

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 014**

51 Int. Cl.:

C07K 16/08 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2008 E 08875708 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2303923**

54 Título: **Anticuerpos neutralizantes del citomegalovirus humano y uso de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.10.2015

73 Titular/es:

**INSTITUTE FOR RESEARCH IN BIOMEDICINE
(100.0%)
Via Vincenzo Vela 6
6500 Bellinzona, CH**

72 Inventor/es:

**LANZAVECCHIA, ANTONIO y
MACAGNO, ANNALISA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 548 014 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos neutralizantes del citomegalovirus humano y uso de los mismos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a anticuerpos que tienen una elevada potencia en la neutralización del citomegalovirus humano (hCMV) y que son específicos para una combinación de las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A. En el presente documento se describen linfocitos B inmortalizados que producen dichos anticuerpos monoclonales.

En el presente documento también se describe el epítipo determinado por una combinación de las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A a las que se unen los anticuerpos, así como el uso de los anticuerpos y del epítipo en métodos de cribado, de diagnóstico, de profilaxis y de terapia de una enfermedad.

15 Antecedentes de la técnica

El citomegalovirus humano (hCMV) es un patógeno ampliamente distribuido que puede provocar una patología grave en adultos inmunodeprimidos y tras la infección del feto, y que se ha relacionado con enfermedades crónicas tales como la aterosclerosis. El hCMV infecta múltiples tipos celulares que incluyen fibroblastos, células endoteliales, epiteliales y hematopoyéticas [1]. Las cepas atenuadas propagadas *in vitro* del hCMV que están siendo desarrolladas como vacunas candidatas han perdido el tropismo por las células endoteliales, mientras que conservan la capacidad de infectar a los fibroblastos [2]. Se cree que dos complejos glucoproteicos víricos controlan el tropismo celular del hCMV. Parece que es necesario un complejo de glucoproteínas tales como gH, gL y gO para la infección de los fibroblastos, mientras que un complejo de gH, gL y las proteínas codificadas por los genes UL131 - UL128 están implicados en la infección de las células endoteliales, de las células epiteliales y de las células dendríticas [2-8].

Ya se han comercializado globulinas hiperinmunes para la profilaxis de la enfermedad por el hCMV asociada al trasplante, y pruebas recientes indican que tienen un efecto terapéutico en mujeres embarazadas [9]. Esta metodología terapéutica está limitada por la baja cantidad de anticuerpos neutralizantes que pueden ser transferidos, y por esta razón sería altamente deseable la disponibilidad de anticuerpos humanos (tales como anticuerpos monoclonales humanos) con una elevada capacidad de neutralización.

Sin embargo, la diana de los anticuerpos neutralizantes del hCMV aún está por establecer. Aunque algunos anticuerpos contra la gH, la gB y los productos del gen UL128 y UL130 han mostrado una actividad de neutralización *in vitro* [7, 10, 11] y se ha evaluado un anticuerpo contra la gH en ensayos clínicos que fueron interrumpidos debido a la ausencia de efectos terapéuticos, la potencia de neutralización de los anticuerpos monoclonales aislados es hasta ahora modesta, dado que se observó una neutralización a unas concentraciones de anticuerpos que varían desde 0,5 hasta 20 microgramos/ml. Además, los métodos actuales miden normalmente la potencia de neutralización de los anticuerpos anti-hCMV mediante el uso de fibroblastos como células diana.

Sin embargo, también se sabe que el hCMV provoca enfermedades mediante la infección de otros tipos celulares tales como células endoteliales, epiteliales y leucocitos. Los anticuerpos conocidos contra la UL128 y la UL130 muestran una potencia muy baja en la neutralización de la infección de las células endoteliales [7] y parece que no hay ningún anticuerpo monoclonal disponible que sea capaz de neutralizar la infección de células diana que no sean fibroblastos con una elevada potencia. Se han descrito anticuerpos contra un complejo proteico del CMV que comprende pUL128 o pUL130 [43], al igual que anticuerpos que neutralizan el hCMV, incluyendo anticuerpos específicos para una combinación de la UL130 y la UL131A [44].

Existe por tanto una necesidad de anticuerpos que neutralizan la infección por el hCMV de células diana que no sean fibroblastos con una mayor potencia, así como la elucidación de la (las) diana (s) al (las) que se une(n) dichos anticuerpos.

55 Sumario de la invención

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de nuevos anticuerpos que neutralizan el hCMV con una elevada potencia, así como de nuevos epítipos a los que se unen anticuerpos de la invención. Consecuentemente, en una forma de realización, la invención comprende un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que es específico para una combinación de las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A, formando la combinación en epítipo reconocido por dicho anticuerpo o fragmento de unión, y que neutraliza la infección de las células endoteliales, de las células retinianas o de las células dendríticas por parte del citomegalovirus humano (hCMV), en el que el anticuerpo o el fragmento comprende las secuencias de la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 según se establece en la SEQ ID NO: 1, en la SEQ ID NO: 2 y en la SEQ ID NO: 3, respectivamente, y las secuencias de la cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 según se establece en la SEQ ID NO: 4, en la SEQ ID NO: 5 y en la SEQ ID NO: 6, respectivamente.

En otra forma de realización la invención comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención.

5 En otra forma de realización más la invención comprende un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención.

En una forma de realización adicional la invención comprende una célula que comprende un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención.

10 En el presente documento también se describe un clon de linfocitos B inmortalizados que expresan un anticuerpo que tiene una elevada potencia en la neutralización del hCMV, en el que dicho anticuerpo es específico para una combinación de las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A.

15 En el presente documento también se describe un epítipo que se une a un anticuerpo de la invención, un polipéptido inmunógeno que comprende un epítipo que se une a un anticuerpo de la invención, y un ligando que se une a un epítipo que se une a un anticuerpo de la invención.

20 En el presente documento se describen métodos para la producción de anticuerpos con una elevada potencia en la neutralización del hCMV, en los que dicho anticuerpo es específico para una combinación de las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A. El método comprende (i) el cultivo de un clon de linfocitos B inmortalizados que expresan un anticuerpo de la invención y (ii) el aislamiento de los anticuerpos a partir de los linfocitos B.

25 En otra forma de realización la invención comprende una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención, y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un ácido nucleico de la invención, un clon de linfocitos B inmortalizados que expresan un anticuerpo de la invención, o un polipéptido inmunógeno que comprende un epítipo que se une a un anticuerpo o a un fragmento de anticuerpo de la invención.

30 En una forma de realización adicional la invención comprende el uso de un anticuerpo o de un fragmento, de un ácido nucleico, o de una célula o de una composición de la invención, en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una infección por el hCMV; y un anticuerpo o un fragmento o la composición de la invención para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección por el hCMV.

35 En el presente documento se describe un kit para el diagnóstico de una infección por el hCMV que comprende anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención, un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención, o un epítipo que se une a un anticuerpo de la invención.

40 En el presente documento también se describe un método para la preparación de una célula recombinante. El método comprende: (i) la secuenciación de un ácido nucleico a partir de un clon de linfocitos B inmortalizados que expresan un anticuerpo de la invención y (ii) el uso de la información de la secuencia obtenida a partir de la etapa (i) para la preparación de un ácido nucleico para su inserción en un hospedador de expresión con objeto de permitir la expresión del anticuerpo de interés en ese hospedador.

45 También se describe un método para la producción de anticuerpos que tienen una elevada potencia en la neutralización del hCMV y que son específicos para una combinación de las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A. El método comprende el cultivo o el subcultivo de un vector de expresión obtenible mediante el método descrito anteriormente, y opcionalmente, la purificación del anticuerpo de interés.

50 También se describe un método de cribado de polipéptidos que pueden inducir una respuesta inmunitaria frente al hCMV, que comprende el cribado de genotecas de polipéptidos mediante el uso de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo de la invención.

Breve descripción de los dibujos

55 La Figura 1 muestra un análisis mediante FACS que demuestra que el anticuerpo monoclonal humano (mAb) 6G4 reconoce un epítipo terminado por una combinación de las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A.

60 La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 6G4. Las secuencias CDR están en negrita.

Descripción detallada de la invención

65 La invención se basa en la producción de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpos que neutralizan una infección por el hCMV y que tienen una potencia particularmente elevada en la neutralización de una infección por el hCMV. Dichos anticuerpos son deseables, ya que únicamente se requieren unas bajas concentraciones con objeto de neutralizar una cantidad dada de virus. Esto facilita unos mayores niveles de protección mientras se administran

unas cantidades menores de anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales humanos también están incluidos en el ámbito de la invención. Los inventores han descubierto que los anticuerpos dirigidos contra una combinación de las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A son particularmente eficaces en la neutralización del hCMV. Sin estar ceñidos a ninguna teoría, esta combinación puede ser un complejo concreto de UL128, UL130 y UL131A que forma un único epítipo reconocido por el anticuerpo.

En el presente documento también se describe la caracterización del epítipo al que se unen los anticuerpos y el uso de ese epítipo para aumentar la respuesta inmunitaria.

En el presente documento también se describen varios métodos y usos que implican los anticuerpos de la invención, y los epítopos a los que se unen.

Anticuerpos de la invención

La invención se refiere a anticuerpos monoclonales o recombinantes que tienen una potencia particularmente elevada en la neutralización del hCMV. La invención también se refiere a fragmentos de estos anticuerpos monoclonales o recombinantes, particularmente a fragmentos que conservan la actividad de unión al antígeno de los anticuerpos. En esta memoria descriptiva, por "una elevada potencia en la neutralización del hCMV" se entiende que una molécula de anticuerpo de la invención neutraliza el hCMV en un ensayo estándar a una concentración mucho menor que los anticuerpos conocidos en la materia, por ejemplo, en comparación con MSL-109, 8F9 o 3E3.

En una forma de realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención puede neutralizar el hCMV a una concentración de 0,16 µg/ml o inferior (es decir, de 0,15, de 0,125, de 0,1, de 0,075, de 0,05, de 0,025, de 0,02, de 0,015, de 0,0125, de 0,01, de 0,0075, de 0,005, de 0,004, de 0,003, de 0,002 o inferior). En otra forma de realización, el anticuerpo puede neutralizar el hCMV a una concentración de 0,016 µg/ml o inferior (es decir, a una concentración de anticuerpo inferior a, por ejemplo, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M). Esto significa que sólo se requieren unas concentraciones de anticuerpos muy bajas para la neutralización del 50 % de una cepa clínica del hCMV *in vitro* en comparación con la concentración de los anticuerpos conocidos, por ejemplo, MSL-109, 8F9 o 3E3, requerida para la neutralización del mismo título de hCMV. En una forma de realización adicional, la concentración del anticuerpo de la invención requerida para la neutralización del 50 % de la infección de células endoteliales, de células epiteliales y de células dendríticas por parte de una cepa clínica del hCMV *in vitro* es 10 veces inferior o más (es decir, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o más) a la requerida por MSL-109, 8F9 o 3E3. La potencia puede medirse mediante el uso de un ensayo de neutralización estándar según se describe en la materia.

Los anticuerpos de la invención son capaces de neutralizar una infección por el hCMV de diversos tipos celulares. Un anticuerpo de acuerdo con la invención impide la infección de las células endoteliales, de las células retinianas o de las células dendríticas.

Estos anticuerpos pueden usarse como agentes profilácticos o terapéuticos tras una formulación apropiada, o como una herramienta diagnóstica.

Un "anticuerpo de neutralización" es aquel que neutraliza la capacidad del patógeno para iniciar y/o perpetuar una infección en un hospedador. La invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano de neutralización, en el que el anticuerpo reconoce un antígeno del hCMV.

Específicamente, un anticuerpo de acuerdo con la invención tiene especificidad por una combinación de las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A.

En una forma de realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo monoclonal denominado en el presente documento 6G4. Este anticuerpo, aislado a partir de un donante infectado por el hCMV, es producido por un clon de linfocitos B inmortalizados denominado 6G4. Este anticuerpo neutraliza una infección por el hCMV de células endoteliales, de células epiteliales, tales como células retinianas, y de células mieloides, tales como células dendríticas.

La cadena pesada del 6G4 tiene la secuencia de aminoácidos citada en la SEQ ID NO: 7 y la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos citada en la SEQ ID NO: 8. Las CDR de las cadenas pesadas del anticuerpo se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente. De forma análoga, las CDR de las cadenas ligeras del anticuerpo se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente. La posición de los aminoácidos de las CDR se define de acuerdo con el sistema de numeración IMGT [12, 13, 14] como: CDR1 - posiciones IMGT 27 a 38, CDR2 - posiciones IMGT 56 a 65 y CDR3 - posiciones IMGT 105 a 117.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR de este anticuerpo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

	6G4
CDRH1	GYRFTSY (SEQ ID NO: 1)
CDRH2	IYPGDSI (SEQ ID NO: 2)
CDRH3	ARLSLTESGDYVGAFDI (SEQ ID NO: 3)
CDRL1	QSLYYSDDNIF (SEQ ID NO: 4)
CDRL2	KVS (SEQ ID NO: 5)
CDRL3	MQGRHWPLFT (SEQ ID NO: 6)

5 Los anticuerpos de la invención comprenden una cadena pesada que comprende las tres CDR de la cadena pesada del 6G4 (SEQ ID NO: 1 - 3). Esto es, un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que comprende (i) la SEQ ID NO: 1 para la CDRH1, la SEQ ID NO: 2 para la CDRH2 y la SEQ ID NO: 3 para la CDRH3.

10 Los anticuerpos de la invención comprenden una cadena ligera que comprende las tres CDR de la cadena ligera del 6G4 (SEQ ID NO: 4 - 6). Esto es, un anticuerpo de la invención comprende una cadena ligera que comprende (i) la SEQ ID NO: 4 para la CDRL1, la SEQ ID NO: 5 para la CDRL2 y la SEQ ID NO: 6 para la CDRL3.

15 Un anticuerpo de acuerdo con la invención tiene especificidad por una combinación de las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A, y puede comprender una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %, a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. En una forma de realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada que tiene la secuencia citada en la SEQ ID NO: 7.

20 Un anticuerpo de acuerdo con la invención tiene especificidad por una combinación de las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A y puede comprender una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %, a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. En otra forma de realización más, un anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una cadena ligera que tiene la secuencia citada en la SEQ ID NO: 8.

25 En otro aspecto, la invención también incluye secuencias de ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos y fragmentos los mismos de la invención. También se describen secuencias de ácidos nucleicos que codifican para parte o todas las cadenas ligera y pesada y las CDR de los anticuerpos de la presente invención. En una forma de realización, las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención incluyen secuencias de ácidos nucleicos que tienen una identidad de al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % con la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 9 o de la SEQ ID NO: 10. Una secuencia de ácidos nucleicos de la invención puede comprender la secuencia de la SEQ ID NO: 9 (que codifica para la región variable de la cadena pesada del 6G4) o la SEQ ID NO: 10 (que codifica para región variable de la cadena ligera del 6G4). Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden incluir aquellas que codifican para las diversas CDR incluyen la SEQ ID NO: 11 (que codifica para la CDRH del 6G4), la SEQ ID NO: 12 (que codifica para la CDRH2 del 6G4), la SEQ ID NO: 13 (que codifica para la CDRH3 del 6G4), la SEQ ID NO: 14 (que codifica para la 6G4 CDRL1), la SEQ ID NO: 15 (que codifica para 6G4 CDRL2) y la SEQ ID NO: 16 (que codifica para CDRL3 del 6G4). Debido a la redundancia del código genético, pueden existir variantes de estas secuencias que codifiquen para la misma secuencia de aminoácidos. Estas variantes están incluidas en el ámbito de la invención.

40 Las variantes de anticuerpos también están incluidas en el ámbito de la invención. Por lo tanto, las variantes de las secuencias citadas en la solicitud también están incluidas en el ámbito de la invención. Dichas variantes incluyen valientes naturales generadas mediante una mutación somática *in vivo* durante la respuesta inmunitaria, o *in vitro* tras el cultivo de clones de linfocitos B inmortalizados. Alternativamente, pueden aparecer variantes debido a la degeneración del código genético, como se ha mencionado anteriormente. Alternativamente, pueden producirse variantes naturales debido a errores en la transcripción o en la traducción.

45 Pueden obtenerse variantes adicionales de las secuencias de anticuerpos que contengan una afinidad mejorada y/o una potencia mejorada mediante el uso de métodos conocidos en la materia, y están incluidas en el ámbito de la invención. Por ejemplo, pueden usarse sustituciones de aminoácidos para obtener anticuerpos con una afinidad adicionalmente mejorada.

55 Alternativamente, puede usarse una optimización de codón de la secuencia de nucleótidos para mejorar la eficacia de la traducción en los sistemas de expresión para la producción del anticuerpo. Además, los polinucleótidos que comprenden una secuencia optimizada para la especificidad del anticuerpo, o la neutralización de la actividad mediante la aplicación de un método de evolución dirigida a cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención, también están en el ámbito de la invención. En una forma de realización, las variantes de las secuencias de

anticuerpos pueden compartir una identidad del 70 % o más (es decir, del 75 %, del 80 %, del 85 %, del 90 %, del 95 %, del 97 %, del 98 %, del 99 % o más) en la secuencia de aminoácidos con las secuencias citadas en la solicitud. En algunas formas de realización, dicha identidad de secuencia se calcula con respecto a la longitud completa de la secuencia de referencia (es decir, la secuencia citada en la solicitud). En algunas formas de realización adicionales, el porcentaje de identidad, según se denomina en el presente documento, se determina mediante el uso de BLAST versión 2.1.3 mediante el uso de los parámetros por defecto especificados por el NCBI (el National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosum 62 matriz; penalización por apertura de hueco = 11 y penalización por extensión de hueco = 1].

Adicionalmente están incluidos en el ámbito de la invención los vectores, por ejemplo, los vectores de expresión, que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención. Las células transformadas con dichos vectores también están incluidas en el ámbito de la invención. Algunos ejemplos de dichas células incluyen, pero no se limitan a, células eucariotas, por ejemplo, células de levadura, células animales o células vegetales. En una forma de realización, las células son células de mamífero, por ejemplo, humanas, CHO, HEK293T, PER.C6, NSO, de mieloma o de hibridoma.

Los anticuerpos monoclonales y recombinantes son particularmente útiles en la identificación y la purificación de los polipéptidos individuales o de otros antígenos contra los que están dirigidos. Los anticuerpos de la invención tienen una utilidad adicional ya que pueden ser empleados como reactivos en inmunoensayos, radioinmunoensayos (RIA) o ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA). En dichas aplicaciones, los anticuerpos pueden marcarse con un reactivo detectable analíticamente, tal como un radioisótopo, una molécula fluorescente o una enzima. Los anticuerpos también pueden usarse para la identificación y la caracterización molecular (cartografiado de epítomos) de los antígenos.

Los anticuerpos de la invención pueden ser acoplados a un fármaco para su administración en un sitio de tratamiento, o acoplados a un marcador detectable para facilitar la visualización de un sitio que comprende células de interés, tales como células infectadas por el hCMV. Los métodos para el acoplamiento de los anticuerpos a los fármacos y a los marcadores detectables son bien conocidos en la materia, al igual que los métodos para la visualización mediante el uso de marcadores detectables. Los anticuerpos marcados pueden emplearse en una gran diversidad de ensayos, que emplean una gran diversidad de marcadores. La detección de la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno entre un anticuerpo de la invención y un epítomo de interés (un epítomo del hCMV) puede estar facilitada por la unión de una sustancia detectable al anticuerpo. Algunos medios de detección adecuados incluyen el uso de marcadores tales como radionúclidos, enzimas, coenzimas, fluorescentes, quimioluminescentes, cromógenos, sustratos o cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, complejos de grupos prostéticos, radicales libres, partículas, colorantes y similares. Algunos ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; algunos ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina / biotina y avidina / biotina; algunos ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente es el luminol; algunos ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y algunos ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H . Dichos reactivos marcados pueden usarse en una diversidad de ensayos bien conocidos, tales como radioinmunoensayos, enzimoimmunoensayos, por ejemplo, ELISA, inmunoensayos fluorescentes y similares. Véanse, por ejemplo, las referencias 15 - 18.

Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede estar conjugado con una fracción terapéutica tal como una citotoxina, un agente terapéutico o un ion metálico radioactivo o un radioisótopo. Algunos ejemplos de radioisótopos incluyen, pero no se limitan a, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111 y similares. Dichos conjugados de anticuerpos pueden usarse para la modificación de una respuesta biológica dada; no debe interpretarse que la fracción del fármaco está limitada a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción del fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como la abrina, la ricina A, la exotoxina de pseudomonas o la toxina diftérica.

Las técnicas para la conjugación de dicha fracción terapéutica a los anticuerpos son bien conocidas. Véase, por ejemplo, Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), páginas 243 - 256; ed. Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery," en *Controlled Drug Delivery*, ed. Robinson et al. (2ª ed; Marcel Dekker, Inc.), páginas 623 - 653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, ed. Pinchera et al., páginas 475 - 506 (Editrice Kurds, Milán, Italia, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, ed. Baldwin et al. (Academic Press, Nueva York, 1985), páginas 303 - 316; y Thorpe et al. (1982) *Immunol. Rev.* 62: 1 19 - 158.

Alternativamente, un anticuerpo puede estar conjugado con un segundo anticuerpo para formar un anticuerpo heteroconjugado según se describe en la referencia 19. Además, pueden usarse conectores entre los marcadores y los anticuerpos de la invención [20]. Los anticuerpos o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden

marcarse directamente con yodo, indio, ytrio radioactivo u otra partícula radioactiva conocida en la materia [21]. El tratamiento puede consistir en una combinación del tratamiento con anticuerpos conjugados y no conjugados administrados simultáneamente o posteriormente [22, 23].

5 Los anticuerpos de la invención pueden estar unidos a un soporte sólido.

Adicionalmente, los anticuerpos de la invención, o los fragmentos de anticuerpos funcionales de los mismos, pueden ser modificados químicamente mediante una conjugación covalente con un polímero, por ejemplo, para aumentar su semivida en circulación. Algunos ejemplos de polímeros y de métodos para unir los péptidos se muestran en las referencias 24 - 27. En algunas formas de realización los polímeros pueden elegirse de entre polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a la temperatura ambiente y tiene la fórmula general: $R(O-CH_2 - CH_2)_n O-R$ en la que R puede ser hidrógeno, o un grupo protector tal como un alquilo o un grupo alcohol. En una forma de realización el grupo protector puede tener entre 1 y 8 carbonos. En una forma de realización adicional el grupo protector es metilo. El símbolo n es un número entero positivo. En una forma de realización n es entre 1 y 1.000. En otra forma de realización n es entre 2 y 500. En una forma de realización el PEG tiene un peso molecular medio de entre 1.000 y 40.000. En una forma de realización adicional el PEG tiene un peso molecular de entre 2.000 y 20.000. En una forma de realización adicional más el PEG tiene un peso molecular de entre 3.000 y 12.000. En una forma de realización el PEG tiene al menos un grupo hidroxilo. En otra forma de realización el PEG tiene un grupo hidroxilo terminal. En otra forma de realización más es el grupo hidroxilo terminal es el que es activado para que reaccione con el grupo amino libre del inhibidor. Sin embargo, se entenderá que el tipo y la cantidad de grupos reactivos pueden variar para conseguir un PEG / anticuerpo conjugado covalentemente de la presente invención.

Los polioles polioxietilados solubles en agua también son útiles en la presente invención. Estos incluyen sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG) y similares. En una forma de realización, se usa el POG. Sin estar ceñidos a ninguna teoría, esto puede ser debido a que el esqueleto de glicerol en el glicerol polioxietilado es el mismo esqueleto que aparece de forma natural, por ejemplo, en animales y en seres humanos en mono, di, triglicéridos, por lo tanto esta ramificación no debería ser necesariamente contemplada como un agente extraño en el cuerpo. En algunas formas de realización el POG tiene un peso molecular en mismo intervalo que el PEG. La estructura del POG se muestra en la referencia 28.

Otro sistema de administración de fármacos que puede usarse para aumentar la semivida en circulación es el liposoma. Los métodos para la preparación de sistemas de administración liposómicos se analizan en las referencias 29, 30 y 31. Otros sistemas de administración de fármacos son conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en las referencias 32 y 33.

Los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse en forma purificada. Normalmente, el anticuerpo estará presente en una composición que está sustancialmente exenta de otros polipéptidos, por ejemplo, en la que menos del 90 % (en peso), habitualmente menos del 60 % y más habitualmente menos del 50 % de la composición está formada por otros polipéptidos.

Los anticuerpos de la invención pueden ser inmunógenos en hospedadores no humanos (o heterólogos), por ejemplo, en ratones. En particular, los anticuerpos pueden tener un idiotopo que es inmunógeno en hospedadores no humanos, pero no en un hospedador humano. Los anticuerpos de la invención para su uso en seres humanos incluyen aquellos que no pueden ser fácilmente aislados a partir de hospedadores tales como ratones, cabras, conejos, ratas, mamíferos no primates, etc. y generalmente no pueden ser obtenidos mediante humanización o a partir de xenor ratones.

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

Producción de los anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención pueden elaborarse mediante cualquier método conocido en la materia. La metodología general para la elaboración de anticuerpos monoclonales mediante el uso de la tecnología del hibridoma es bien conocida [34, 35]. Preferiblemente, se usa el método alternativo de inmortalización con el EBV descrito en la referencia 36.

Mediante el uso del método descrito en la referencia 36, los linfocitos B que producen el anticuerpo de la invención pueden ser transformados con el EBV en presencia de un activador policlonal de linfocitos B. La transformación con el EBV es una técnica habitual y puede adaptarse fácilmente para incluir activadores policlonales de linfocitos B.

Opcionalmente pueden añadirse estimulantes adicionales del crecimiento y la diferenciación celular durante la etapa de transformación para mejorar adicionalmente la eficacia. Estos estimulantes pueden ser citocinas tales como la IL-2 y la IL-15. En un aspecto, se añade IL-2 durante la etapa de inmortalización para mejorar adicionalmente la eficacia de la inmortalización, pero su uso no es esencial.

Los linfocitos B inmortalizados producidos mediante el uso de estos métodos pueden cultivarse entonces mediante el uso de los métodos conocidos en la materia, y aislarse los anticuerpos a partir de los mismos.

5 Los anticuerpos monoclonales pueden ser adicionalmente purificados, si se desea, mediante el uso de una filtración, una centrifugación y diversos métodos cromatográficos tales como una HPLC o una cromatografía de afinidad. Las técnicas para la purificación de anticuerpos monoclonales, incluyendo las técnicas para la producción de anticuerpos de calidad farmacéutica, son bien conocidas en la materia.

10 Los fragmentos de los anticuerpos monoclonales de la invención pueden obtenerse a partir de los anticuerpos monoclonales mediante métodos que incluyen la digestión con enzimas, tales como pepsina o papaína, y/o mediante la escisión de los puentes de disulfuro mediante una reducción química. Alternativamente, los fragmentos de los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante la clonación y la expresión de parte de las secuencias de las cadenas pesadas o ligeras. Los "fragmentos" de anticuerpos pueden incluir fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. La invención también incluye los fragmentos Fv de cadena única (scFv) derivados de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal de la invención, por ejemplo, la invención incluye un scFv que comprende las CDR de un anticuerpo de la invención. También están incluidos los monómeros y los dímeros de cadenas pesadas o ligeras, así como los anticuerpos de cadena única, por ejemplo, Fv de cadena única, en los que los dominios variables de la cadena pesada y ligera están unidos mediante un péptido conector.

20 Pueden usarse técnicas habituales de biología molecular para la preparación de las secuencias de ADN que codifican para los anticuerpos o los fragmentos de los anticuerpos de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas pueden sintetizarse completamente o parcialmente mediante el uso de técnicas de síntesis con oligonucleótidos. Según sea apropiado, pueden usarse las técnicas de mutagénesis dirigida y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

25 Puede usarse cualquier sistema adecuado de célula hospedadora / vector para la expresión de las secuencias de ADN que codifican para las moléculas de anticuerpos de la presente invención o para fragmentos de los mismos. Pueden usarse bacterias, por ejemplo, *E. coli*, y otros sistemas microbianos, en parte, para la expresión de fragmentos de anticuerpos tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, y especialmente fragmentos Fv de anticuerpos de cadena única, por ejemplo, Fv de cadenas únicas. Pueden usarse sistemas de expresión celulares eucariotas, por ejemplo, de mamífero, para la producción de moléculas de anticuerpos mayores, incluyendo moléculas de anticuerpo completas. Algunas células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen células CHO, HEK293T, PER.C6, NSO, de mieloma o de hibridoma.

35 Un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede comprender el cultivo de una célula hospedadora que comprende un vector de la presente invención en unas condiciones adecuadas para dar lugar a la expresión de la proteína a partir del ADN que codifica para la molécula de anticuerpo de la presente invención, y el aislamiento de la molécula de anticuerpo.

40 La molécula de anticuerpo puede comprender únicamente un polipéptido de la cadena pesada o ligera, en cuyo caso sólo se requiere la utilización de un polipéptido de la cadena pesada o de la cadena ligera que codifica para la secuencia en la transfección de las células hospedadoras. Para la producción de los productos que comprenden ambas cadenas pesada y ligera, la línea celular puede ser transfectada con dos vectores, un primer vector que codifica para un polipéptido de la cadena ligera y un segundo vector que codifica para un polipéptido de la cadena pesada. Alternativamente, puede usarse un único vector, incluyendo el vector las secuencias que codifican para los polipéptidos de la cadena ligera y de la cadena pesada.

45 Alternativamente, los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser producidos mediante i) la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención en una célula, y ii) el aislamiento del producto de anticuerpo expresado. Adicionalmente, el método puede incluir iii) la purificación del anticuerpo.

Cribado y aislamiento de los linfocitos B

55 Los linfocitos B pueden cribarse para buscar aquellos que producen los anticuerpos con la especificidad de antígeno deseada, y después pueden producirse clones individuales de linfocitos B a partir de las células positivas.

60 La etapa de cribado puede realizarse mediante un ELISA, mediante la tinción de los tejidos o de las células (incluyendo células transfectadas), un ensayo de neutralización o uno de los otros diversos métodos conocidos en la materia para la identificación de la especificidad de antígeno deseada. El ensayo puede elegirse sobre la base del reconocimiento de antígeno simple, o puede elegirse sobre la base adicional de una función deseada, por ejemplo, para seleccionar los anticuerpos de neutralización en lugar de únicamente los anticuerpos que se unen al antígeno, para seleccionar los anticuerpos que pueden modificar las características de las células diana, tales como sus cascadas de señalización, su forma, su velocidad de crecimiento, a su capacidad para influir sobre células, respuesta frente a la influencia de otras células o de otros reactivos, o mediante un cambio en las condiciones, en su estado de diferenciación, etc.

65 La etapa de clonación para la separación de los clones individuales de la mezcla de células positivas puede llevarse

a cabo mediante el uso de una dilución limitante, una micromanipulación, una deposición de células individuales, mediante clasificación celular ocualquier otro método conocido en la materia.

5 Estos clones de linfocitos B inmortalizados pueden usarse de varias formas, por ejemplo, como una fuente de anticuerpos monoclonales, como una fuente de un ácido nucleico (ADN o ARNm) que codifica para un anticuerpo monoclonal de interés, en investigación, etc.

10 Una composición puede comprender linfocitos B de memoria inmortalizados, en la que los linfocitos producen los anticuerpos con una elevada potencia de neutralización específica para el hCMV, y en la que los anticuerpos son producidos a ≥ 5 pg por célula por día. Una composición puede comprender clones de linfocitos B de memoria inmortalizados, en la que los clones producen el anticuerpo monoclonal con una elevada potencia de neutralización específica para el hCMV, y en la que el anticuerpo es producido a ≥ 5 pg por célula por día. Preferiblemente, dichos clones producen un anticuerpo monoclonal con una elevada potencia en la neutralización de una infección por el hCMV. El clon preferido de linfocitos B inmortalizados es el 6G4.

15 **Epítotos**

20 Como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos de la invención pueden usarse para cartografiar los epítotos a los que se unen. Los inventores han descubierto que el anticuerpo 6G4, que neutraliza una infección por el hCMV de células endoteliales, de células epiteliales, tales como células retinianas, y de células mieloides, tales como las células dendríticas, está dirigido a un epítoto determinado por una combinación de las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A. Aunque los inventores no desean ceñirse a esta teoría, se cree que el anticuerpo 6G4 se une a un epítoto conformacional formado por estas tres proteínas.

25 El epítoto reconocido por los anticuerpos de la presente invención puede tener diversos usos. El epítoto y los mimótotos mismo, en una forma purificada o sintética, pueden usarse para aumentar las respuestas inmunitarias (es decir, como una vacuna, o para la producción de anticuerpos para otros usos) o para el cribado del suero de un paciente para buscar anticuerpos que inmunorreaccionan con el epítoto o los mimótotos mismo. Dicho epítoto o mimótoto, o el antígeno que comprende dicho epítoto o mimótoto, puede usarse como una vacuna para aumentar una respuesta inmunitaria. Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos de la invención también pueden usarse en un método de monitorización de la calidad de vacunas. En particular, los anticuerpos pueden usarse para comprobar que el antígeno de una vacuna contiene el epítoto inmunógeno en la conformación correcta.

35 El epítoto también puede ser útil en el cribado de ligandos que se unen a dicho epítoto. Dichos ligandos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos; incluyendo aquellos que proceden de camellos, tiburones y otras especies, fragmentos de anticuerpos, péptidos, productos de la tecnología de expresión en fagos, aptámeros, adnectinas o fragmentos de otras proteínas víricas o celulares, pueden bloquear el epítoto y por lo tanto impedir una infección.

40 **Expresión recombinante**

Los linfocitos B de memoria inmortalizados descritos en el presente documento también pueden usarse como una fuente de ácidos nucleicos para la clonación de genes de anticuerpos para su posterior expresión recombinante. La expresión a partir de fuentes recombinantes es más habitual con fines farmacéuticos que la expresión a partir de linfocitos B o de híbridomas, por ejemplo, por razones de estabilidad, de reproducibilidad, de facilidad de cultivo, etc.

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

50 De forma análoga, un método para la preparación de una célula recombinante puede comprender las etapas de: (i) la secuenciación del (los) ácido(s) nucleico(s) a partir del clon de linfocitos B que codifica para el anticuerpo de interés; y (ii) mediante el uso de la información de la secuencia de la etapa (i), la preparación del (los) ácido(s) nucleico(s) para su inserción en un hospedador de expresión con objeto de permitir la expresión del anticuerpo de interés en ese hospedador. El ácido nucleico puede ser, aunque no es necesario, manipulado entre las etapas (i) y (ii) para introducir sitios de restricción, para cambiar el uso de los codones y/o para optimizar las secuencias reguladoras de la transcripción y/o de la traducción.

60 Un método para la preparación de una célula recombinante puede comprender la etapa de transformar una célula hospedadora con uno o más ácidos nucleicos que codifican para un anticuerpo monoclonal de interés, en el que los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos que derivan de un clon de linfocitos B inmortalizados descrito en el presente documento. Por lo tanto, los procedimientos para la preparación en primer lugar del (los) ácido(s) nucleico(s) y después el uso de los mismos para la transformación de una célula hospedadora, pueden ser llevados a cabo en diferentes momentos por personas diferentes en lugares diferentes (por ejemplo, en países diferentes).

65 Estas células recombinantes pueden usarse entonces con fines de expresión y de cultivo. Son particularmente útiles

para la expresión de anticuerpos para una producción farmacéutica a gran escala. También pueden usarse como el principio activo de una composición farmacéutica. Puede usarse cualquier técnica de cultivo adecuada, incluyendo, pero no se limita a, cultivo estático, cultivo en frasco rotatorio, líquido de ascitis, cartucho de biorreactor de tipo fibra hueca, minifermentador modular, tanque agitado, cultivo en microportador, perfusión de núcleo cerámico, etc.

Los métodos para la obtención y la secuenciación de genes de inmunoglobulinas a partir de linfocitos B son bien conocidos en la materia (por ejemplo, véase la referencia 37).

El hospedador de expresión es preferiblemente una célula eucariota, incluyendo células de levadura y animales, particularmente células de mamífero (por ejemplo, células CHO, células NSO, células humanas tales como células PER.C6 [Cruce]l; referencia 38] o HKB-11 [Bayer; referencias 39 & 40], células de mieloma [41 & 42], etc.), así como células vegetales. Algunos hospedadores de expresión preferidos pueden glucosilar el anticuerpo de la invención, particularmente con estructuras de carbohidratos que por sí mismas no son inmunógenas en seres humanos. El hospedador de expresión puede ser capaz de crecer en medios exentos de suero. El hospedador de expresión puede ser capaz de crecer en un cultivo sin la presencia de productos derivados de animales.

El hospedador de expresión puede ser cultivado para dar una línea celular.

Un método para la preparación de una o más moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, los genes de la cadena pesada y de la ligera) que codifican para un anticuerpo de interés, puede comprender las etapas de: (i) la preparación de un clon de linfocitos B inmortalizados según se describe en el presente documento; y (ii) la obtención, a partir del clon de linfocitos B, del ácido nucleico que codifica para el anticuerpo de interés. Un método para la obtención de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un anticuerpo de interés puede comprender las etapas de: (i) la preparación de un clon de linfocitos B inmortalizados según se describe en el presente documento; y (ii) la secuenciación del ácido nucleico del clon de linfocitos B que codifica para el anticuerpo de interés.

Un método para la preparación de molécula(s) de ácidos nucleicos que codifica(n) para un anticuerpo de interés, puede comprender la etapa de la obtención del ácido nucleico a partir de un clon de linfocitos B que se obtuvo a partir de un linfocito B transformado descrito en el presente documento. Por lo tanto, los procedimientos para la obtención en primer lugar del clon de linfocitos B y después la preparación del (los) ácido(s) nucleico(s) a partir del mismo puede ser llevado a cabo en diferentes momentos por diferentes personas en lugares diferentes (por ejemplo, en diferentes países).

Un método para la preparación de un anticuerpo (por ejemplo, para uso farmacéutico), puede comprender las etapas de: (i) la obtención y/o la secuenciación de uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, los genes de la cadena pesada y de la ligera) a partir del clon de linfocitos B seleccionado que expresa el anticuerpo de interés; (ii) inserción del (los) ácido(s) nucleico(s) en, o mediante el uso de, el (los) ácido(s) nucleico(s) para la preparación de un hospedador de expresión que puede expresar el anticuerpo de interés; (iii) el cultivo o el subcultivo del hospedador de expresión en unas condiciones en las que se exprese el anticuerpo de interés; y, opcionalmente, y (iv) la purificación del anticuerpo de interés.

Un método para la preparación de un anticuerpo puede comprender las etapas de: el cultivo o el subcultivo de una población de células hospedadoras de expresión en unas condiciones en las que se exprese el anticuerpo de interés y, opcionalmente, la purificación del anticuerpo de interés, en el que dicha población de células hospedadoras de expresión ha sido preparada mediante (i) proporcionando ácido(s) nucleico(s) que codifican para un linfocito B seleccionado el anticuerpo de interés que es producido por una población de linfocitos B de memoria preparada como se ha descrito anteriormente, (ii) insertando el (los) ácido(s) nucleico(s) en un hospedador de expresión que puede expresar el anticuerpo de interés, y (iii) cultivando o subcultivando los hospedadores de expresión que comprenden dichos ácidos nucleicos insertados para producir dicha población de células hospedadoras de expresión. Por lo tanto, los procedimientos para la preparación en primer lugar del hospedador de expresión recombinante y después cultivarlo para que exprese el anticuerpo, pueden ser llevados a cabo en diferentes momentos por diferentes personas en lugares diferentes (por ejemplo, en diferentes países).

Composiciones farmacéuticas

La invención proporciona una composición farmacéutica que contiene los anticuerpos y/o los fragmentos de anticuerpos de la invención. También se describen composiciones farmacéuticas que contienen un ácido nucleico que codifica para dichos anticuerpos y/o linfocitos B inmortalizados que expresan dichos anticuerpos y/o los epítopos reconocidos por los anticuerpos de la invención. Una composición farmacéutica también puede contener un portador farmacéuticamente aceptable para permitir su administración. El propio portador no debería inducir la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición, y no debería ser tóxico. Algunos portadores adecuados pueden ser grandes macromoléculas que se metabolizan lentamente tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, polímeros de aminoácidos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

También pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como

clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

5 Los portadores farmacéuticamente aceptables de las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, puede haber presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH en dichas composiciones. Dichos portadores permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes y suspensiones, para su ingestión por el paciente.

10 En el ámbito de la invención, las formas de administración pueden incluir aquellas formas adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión, por ejemplo, mediante inyección en bolo o en infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, de una solución o de una emulsión en un vehículo oleoso o acuoso, y puede contener agentes de formulación, tales como agentes suspensores, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo
15 puede estar en forma seca, para su reconstitución antes del uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden ser administradas directamente al sujeto. En una forma de realización las composiciones están adaptadas para su administración a sujetos humanos.

20 Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser administrada mediante cualquier vía, incluyendo, pero no se limita a, las vías oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea, tópica, subcutánea, intranasal, enteral, sublingual, intravaginal o rectal. También pueden usarse hipoesprays para la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención. Normalmente, las composiciones terapéuticas pueden prepararse en forma de inyectables, en soluciones o en
25 suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su disolución o su suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

La administración directa de las composiciones se llevará a cabo generalmente mediante una inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se administrará en el espacio intersticial de un tejido.

30 Las composiciones también pueden administrarse en una lesión. La dosis de tratamiento puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples. Los productos farmacéuticos basados en anticuerpos proporcionan una orientación relativa a la frecuencia de administración, por ejemplo, si un producto farmacéutico debería ser administrado diariamente, semanalmente, mensualmente, etc. La frecuencia y la dosis también dependen de la
35 gravedad de los síntomas.

Las composiciones de la invención pueden prepararse en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse en forma de inyectables, en soluciones o en suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su disolución o su suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección (por ejemplo, una
40 composición liofilizada, como Synagis™ y Herceptin™, para su reconstitución con agua estéril que contiene un conservante). La composición puede prepararse para su administración tópica, por ejemplo, en forma de un ungüento, una crema o un polvo. La composición puede prepararse para su administración oral, por ejemplo, en forma de un comprimido o de una cápsula, en forma de un aerosol o en forma de un jarabe (opcionalmente saborizado). La composición puede prepararse para su administración pulmonar, por ejemplo, en forma de un inhalador, mediante el uso
45 de un polvo fino o de un aerosol. La composición puede prepararse en forma de un supositorio o de un óvulo vaginal. La composición puede prepararse para su administración nasal, ótica u ocular, por ejemplo, en forma de gotas. La composición puede estar en forma de un kit, diseñado de tal forma que se reconstituye una composición combinada justo antes de su administración a un paciente. Por ejemplo, puede proporcionarse un anticuerpo liofilizado en forma de un
50 kit con agua estéril y un tampón estéril.

Se apreciará que el principio activo de la composición será una molécula de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o variantes y derivados de los mismos. Como tal, será susceptible a una degradación en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición se va a administrar mediante una vía que hace uso del tracto gastrointestinal, será necesario que la composición contenga agentes que protejan el anticuerpo frente a la
55 degradación pero que liberen el anticuerpo una vez que ha sido absorbido desde el tracto gastrointestinal.

Un análisis meticuloso de los portadores farmacéuticamente aceptables está disponible en Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, ISBN: 0683306472.

60 Las composiciones farmacéuticas de la invención tienen generalmente un pH de entre 5,5 y 8,5, en algunas formas de realización este puede estar entre 6 y 8, y en algunas formas de realización adicionales en aproximadamente 7. El pH puede mantenerse mediante el uso de un tampón. La composición puede ser estéril y/o exenta de pirógenos. La composición puede ser isotónica con respecto a los seres humanos. En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas de la invención se suministran en recipientes precintados herméticamente.

65 Las composiciones farmacéuticas incluirán una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la invención y/o de uno o

más linfocitos B inmortalizados según se describe en el presente documento y/o de un polipéptido que comprende un epítipo que se une a un anticuerpo de la invención, es decir, una cantidad que es suficiente para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o una afección deseada, o para mostrar un efecto terapéutico detectable. Los efectos terapéuticos también incluyen una reducción en los síntomas físicos. La cantidad eficaz precisa para cualquier sujeto en particular dependerá de su tamaño y salud, de la naturaleza y el grado de la afección y de los productos terapéuticos o de la combinación de productos terapéuticos elegidos para su administración. La cantidad eficaz para una situación dada está determinada por la experimentación rutinaria y en la valoración del profesional clínico. Para los fines de la presente invención, una dosis eficaz será generalmente de desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, o de desde aproximadamente 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg de las composiciones de la presente invención en el individuo en el que se administran. Los productos farmacéuticos basados en anticuerpos conocidos proporcionan una orientación relativa a este respecto, por ejemplo, Herceptin™ se administra mediante la infusión intravenosa de una solución de 21 mg/ml, con una dosis de carga inicial de 4 mg/kg de peso corporal y una dosis de mantenimiento semanal de 2 mg/kg de peso corporal; Rituxan™ se administra semanalmente a 375 mg/m²; etc.

En una forma de realización las composiciones pueden incluir más de un (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc.) anticuerpo de la invención para proporcionar un efecto terapéutico aditivo o sinérgico. En una forma de realización adicional la composición puede comprender uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc.) anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención, y uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc.) anticuerpos o fragmentos de anticuerpos adicionales contra el hCMV. Por ejemplo, un anticuerpo puede unirse al epítipo determinado por una combinación de las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A, mientras que el otro puede unirse a una proteína adicional del hCMV. En esta forma de realización, la proteína del hCMV puede ser la gB, la gH, la gL, la gM, la gN, la gO, la UL128, la UL130 o la UL131A, o una combinación de las mismas. En una forma de realización adicional, el segundo anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser específico para el epítipo que es reconocido por MSL-109, 8F9 o 3E3. En una forma de realización adicional más, un anticuerpo puede estar dirigido al mecanismo que media en la infección de los fibroblastos, mientras que el otro anticuerpo puede estar dirigido al mecanismo que media en la infección de las células endoteliales. Para un efecto clínico óptimo, puede ser bastante ventajoso abordar ambos mecanismos de infección y mantenimiento del hCMV.

Los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos de la invención pueden ser administrados (tanto combinados como por separado) con otros productos terapéuticos, por ejemplo, con compuestos quimioterapéuticos, con radioterapia, etc. Algunos compuestos terapéuticos preferidos incluyen compuestos antiviricos tales como ganciclovir, foscarnet y cidofovir. Dicha terapia de combinación proporciona una mejora aditiva o sinérgica en la eficacia terapéutica con respecto a los agentes terapéuticos individuales cuando se administran solos. El término "sinergia" se usa para describir un efecto combinado de dos o más agentes activos que es mayor que la suma de los efectos individuales de cada agente activo individual. Por lo tanto, cuando el efecto combinado de dos o más agentes da como resultado una "inhibición sinérgica" de una actividad o de un proceso, se pretende que la inhibición de la actividad o del proceso sea mayor que la suma de los efectos inhibidores de cada agente activo individual. El término "efecto terapéutico sinérgico" se refiere al efecto terapéutico observado con una combinación de dos o más terapias en las que el efecto terapéutico (medido mediante cualquiera de diversos parámetros) es mayor que la suma de los efectos terapéuticos individuales observados con las respectivas terapias individuales.

Los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos pueden ser administrados a aquellos pacientes que previamente no han mostrado respuesta al tratamiento para una infección por el hCMV, es decir, que han demostrado ser resistentes al tratamiento anti-hCMV. Dicho tratamiento puede incluir un tratamiento previo con un agente antivirico. Esto puede ser debido, por ejemplo, a la infección por una cepa del hCMV resistente a los antiviricos.

En las composiciones de la invención que incluyen los anticuerpos de la invención, los anticuerpos pueden suponer al menos el 50 % en peso (por ejemplo, el 60 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o más) de las proteínas totales de la composición. Los anticuerpos están por tanto en forma purificada.

Un método para la preparación de un producto farmacéutico puede comprender las etapas de: (i) la preparación de un anticuerpo de la invención; y (ii) la mezcla del anticuerpo purificado con uno o más portadores farmacéuticamente aceptable.

Un método para la preparación de un producto farmacéutico puede comprender la etapa de mezclar un anticuerpo con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se ha obtenido a partir de un linfocito B transformado descrito en el presente documento. Por lo tanto, los procedimientos para la obtención en primer lugar del anticuerpo monoclonal y la preparación a continuación del producto farmacéutico, pueden ser llevados a cabo en momentos muy diferentes por personas diferentes en lugares diferentes (por ejemplo, en diferentes países).

Como una alternativa a la administración de anticuerpos o de linfocitos B con fines terapéuticos, es posible administrar un ácido nucleico (normalmente ADN) que codifica para el anticuerpo monoclonal (o un fragmento activo del mismo) de interés a un sujeto, de forma que el ácido nucleico pueda ser expresado en el sujeto *in situ* para proporcionar un efecto terapéutico deseado. Las terapias génicas y los vectores de administración de ácidos

nucleicos adecuados son conocidos en la materia.

Las composiciones pueden incluir un antimicrobiano, particularmente si están envasadas en un formato de dosis múltiples.

5 Las composiciones pueden comprender un detergente, por ejemplo, un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los detergentes están presentes generalmente a unos niveles bajos, por ejemplo, < 0,01 %.

10 Las composiciones pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para dar tonicidad. Es típica una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl.

15 Las composiciones pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o un disacárido (por ejemplo, sacarosa o trehalosa), por ejemplo, aproximadamente a 15 - 30 mg/ml (por ejemplo, a 25 mg/ml), particularmente si van a ser liofilizadas o si incluyen un material que ha sido reconstituido a partir de un material liofilizado. El pH de una composición para liofilización puede ajustarse a aproximadamente 6,1 antes de la liofilización.

Las composiciones de la invención también pueden comprender uno o más agentes inmunoreguladores. En una forma de realización, uno o más de los agentes inmunoreguladores incluye(n) un adyuvante.

20 **Tratamientos médicos y usos**

Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos de la invención, o los derivados y las variantes de los mismos, pueden usarse para el tratamiento de una infección por el hCMV, para la prevención de una infección por el hCMV o para el diagnóstico de una infección por el hCMV.

25 Los métodos de diagnóstico pueden incluir poner en contacto un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con una muestra. Dichas muestras pueden ser muestras de tejido tomadas a partir de, por ejemplo, glándulas salivares, pulmón, hígado, páncreas, riñón, oído, ojo, placenta, tracto alimentario, corazón, ovarios, pituitaria, glándulas adrenales, tiroides, cerebro y piel. Los métodos de diagnóstico pueden incluir también la detección de un complejo de antígeno / anticuerpo.

La invención proporciona por lo tanto un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con la invención, para su uso en terapia.

35 Un método de tratamiento de un paciente puede comprender la administración a ese paciente de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con la invención.

La invención también proporciona el uso de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una infección por el hCMV.

40 La invención proporciona una composición de la invención para su uso como un medicamento para la prevención o el tratamiento de una infección por el hCMV. También proporciona el uso de un anticuerpo de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente y/o el diagnóstico de un paciente. Un método para el tratamiento de un sujeto y/o para la realización de un diagnóstico en un sujeto puede comprender la etapa de administrar al mismo una composición de la invención. En algunas formas de realización, el sujeto puede ser un ser humano. Una forma de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica la vigilancia de los síntomas de la enfermedad después de la administración de la composición de la invención. El tratamiento puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples.

50 Un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un clon de linfocitos B inmortalizados, un epítipo o una composición descritos en el presente documento pueden ser administrados a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento. Dicho sujeto incluye, pero no se limita a, uno que esté particularmente en riesgo de, o sea susceptible a, una infección por el hCMV, incluyendo, por ejemplo, un sujeto inmunodeprimido. Algunos ejemplos de sujetos incluyen aquellos que padecen VIH o están bajo una terapia inmunosupresora, tales como los pacientes trasplantados.

55 Los anticuerpos de la invención pueden ser usados en la inmunización pasiva.

Los anticuerpos y los fragmentos de los mismos según se describen en la presente invención también pueden usarse en un kit para el diagnóstico de una infección por el hCMV.

60 Los epítipos capaces de unirse a un anticuerpo de la invención, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 6G4, pueden usarse en un kit para monitorizar la eficacia de los procedimientos de vacunación mediante la detección de la presencia de anticuerpos protectores anti-hCMV.

65

Los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos, o las variantes y los derivados de los mismos, según se describen en la presente invención, también pueden usarse en un kit para la monitorización de la elaboración de vacunas con la inmunogenicidad deseada.

5 Un método para la preparación de un producto farmacéutico puede comprender la etapa de mezclar un anticuerpo monoclonal con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal que se obtuvo a partir de un hospedador de expresión de la invención. Por lo tanto, los procedimientos para obtener en primer lugar el anticuerpo monoclonal (por ejemplo, expresándolo y/o purificándolo) y mezclarlo después con el (los) portador(es) farmacéutico(s), pueden ser llevados a cabo en momentos muy diferentes por personas diferentes en lugares diferentes (por ejemplo, en diferentes países).

10 Partiendo de un linfocito B transformado descrito en el presente documento, pueden llevarse a cabo varias etapas de cultivo, subcultivo, clonación, subclonación, secuenciación, preparación del ácido nucleico etc. con objeto de perpetuar el anticuerpo expresado por el linfocito B formado, con una optimización opcional en cada etapa. Preferiblemente, los métodos anteriores comprenden adicionalmente técnicas de optimización (por ejemplo, maduración u optimización por afinidad) aplicadas a los ácidos nucleicos que codifican para el anticuerpo.

15 En todos estos métodos, el ácido nucleico usado en el hospedador de expresión puede ser manipulado para insertar, deletar o corregir ciertas secuencias de ácidos nucleicos. Los cambios por dicha manipulación incluyen, pero no se limitan a, cambios para la introducción de sitios de restricción, para corregir el uso de codones, para añadir u optimizar las secuencias reguladoras de la transcripción y/o de la traducción, etc. También es posible modificar el ácido nucleico para alterar los aminoácidos codificados. Por ejemplo, puede ser útil la introducción de una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Dichas mutaciones puntuales pueden modificar las funciones efectoras, la afinidad de unión al antígeno, modificaciones post-traduccionales, inmunogenicidad, etc., introducir aminoácidos para la unión de grupos covalentes (por ejemplo, marcadores) o introducir etiquetas (por ejemplo, con fines de purificación). Las mutaciones pueden ser introducidas en sitios específicos o pueden ser introducidas aleatoriamente, seguido de una selección (por ejemplo, evolución molecular).

30 **General**

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

35 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente exenta" de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede ser omitida de la descripción de la invención.

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

45 El término "enfermedad" según se usa en el presente documento pretende ser generalmente sinónimo y usarse de forma intercambiable con los términos "trastorno" y "afección" (como en afección médica), ya que todos reflejan un estado anormal del cuerpo humano o animal o de una de sus partes que impide su normal funcionamiento, se manifiesta normalmente mediante unos signos y síntomas distintivos y provoca que el ser humano o el animal tengan una reducción en la duración o en la calidad de vida.

Según se usa en el presente documento, la referencia al "tratamiento" de un paciente pretende incluir la prevención y la profilaxis. El término "paciente" significa todos los mamíferos, incluyendo los seres humanos. Algunos ejemplos de pacientes incluyen seres humanos, vacas, perros, gatos, caballos, cabras, ovejas, cerdos y conejos. Generalmente, el paciente es un ser humano.

Ejemplos

55 Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente como ilustración y no pretenden ser limitantes.

Ejemplo 1: clonación de linfocitos B y cribado para comprobar la actividad de neutralización del hCMV

60 Se identificó un donante con unos elevados títulos de anticuerpos neutralizantes del hCMV. Se aislaron linfocitos B de memoria y se immortalizaron mediante el uso de EBV y CpG según se describe en la referencia 36. En resumen, se aislaron linfocitos B de memoria mediante una selección negativa mediante el uso de microesferas CD22, seguido de la eliminación de los linfocitos B IgM⁺, IgD⁺ IgA⁺ mediante el uso de anticuerpos específicos y de una clasificación celular. Las células clasificadas (IgG⁺) fueron immortalizadas con EBV en presencia de CpG 2006 e irradiadas con linfocitos mononucleares alogénicos. Se establecieron cultivos por duplicado conteniendo cada uno 50 linfocitos B de memoria en 20 placas con fondo en U de 96 pocillos. Después de dos semanas se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se ensayaron para comprobar su capacidad de neutralizar una infección por el hCMV de fibroblastos o de células epiteliales, en ensayos por separado. Los clones de linfocitos B se aislaron a partir de cultivos policlonales

positivos según se describe en la referencia 36. Se determinaron las concentraciones de IgG en el sobrenadante de los clones seleccionados mediante el uso de un ELISA específico de IgG.

Para el ensayo de neutralización vírica se mezcló una cantidad titulada de una cepa clínica del hCMV con un volumen igual del sobrenadante del cultivo o con diluciones de suero humano que contienen los anticuerpos de neutralización. Después de 1 hora de incubación a la temperatura ambiente, la mezcla se añadió a monocapas confluyentes de células endoteliales (por ejemplo, células HMEC-1), de células epiteliales (por ejemplo, células retinianas ARPE) o de fibroblastos (por ejemplo, células MRC-9 o madre mesenquimáticas) en placas de fondo redondo de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C durante dos días. El sobrenadante se desechó, las células se fijaron con metanol frío y se tiñeron con una mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón contra los antígenos tempranos del hCMV, seguido de una Ig anti-ratón de cabra marcada con fluoresceína. Las placas se analizaron mediante el uso de un microscopio de fluorescencia. En ausencia de los anticuerpos de neutralización, las células infectadas eran ~ 1.000 / campo, mientras que en presencia de concentraciones saturantes de los anticuerpos de neutralización, la infección fue completamente inhibida. El ensayo de neutralización vírica también se llevó a cabo mediante el uso de células dendríticas como células diana. El título de neutralización está indicado como la concentración de anticuerpo (µg/ml) que proporciona una reducción del 50 % de una infección por el hCMV. La Tabla 2 muestra que el 6G4, que se ha demostrado que es específico para una combinación de la UL128, la UL130 y la UL131A, era capaz de neutralizar una infección por el hCMV de células endoteliales, retinianas y dendríticas a unas concentraciones muy bajas (es decir, con una elevada potencia).

Tabla 2

Clon	Neutralización al 50 % (µg/ml) de:	
	Fibroblastos	Células endoteliales / retinales / dendríticas
6G4	*	0,004
Cytotec [□]	5.000	50
Suero de donante	33	1

* no hay neutralización a la mayor concentración ensayada (es decir, > 2 µg/ml).
[□] Cytotect (Biotest) es un conjunto de IgG hiperinmune del hCMV.

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

Para cartografiar las especificidades del anticuerpo monoclonal humano 6G4 en la neutralización de la infección de las células endoteliales, se construyeron vectores de expresión que codifican para las UL128, UL130, UL131A, gH y gL completas. Se transfectaron células HEK293T con estos vectores solos o en combinación. Después de 36 h, las células fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con 6G4 seguido de cabra anti-IgG humana. La Figura 1 muestra que las células teñidas de anticuerpo monoclonal 6G4 se expresan conjuntamente con al menos la UL128, la UL130 y la UL131A. La intensidad de la tinción de 6G4 aumentaba cuando se transfectaban conjuntamente las gH y gL junto con las UL128, UL130 y UL131A para reconstituir el supuesto complejo glucoproteico gCIII completo. Estos datos sugieren que el anticuerpo monoclonal 6G4 es específico para un epítipo conformacional determinado por una combinación de las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A. Lo más probable es que este epítipo esté en la conformación apropiada únicamente cuando las UL128, UL130 y UL131A son ensambladas conjuntamente en el gCIII junto con las gH y gL.

REFERENCIAS

- [1] Plachter et al. (1996) Adv Virus Res 46: 195 - 261.
- [2] Gerna et al. (2002) J Med Virol 66: 335 - 339.
- [3] Adler et al. (2006) J Gen Virol 87: 2451 - 2460.
- [4] Gerna et al. (2005) J Gen Virol 86: 275 - 284.
- [5] Hahn et al. (2004) J Virol 78: 10023 - 10033.
- [6] Patrone et al. (2005) J Virol 79: 8361 - 8373.
- [7] Wang (2005) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 102: 18153 - 18158.
- [8] Wang et al. (2005) J Virol 79: 10330 - 10338.
- [9] Nigro et al. (2005) N Engl J Med 353: 1350 - 1362.
- [10] Borucki et al. (2004) Antiviral Res 64: 103 - 111.
- [11] McLean et al. (2005) J Immunol, 174: 4768 - 4778.
- [12] Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol. 27(1): 55 - 77.
- [13] Lefranc et al. (1997) Immunology Today, 18: 509.
- [14] Lefranc (1999) The Immunologist, 7: 132 - 136.
- [15] Documento US 3.766.162
- [16] Documento US 3.791.932
- [17] Documento US 3.817.837

- [18] Documento US 4.233.402
- [19] Documento US 4.676.980
- [20] Documento US 4.831.175
- [21] Documento US 5.595.721 [
- 5 [22] Documento WO00/52031
- [23] Documento WO00/52473
- [24] Documento US 4.766.106
- [25] Documento US 4.179.337
- [26] Documento US 4.495.285
- 10 [27] Documento US 4.609.546
- [28] Knauf et al. (1988) J. Bio. Chem. 263: 15064 - 15070
- [29] Gabizon et al. (1982) Cancer Research 42: 4734
- [30] Cafiso (1981) Biochem Biophys Acta 649: 129
- [31] Szoka (1980) Ann. Rev. Biophys. Eng. 9: 467
- 15 [32] Poznansky et al. (1980) Drug Delivery Systems (R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y.) páginas 253 - 315
- [33] Poznansky (1984) Pharm Revs 36: 277
- [34] Kohler, G. and Milstein, C. 1975, Nature 256: 495 - 497.
- [35] Kozbar et al. 1983, Immunology Today 4: 72.
- [36] Documento WO2004/076677
- 20 [37] Chapter 4 of Kuby Immunology (4th edición, 2000: ASIN: 0716733315
- [38] Jones et al. Biotechnol Prog 2003, 19(1): 163 - 8
- [39] Cho et al. Cytotechnology 2001,37: 23 - 30
- [40] Cho et al. Biotechnol Prog 2003,19: 229 - 32
- [41] Documento US 5.807.715
- 25 [42] Documento US 6.300.104
- [43] Documento WO 2007/146024
- [44] Documento WO 2008/084410

Lista de secuencias

- 30 LISTA DE SECUENCIAS
- <110> HUMABS LLC
- 35 <120> ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES DEL CITOMEGALOVIRUS HUMANO Y USO DE LOS MISMOS
- <130> P051016WO
- <160> 16
- 40 <170> SeqWin99, versión 1.02
- <210> 1
- <211>7
- 45 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- 50 **Gly Tyr Arg Thr Ser Tyr Tyr**
1 5
- <210>2
- <211>5
- <212> PRT
- 55 <213> *Homo sapiens*
- <400> 2

- 60 **Tyr Gly Asp Ser Asp**
1 5
- <210>3
- <211> 12

ES 2 548 014 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400>3

5

Ala Arg Ser Thr Ser Gly Asp Tyr Val Gly Ala Asp
1 5 10

<210>4
<211>7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 4

Ser Val Tyr Ser Asp Asp Asn
1 5

15

<210>5
<211>3
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 5

Lys Val Ser
1

25

<210>6
<211>6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 6

Met Gly Arg His Trp Thr
1 5

35

<210>7
<211> 93
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40

<400> 7

ES 2 548 014 T3

val val ser gly ala val lys lys gly lys ser arg ser cys lys ala
 1 5 10 15
 ser gly tyr arg thr ser tyr tyr ala trp val arg his met gly lys
 20 25 30
 gly trp met gly tyr gly asp ser asp thr tyr ser ser gly val thr
 35 40 45
 ser ala asp lys ser ala thr thr ala tyr trp ser ser arg ala ser
 50 55 60
 asp thr ala met tyr tyr cys ala arg ser thr ser gly asp tyr val
 65 70 75 80
 gly ala asp trp gly gly thr met val thr val ser ser
 85 90

<210>8
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400>8

asp val thr ser ser ala val thr gly ala ser ser cys arg ser asn
 1 5 10 15
 ser val tyr ser asp asp asn asn trp gly gly arg arg tyr lys val
 20 25 30
 ser asn arg asp ser gly val asp arg ser gly ser gly ser gly thr
 35 40 45
 asp thr lys ser arg val ala asp val gly val tyr tyr cys met gly
 50 55 60
 arg his trp thr gly gly thr lys val asp lys
 65 70 75

<210>9
 <211> 373
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggaagtc tctgaggatc 60
 tcctgtaagg ctctcgata caggtttacc agctactaca tcgcctgggt gcgccacatg 120
 cccggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccacatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccgccac taccgcctac 240
 ctgcaatgga gcagcctgag ggccctcggac accgccatgt actactgtgc gagactctca 300
 ttaacagagt ccggtgacta cgtcgggtgcg ttgatatac ggggccaagg gacaatggtc 360
 accgtctctt cag 373

<210> 10
 <211> 343
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

ES 2 548 014 T3

gattttgtgc tgactcagtc tccactctcc ctggccgtca cccttgaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctaata aagcctccta tacagtgatg acaacatctt cttgaattgg 120
tttcagcagg ggccaggcca acctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taaccgggac 180
tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
agcagggtgg aggctgagga tgttggcggt tattactgca tgcaaggtag acaactggcct 300

cctctattca ctttcggccc tgggacaaa gtggatatca aac 343

5 <210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 11
 ggatacaggt ttaccagcta ctac 24

<210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 12
 atctatcctg gtgactctga tatic 24

20 <210> 13
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 13
 gcgagactct cattaacaga gtccggtgac tacgtcgggtg cgtttgatat c 51

30 <210> 14
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 14
 caaagcctcg tatacagtga tgacaacatc ttc 33

40 <210> 15
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15
 aaggtttct 9

45 <210> 16
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 16
 atgcaaggta gacactggcc tcctctattc act 33

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que es específico para una combinación de las proteínas del hCMV UL128, UL130 y UL131A, formando la combinación el epítipo reconocido por dicho anticuerpo o fragmento de unión, y que neutraliza la infección de células endoteliales, de células retinianas o de células dendríticas por el citomegalovirus humano (hCMV), en el que el anticuerpo o el fragmento comprende las secuencias de la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 según se establecen en la SEQ ID NO: 1, en la SEQ ID NO: 2 y en la SEQ ID NO: 3 respectivamente, y comprende las secuencias de la cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 según se establecen en la SEQ ID NO: 4, en la SEQ ID NO: 5 y en la SEQ ID NO: 6 respectivamente.
- 10 2. El anticuerpo o el fragmento de la reivindicación 1, que comprende las regiones variables de la cadena pesada y ligera según se establecen en la SEQ ID NO: 7 y en la SEQ ID NO: 8 respectivamente.
- 15 3. El anticuerpo o el fragmento de la reivindicación 1 o 2, que se une al epítipo conformacional formado por las tres proteínas UL128, UL130 y UL131A.
- 20 4. El anticuerpo o el fragmento según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal humano, un anticuerpo de cadena única, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv.
- 25 5. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el anticuerpo o el fragmento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
6. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5 que comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16, o una secuencia de nucleótidos que codifica para la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de nucleótidos según cualquiera de las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16.
- 30 7. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 o 6.
8. Una célula transformada con el vector de acuerdo con la reivindicación 7.
- 35 9. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4 y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 40 10. La composición de la reivindicación 9 que comprende adicionalmente un segundo anticuerpo contra el hCMV, o un fragmento de unión al antígeno del mismo.
- 45 11. La composición de la reivindicación 9 que comprende adicionalmente
 - (a) un segundo anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a una proteína del hCMV elegida de entre la gB, la gH, la gL, la gM, la gN, la gO, la UL128, la UL130 y la UL131A, o una combinación de las mismas; o
 - (b) un segundo anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a la proteína gB del hCMV.
- 50 12. Uso del anticuerpo o del fragmento según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, del ácido nucleico de la reivindicación 5 o 6, o de la célula de la reivindicación 8, o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una infección por el hCMV.
- 55 13. El anticuerpo o el fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección por el hCMV.
- 60 14. Una composición que comprende un anticuerpo o un fragmento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección por el hCMV, en la que la composición comprende adicionalmente un segundo anticuerpo elegido de entre:
 - (a) un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo contra el hCMV;
 - (b) un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a una proteína del hCMV elegida de entre la gB, la gH, la gL, la gM, la gN, la gO, la UL128, la UL130 y la UL131A, o una combinación de las mismas;
 - y
 - (c) un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a la proteína gB del hCMV.
- 65 15. Un método para la producción del anticuerpo o del fragmento según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, que comprende (i) el cultivo de la célula de la reivindicación 8 y (ii) el aislamiento del anticuerpo o del fragmento.

Figura 1

Células HEK293T transfectadas con las (proteínas) completas:

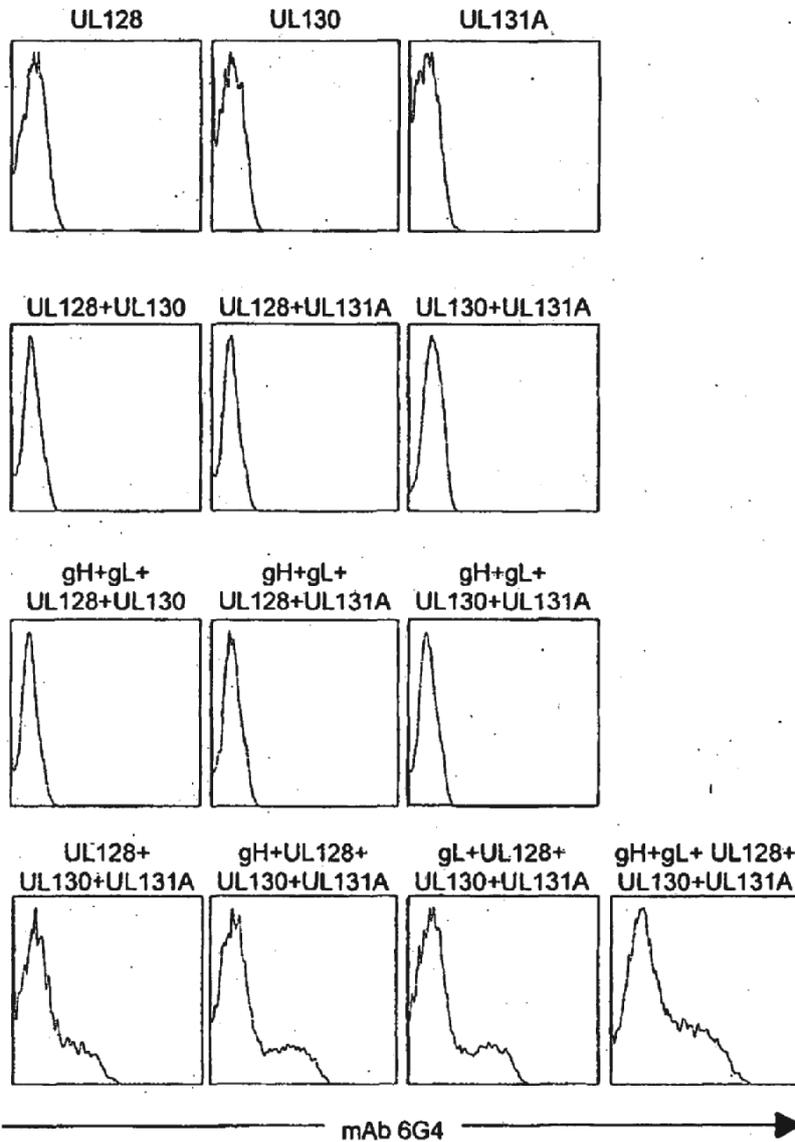


Figura 2

6G4-VH

gaggtgcagctggtgcagtctggagcagaggtgaaaaagcccggaagtctctgaggatctcctgtaaggcttctgg
atacaggtttaccagctactacatcgccctgggtgcccacatgcccgggaaaggcctggagtggatggggatcact
atcctggtgactctgatacacatacagcccgtcctccaaggccaggtcaccatctcagccgacaagtccgccact
accgcctacctgcaatggagcagcctgagggcctcggacaccgccatgtactactgtgcgagactctcattaacaga
gtccggtgactacgtcgggtgctttgatatactggggccaagggacaatggtcaccgtctcttcag

EVQLVQSGAEVKKPGKSLRISCKASGYRFTSYIIAWVRHMPGKGLEWVMIYPGDSDITYSPSFQGGVITISADKSA
TAYLQWSSLRASDTAMYCARLSLTESGDYVGAFDINGQGMVTVSS

6G4-VL

gattttgtgctgactcagctctccactctccctggccgtcacccttgacagccggcctccatctcctgcaggtctaa
tcaaagcctcgtatacagtgatgacaacatcttcttgaattgggttcagcagggccaggccaacctccaaggcgcc
taatttataagggttctaacccgggactctggggteccagacagattcagcggcagtggtcaggcactgatttcaca
ctgaaaatcagcaggggtggaggctgaggatggtggcgtttattactgcatgcaaggtagacactggcctcctctatt
cacttcggccctgggaccaaagtggatatcaaac

DFVLTQSPSLAVTLGQFASISCRSNQSLVYSDDNIFLNWFQGGPGQPPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDF
LKISRVEAEDVGVYYCMQRHWPLFTFGPGTKVDIK