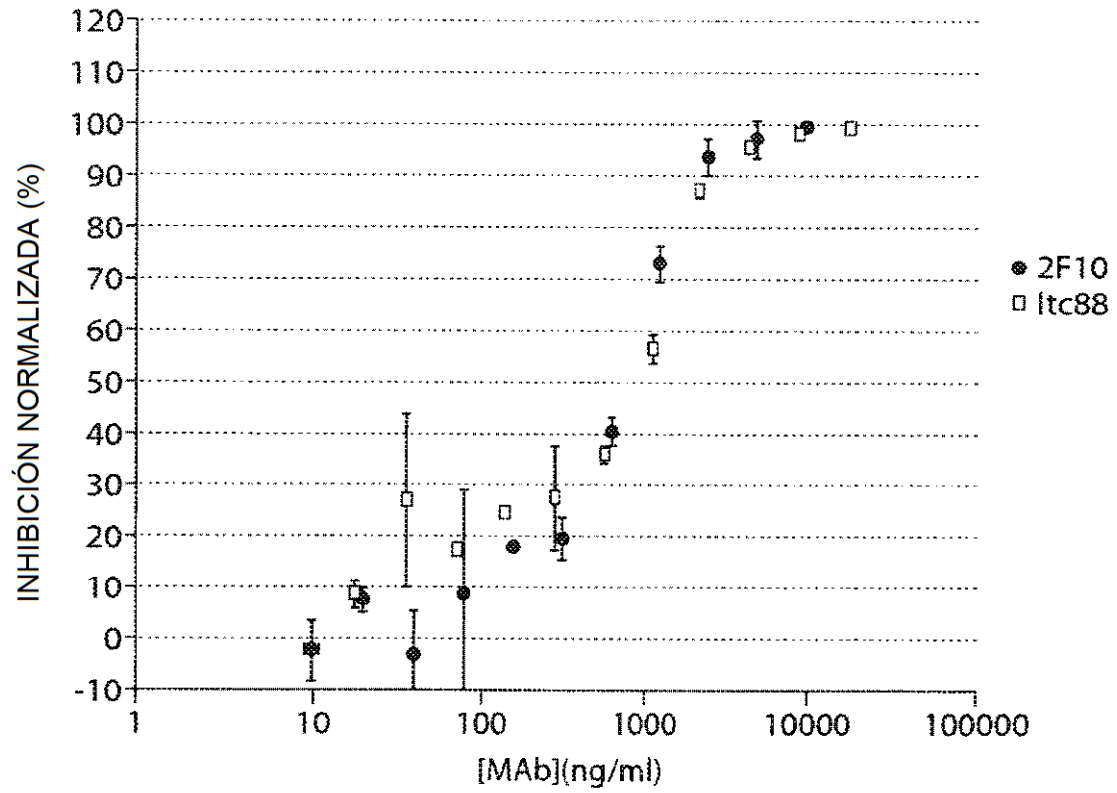


Fig. 9

INHIBICIÓN DE hCMV POR 2M16

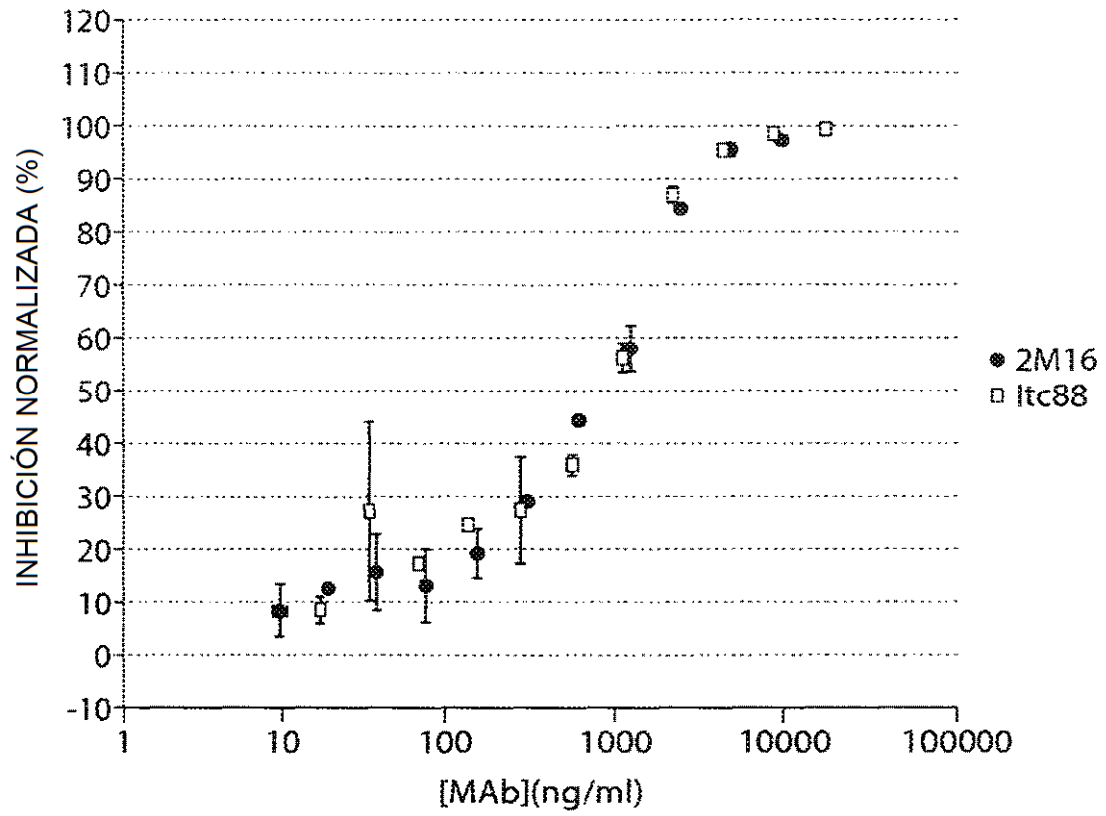


Fig. 10

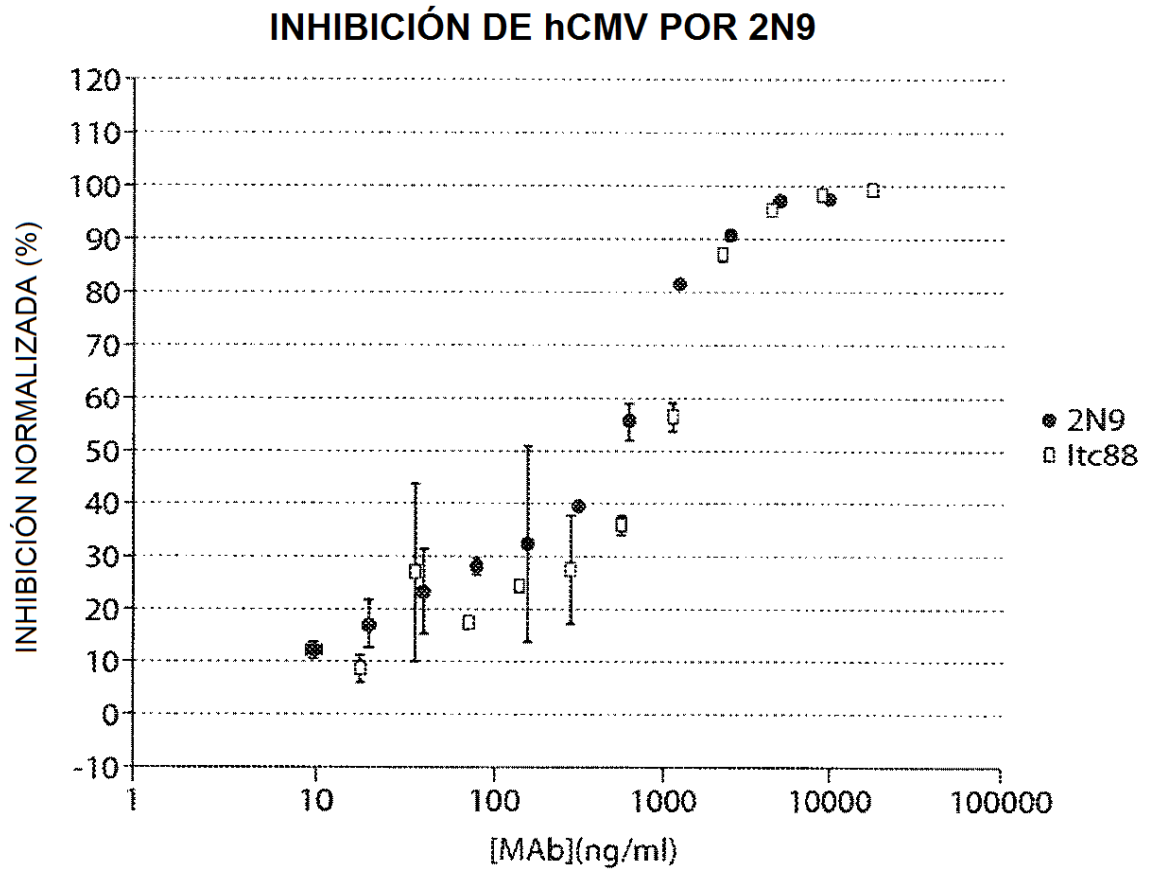


Fig. 11

INHIBICIÓN DE hCMV POR 3C21

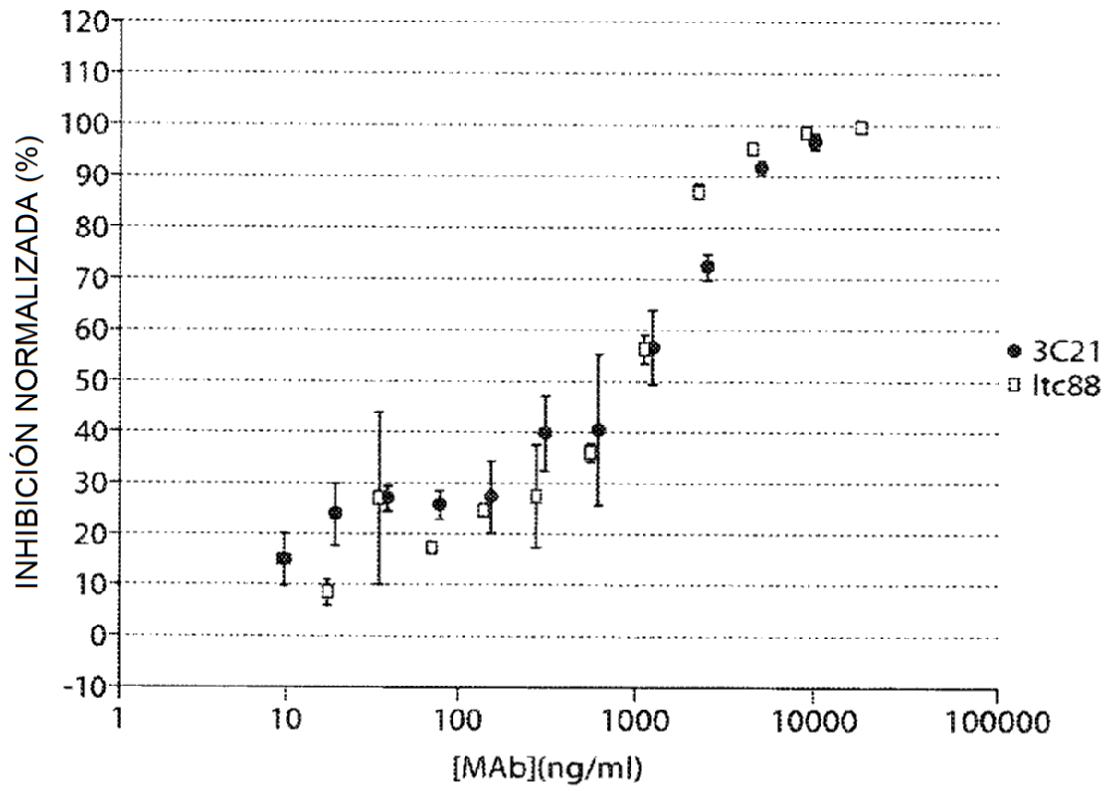


Fig. 12

INHIBICIÓN DE hCMV POR 3G7

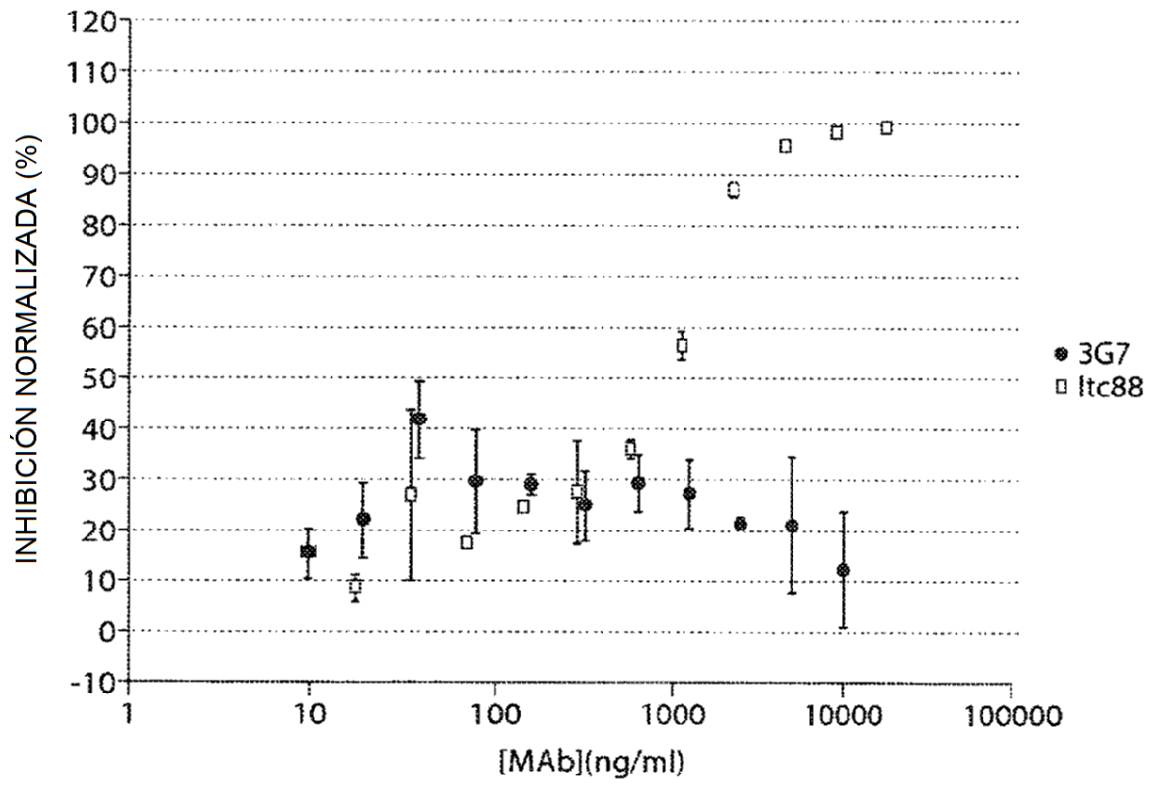


Fig. 13

INHIBICIÓN DE hCMV POR 4P12

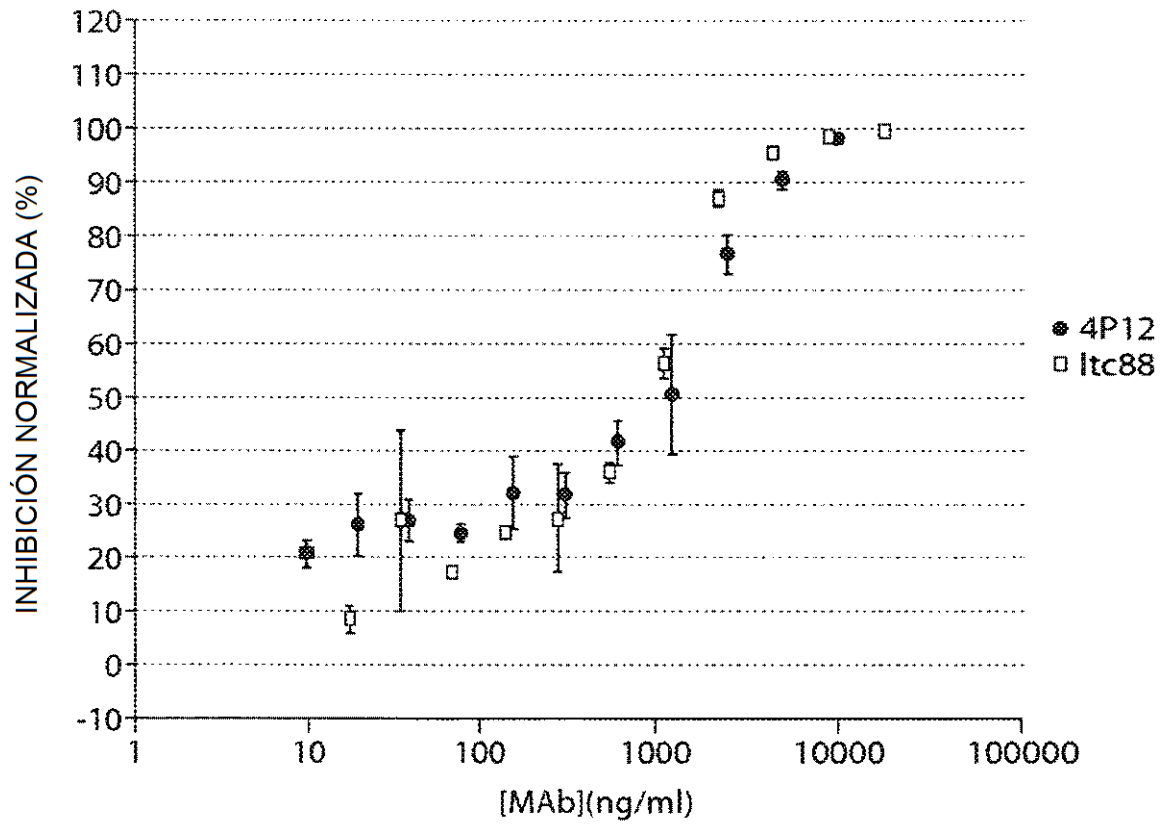


Fig. 14

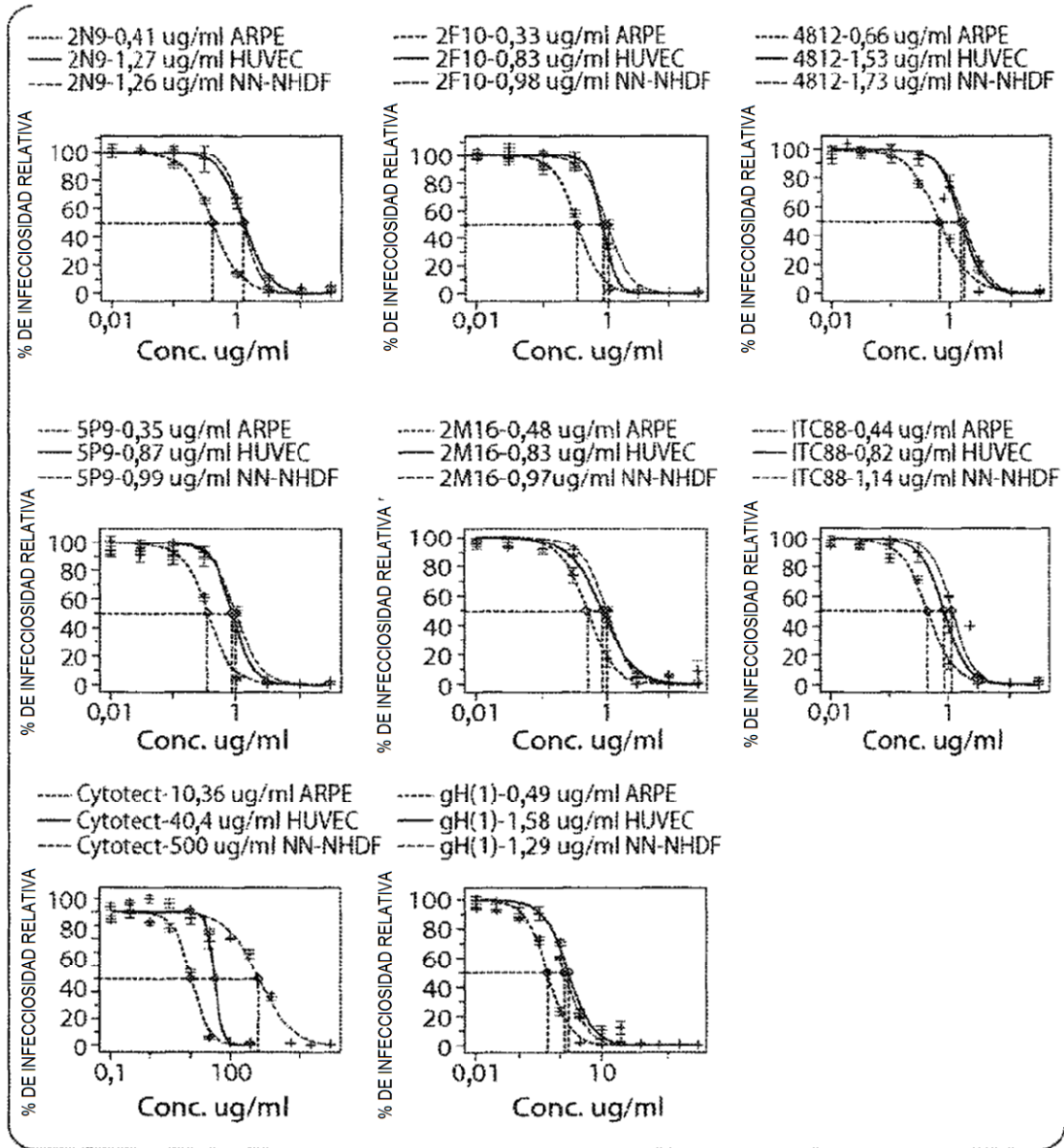


Fig. 15

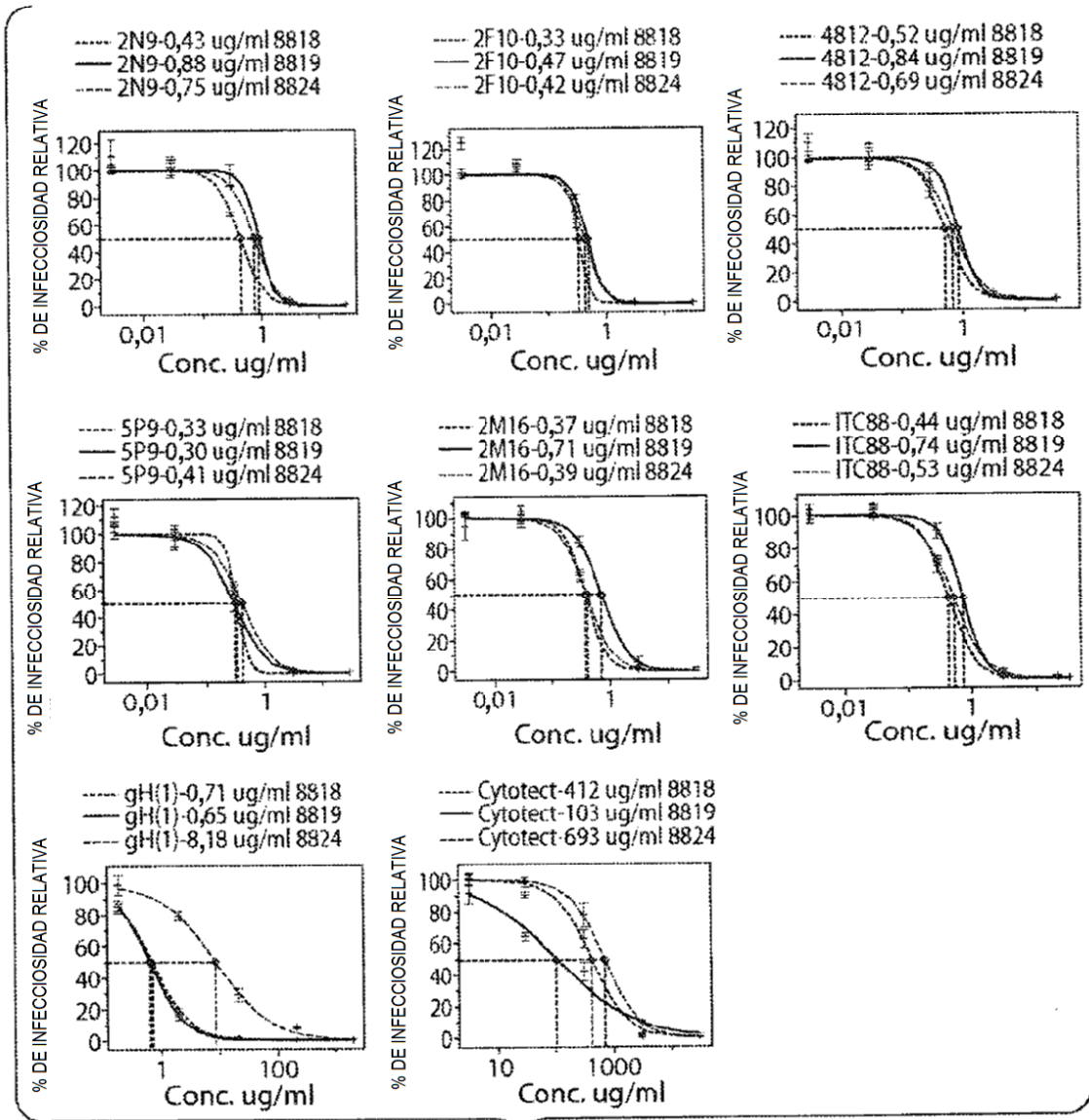


Fig. 16

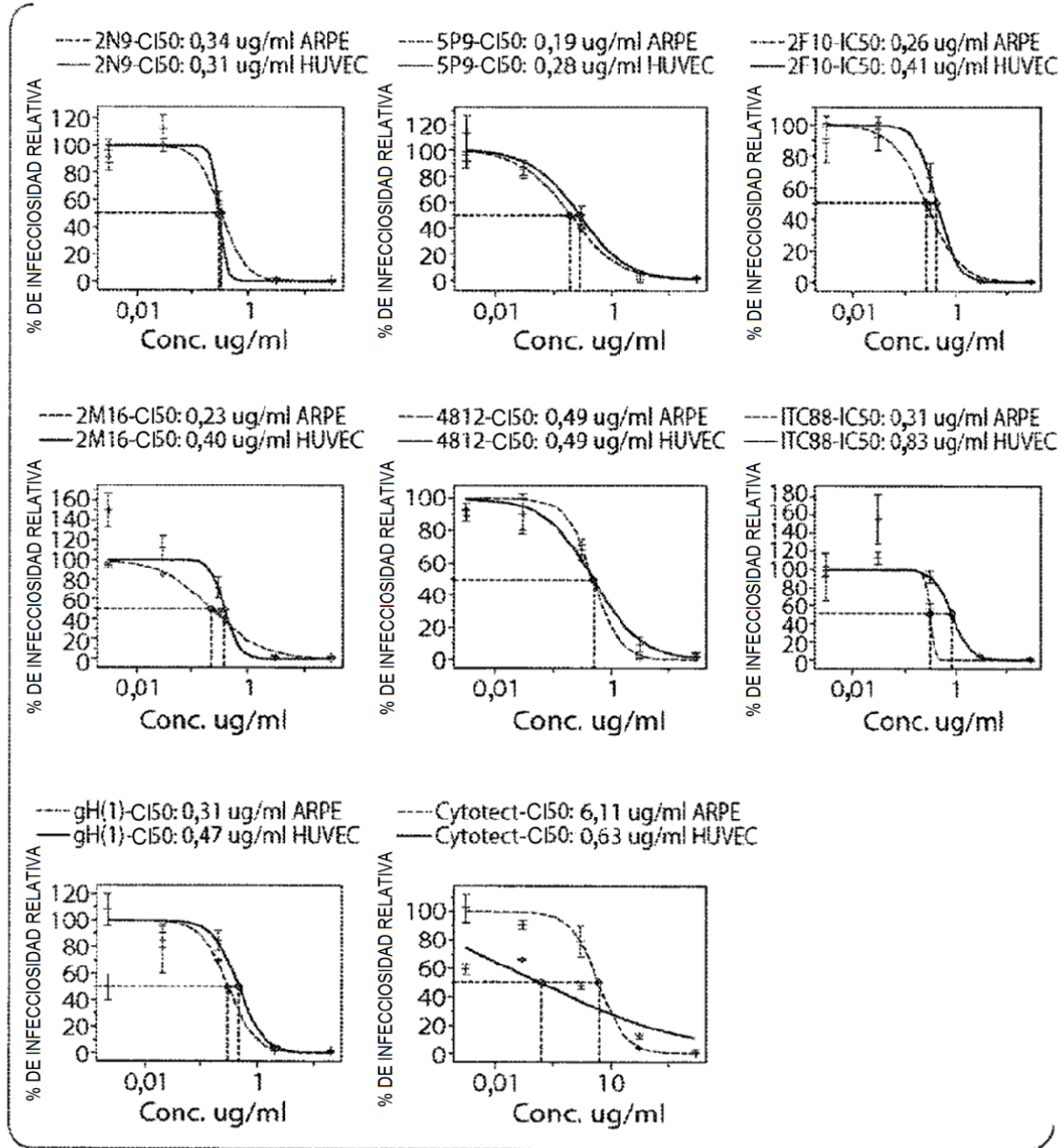


Fig. 17

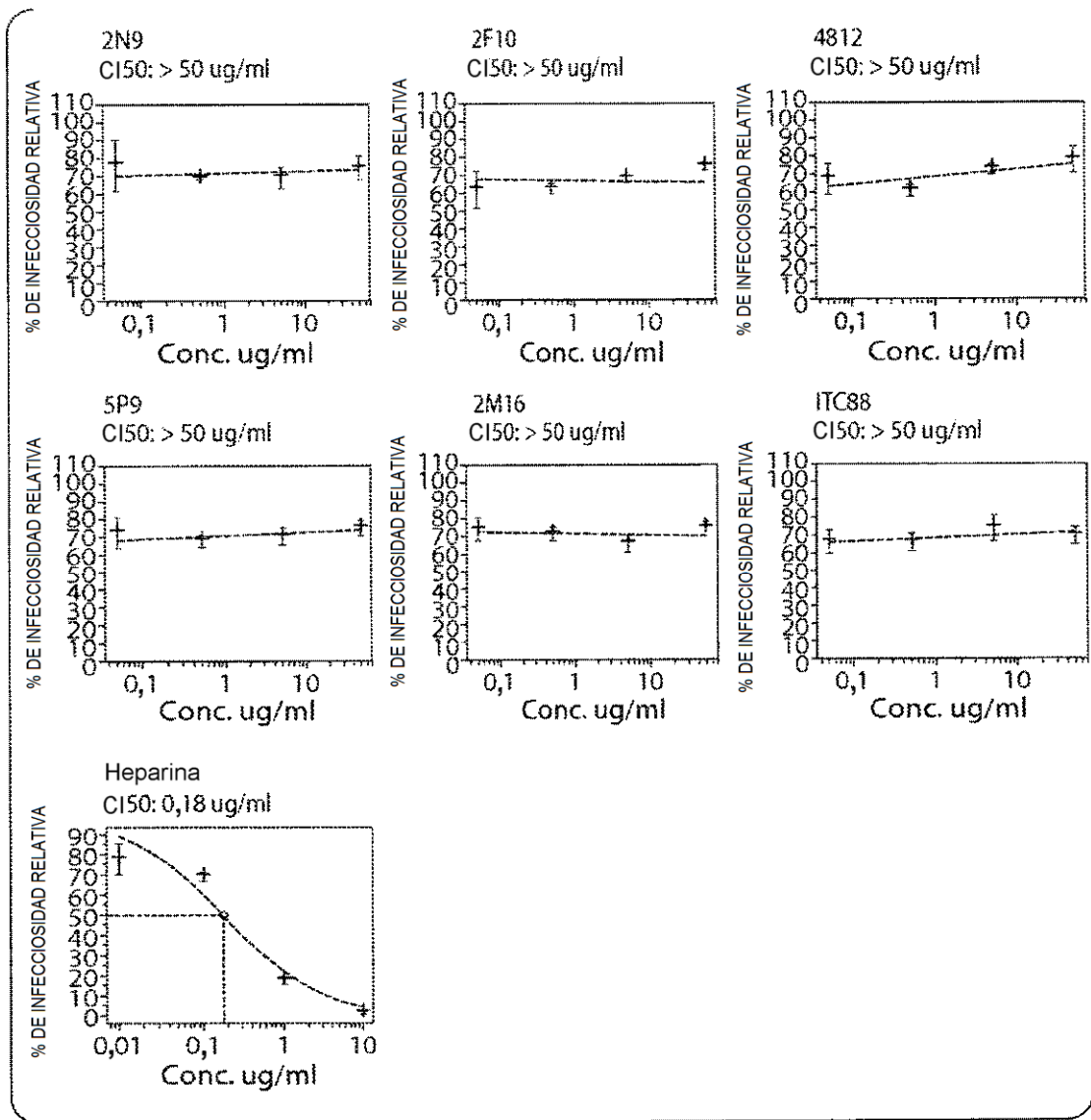


Fig. 18