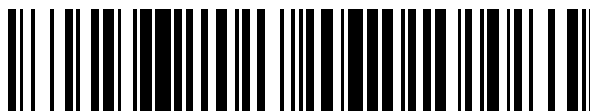


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 129**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2008 E 08766756 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2170952**

54 Título: **Moléculas de unión específicas de VSR y medios para producirlas**

30 Prioridad:

01.06.2007 EP 07109472

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

24.06.2016

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
MILSTEIN BUILDING GRANTA PARK
CAMBRIDGE CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:

**SPITS, HERGEN;
BEAUMONT, TIM;
YASUDA, ETSUKO y
KWAKKENBOS, MARK JEROEN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 575 129 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

Moléculas de unión específicas de VSR y medios para producirlas

5 La invención se refiere a los campos de biología y medicina.

10 El Virus Sincitial Respiratorio Sincitial (VSR) es un virus de resfriado común que pertenece a la familia de paramixovirus. El VSR es virulento, fácilmente transmisible y la causa más común de enfermedad del tracto respiratorio inferior en niños de menos de 2 años de edad. Hasta el 98 % de los niños que acuden a la guardería se infectarán en una única temporada de VSR. Entre 0,5 % y 3,2 % de los niños con infección por VSR requieren hospitalización. Se han presentado en los Estados Unidos aproximadamente 90.000 admisiones en los hospitales y 4500 muertes al año. Son factores de riesgo importantes para hospitalización debida a VSR nacimiento prematuro, enfermedad pulmonar crónica, enfermedad cardíaca congénita, inmunidad comprometida, y edad menor de 6 semanas en niños por lo demás sanos. No está disponible ningún tratamiento eficaz de bronquiolitis VSR positiva aparte de cuidados paliativos en forma de nutrición adecuada y terapia de oxígeno. No se ha demostrado que terapias antivirales tales como ribavirina sean eficaces en la infección por VSR. Un anticuerpo monoclonal, palivizumab (también denominado Synagis), está registrado para profilaxis contra infección por VSR. Palivizumab es un anticuerpo monoclonal modificado por ingeniería genética (humanizado) para la proteína de fusión de VSR. Sin embargo, palivizumab no siempre es eficaz. Por lo tanto, existe la necesidad de la técnica de anticuerpos y terapias alternativos contra VSR.

15 Es un objeto de la presente invención proporcionar medios y métodos para contrarrestar y/o prevenir una enfermedad relacionada con VSR. Es un objeto adicional de la invención proporcionar anticuerpos alternativos y/o mejorados contra VSR y proporcionar células estables capaces de producir anticuerpos contra VSR.

20 Por lo tanto la presente invención proporciona los anticuerpos aislados de las reivindicaciones 1-3, las secuencias de ácido nucleico aisladas de las reivindicaciones 4-5, la célula de la reivindicación 6, el método de la reivindicación 7, la composición de la reivindicación 8 y los anticuerpos, ácidos nucleicos o composiciones de las reivindicaciones 9-11, para uso de la reivindicación 9-11.

25 La presente invención proporciona anticuerpos que son capaces de unirse específicamente con VSR. Dichos anticuerpos también denominados en el presente documento "anticuerpos anti VSR" o "anticuerpos específicos de VSR", son capaces de unirse específicamente con al menos un componente de VSR, tal como por ejemplo un epítipo de una proteína de VSR. La unión no específica no está abarcada por la expresión "unión específica". Los anticuerpos anti VSR de acuerdo con la presente invención son particularmente adecuados para contrarrestar y/o al menos en parte prevenir una infección por VSR y/o efectos adversos de una infección por VSR. Un anticuerpo anti VSR particularmente preferido de acuerdo con la presente invención es el anticuerpo designado "D25", que tiene una región de cadena pesada y una región de cadena ligera como se representa en las Figuras 11A-D. Las secuencias de CDR de D25, que en particular contribuyen a las propiedades de unión a antígeno de D25, se representan en la Figura HD. El anticuerpo D25 parece tener características superiores en comparación con el anticuerpo anti VSR registrado Palivizumab (Figura 8). Por ejemplo, D25 tiene un valor de CI50 de aproximadamente 0,4-1,5 ng/ml en un ensayo de neutralización *in vitro* en el que se infectan células HEp-2 con VSR, mientras que Palivizumab tiene un valor de CI50 de aproximadamente 453 ng/ml.

30 Un equivalente funcional de un anticuerpo se define en el presente documento como una parte funcional, derivado o análogo de un anticuerpo.

35 Una parte funcional de un anticuerpo se define como una parte que tiene al menos una propiedad igual que dicho anticuerpo en tipo, no necesariamente en cantidad. Dicha parte funcional es capaz de unirse con el mismo antígeno que dicho anticuerpo, aunque no necesariamente en el mismo grado. Una parte funcional de un anticuerpo comprende preferentemente un anticuerpo de un único dominio, un anticuerpo monocatenario, un fragmento variable monocatenario (scFv), un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂.

40 Un derivado funcional de un anticuerpo se define como un anticuerpo que se ha alterado de modo que al menos una propiedad, preferentemente una propiedad de unión a antígeno, del compuesto resultante sea esencialmente del mismo tipo, no necesariamente de la misma cantidad. Se proporciona un derivado de muchas maneras, por ejemplo mediante sustitución de aminoácidos conservativa, por lo que un resto de aminoácido se sustituye por otro resto con propiedades en general similares (tamaño, hidrofobicidad, etc.), de modo que el funcionamiento general probablemente no se ve afectado gravemente.

45 Un experto en la materia también es capaz de generar compuestos análogos de un anticuerpo. Esto se realiza por ejemplo mediante exploración de una biblioteca de péptidos o biblioteca de presentación en fagos. Dicho análogo tiene esencialmente al menos una propiedad igual que dicho anticuerpo en tipo, no necesariamente en cantidad.

50 Como se conoce bien por el experto en la materia, una cadena pesada de un anticuerpo es la mayor de los dos tipos de cadenas que componen una molécula de inmunoglobulina. Una cadena pesada comprende dominios constantes

y un dominio variable, estando dicho dominio variable implicado en la unión a antígeno. Una cadena ligera de un anticuerpo es el menor de los dos tipos de cadenas que componen una molécula de inmunoglobulina. Una cadena ligera comprende un dominio constante y un dominio variable. El dominio variable está, junto con el dominio variable de la cadena pesada, implicado en la unión a antígeno.

5 Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son las regiones hipervariables presentes en dominios variables de cadena pesada y dominios variables de cadena ligera. Las CDR de una cadena pesada y la cadena ligera conectada de un anticuerpo forman juntas el sitio de unión al antígeno.

10 Ahora que la presente invención proporciona la información de que las secuencias de CDR representadas en la Figura 11 proporcionan características de unión a VSR deseadas, las variantes pueden comprender al menos una secuencia de CDR alterada. Por ejemplo, se aplica sustitución de aminoácidos conservativa. La sustitución de aminoácidos conservativa implica sustitución de un aminoácido con otro con propiedades generalmente similares (tamaño, hidrofobicidad, etc.), de modo que el funcionamiento global probablemente no se ve afectado gravemente.

15 También es posible cambiar al menos una secuencia de CDR representada en la Figura 11 para generar un anticuerpo variante, o un equivalente funcional del mismo, con al menos una propiedad alterada en comparación con D25. Un anticuerpo o equivalente funcional puede comprender una secuencia de CDR que es al menos 70 % idéntica a una secuencia de CDR como se representa en la Figura 11, de modo que las características de unión favorables de D25 se mantienen al menos en parte o incluso se mejoran. Una secuencia de CDR como se representa en la Figura 11 puede alterarse de modo que el anticuerpo resultante o equivalente funcional comprenda al menos una propiedad mejorada, tal como por ejemplo una afinidad, selectividad y/o estabilidad de unión mejorada, en comparación con D25. Están disponibles en la técnica diversos métodos para alterar una secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, se sintetiza artificialmente una secuencia de cadena pesada o cadena ligera con una secuencia de CDR deseada. Preferentemente, una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de CDR se muta, por ejemplo usando mutagénesis aleatoria, o dirigida.

Se desvela en el presente documento un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o un equivalente funcional del mismo que es capaz de unirse específicamente con virus sincitial respiratorio y que comprende:

- 30
- una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica de la secuencia NYIIN y/o
 - una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 75 % idéntica a la secuencia GIIPVLGTVHYAPKFQG y/o

35

 - una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia ETALWSTTYLPH YFDN y/o
 - una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 85 % idéntica a la secuencia QASQDIVNYLN y/o
 - una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia VASNLET.

40

Dicho anticuerpo también comprende una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica de la secuencia QQYDNLP.

45 Un anticuerpo o un equivalente funcional puede comprender una secuencia de CDR que es al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 % idéntica a al menos una de las secuencias de CDR representadas en la Figura HD. Más preferentemente, un anticuerpo o un equivalente funcional pueden comprender una secuencia de CDR que es al menos 95 % idéntica a al menos una de las secuencias de CDR representadas en la Figura HD. El anticuerpo particularmente preferido D25, descrito anteriormente, comprende secuencias de CDR que consisten en las secuencias de CDR representadas en la Figura HD. Una realización particularmente preferida de acuerdo con la invención proporciona por lo tanto un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o un equivalente funcional del mismo que es capaz de unirse específicamente con virus sincitial respiratorio y que comprende:

- 55
- una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia NYIIN,
 - una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia GIIPVLGTVHYAPKFQG,
 - una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de ETALWSTTYLPHYFDN,
 - una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de QAS QD IVNYLN,
 - una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia VASNLET y

60 una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia QQYDNLP.

Se desvela en el presente documento un anticuerpo o se proporciona un equivalente funcional que comprende las tres secuencias de CDR de cadena pesada y las tres secuencias de CDR de cadena ligera como se representa en la Figura HD, o secuencias que son al menos un 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 % idénticas a las mismas. Se desvela además un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o un

equivalente funcional del mismo que comprende una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia NYIIN y una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia GIIPVLGTVHYAPKFQG y una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia ETALWSTTYLPHYFDN y una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia QASQDIVNYLN y una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia VASNLET, y una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia QQYDNLP. Dicho anticuerpo o equivalente funcional preferentemente comprende secuencias de CDR que son al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % idénticas a las secuencias de CDR de cadena pesada y las secuencias de CDR de cadena ligera como se representa en la Figura HD. También se desvela un anticuerpo o equivalente funcional que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada mencionadas anteriormente así como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera anteriormente mencionadas.

También se desvelan anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos que comprenden una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable que es al menos 70 % idéntica a la secuencia de cadena pesada como se representa en la Figura 11. Dichas secuencias de cadena pesada proporcionan propiedades de unión a VSR deseadas, como se demuestra por el anticuerpo D25. Se desvela además por lo tanto un anticuerpo o un equivalente funcional del mismo, que tiene una secuencia de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia QVQLVQSGAEVKKPGSSVMVSCQASGGPLRNYIINWLRQAPGGQPEWMMGGIIPVLGTVHYAPKFQGRVTITADESTD TAYIHLISLRSEDTAMYYCATETALWSTTYLPHYFDNWGQGLTVTVSS. Además, secuencias de aminoácidos de cadena ligera variable que son al menos 70 % idénticas a la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 11 también proporcionan propiedades de unión de VSR deseadas, como se demuestra por el anticuerpo D25. También se desvela por lo tanto un anticuerpo, o un equivalente funcional del mismo que tiene una secuencia de cadena ligera que es al menos 70 % idéntica a la secuencia DIQMTQSPSSLSAAVGDRTVITTCQASQDIVNYLNWYQQKPGKAPKLLIYVASN LETGVPSRFSGSGSGTDFSLTISS-LQPEDVATYYCQQYDNLP LTFGGGTKVEIK RTV. Un anticuerpo o una parte funcional puede comprender una secuencia de cadena pesada variable y/o una secuencia de cadena ligera variable que es al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % idéntica a la secuencia de cadena pesada y/o la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 11. Cuanto mayor sea la homología, más estrechamente se asemejará dicho anticuerpo o parte funcional al anticuerpo D25. Un anticuerpo o parte funcional puede comprender una cadena pesada así como una cadena ligera que se asemeja a la cadena pesada y ligera de D25. Se desvela además por lo tanto un anticuerpo o parte funcional que comprende una secuencia de cadena pesada y una secuencia de cadena ligera que son al menos 70 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % idénticas a la secuencia de cadena pesada y la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 11.

Una realización proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en la secuencia de cadena pesada como se representa en la Figura 11, y una secuencia de cadena ligera que consiste en la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 11. Como alternativa, como se conoce bien por los expertos en la materia, es posible generar una secuencia de cadena pesada o cadena ligera acortada manteniendo al mismo tiempo una propiedad de unión de interés. Preferentemente, se genera dicha cadena pesada o cadena ligera acortada que tiene una región constante más corta, en comparación con la cadena pesada o ligera original. El dominio variable preferentemente se mantiene. Por ejemplo, se produce un fragmento Fab o fragmento F(ab')₂ basado en una secuencia de cadena pesada o secuencia de cadena ligera representada en la Figura 11. Se desvela también por lo tanto un equivalente funcional de un anticuerpo que comprende al menos una parte funcional de una secuencia como se representa en la Figura 11. Una parte funcional puede tener una longitud de al menos 20 aminoácidos y puede comprender una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia de CDR1 de cadena pesada representada en la Figura HD, y/o una secuencia que es al menos 75 % idéntica a la secuencia de CDR2 de cadena pesada representada en la Figura HD y/o una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia de CDR3 de cadena pesada representada en la Figura HD, y/o una secuencia que es al menos 85 % idéntica a la secuencia de CDR1 de cadena ligera representada en la Figura HD y/o una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia de CDR2 de cadena ligera representada en la Figura HD. Preferentemente, dicha parte funcional puede comprender también una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia de CDR3 de cadena ligera representada en la Figura HD.

Otro anticuerpo anti VSR particularmente preferido de acuerdo con la presente invención es el anticuerpo designado "AM 14", que tiene una región de cadena pesada y una región de cadena ligera como se representa en la Figura 14A. Las secuencias de CDR de AM14, que en particular contribuyen a las propiedades de unión a antígeno de AM14, también se representan en la Figura 14A.

Ahora que la presente invención proporciona la información de que las secuencias de CDR representadas en la Figura 14A proporcionan características de unión a VSR deseadas las variantes pueden comprender al menos una

secuencia de CDR alterada. Por ejemplo, se aplica sustitución de aminoácidos conservativa. La sustitución de aminoácidos conservativa implica sustitución de un aminoácido con otro con propiedades en general similares (tamaño, hidrofobicidad, etc.), de modo que el funcionamiento general probablemente no se ve afectado gravemente. También es posible cambiar al menos una secuencia de CDR representada en la Figura 14A para generar un anticuerpo variante, o un equivalente funcional del mismo, con al menos una propiedad alterada en comparación con AM14. Un anticuerpo o equivalente funcional puede comprender una secuencia de CDR que es al menos 70 % idéntica de una secuencia de CDR como se representa en la Figura 14A, de modo que las características de unión favorables de AM14 se mantienen al menos en parte o incluso se mejoran. Una secuencia de CDR como se representa en la Figura 14A puede alterarse de modo que el anticuerpo resultante o equivalente funcional comprenda al menos una propiedad mejorada, tal como por ejemplo una afinidad, selectividad y/o estabilidad de unión mejoradas, en comparación con AM14.

Están disponibles en la técnica diversos métodos para alterar una secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, se sintetiza artificialmente una secuencia de cadena pesada o cadena ligera con una secuencia de CDR deseada. Preferentemente, una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de CDR se muta, por ejemplo usando mutagénesis aleatoria, o dirigida.

Se desvela en el presente documento un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo que es capaz de unirse específicamente con el virus sincitial respiratorio y que comprende:

- una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia GFSFSHYA, y/o
- una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia ISYDGENT, y/o
- una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia ARDRIVDDYYYYGMDV, y/o
- una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia QDIKKY, y/o
- una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia de DAS, y/o
- una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia de NLPPLT QQYD.

Un anticuerpo o un equivalente funcional puede comprender una secuencia de CDR que es al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 % idéntica a al menos una de las secuencias de CDR representadas en la Figura 14A. Más preferentemente, un anticuerpo o un equivalente funcional puede comprender una secuencia de CDR que es al menos 95 % idéntica a al menos una de las secuencias de CDR representadas en la Figura 14A. El anticuerpo particularmente preferido AM14, descrito anteriormente, comprende secuencias de CDR que consisten en las secuencias de CDR representadas en la Figura 14A. Una realización particularmente preferida de acuerdo con la invención proporciona por lo tanto un anticuerpo aislado, sintético o recombinante que es capaz de unirse específicamente con el virus sincitial respiratorio y que comprende:

- una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de GFSFSHYA,
- una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de ISYDGENT,
- una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de ARDRIVDDYYYYGMDV,
- una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de QDIKKY,
- una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de DAS y
- una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de QQYD NLPPLT.

Se desvela en el presente documento un anticuerpo o equivalente funcional que comprende las tres secuencias de CDR de cadena pesada y las tres secuencias de CDR de cadena ligera como se representa en la Figura 14A, o secuencias que son al menos 70 % idénticas a las mismas. Se desvela además por lo tanto un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o un equivalente funcional del mismo que comprende una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia GFSFSHYA y una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia ISYDGENT y una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia ARDRIVDDYYYYGMDV y una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia QDIKKY y una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia de DAS, y una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia QQYD NLPPLT. Dicho anticuerpo o equivalente funcional comprende preferentemente secuencias de CDR que son al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % idénticas a las secuencias de CDR de cadena pesada y las secuencias de CDR de cadena ligera como se representan en la Figura 14A. También se desvela un anticuerpo o equivalente funcional que

comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada mencionadas anteriormente de la Figura 14A así como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera mencionadas anteriormente de la Figura 14A.

5 También se desvelan anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos que comprenden una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos 70 % idéntica a una secuencia de cadena pesada como se representa en la Figura 14A. Dichas secuencias de cadena pesada proporcionan propiedades de unión a VSR
 10 deseadas, como se demuestra por el anticuerpo AM14. También se desvela además un anticuerpo o un equivalente funcional del mismo, que tiene una secuencia de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia EVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFSFSHYAMHWVRQAPGKGLEWVAVIS
 YDGYENTYYADSVKGRFISRDNSKNTVSLQMNSLRPEDTALYYCARDIVDD YYYYYGMDVWGQGATVTVSS. Además, las secuencias de aminoácidos de cadena ligera que son al menos 70 % idénticas a una secuencia de
 15 cadena ligera como se representa en la Figura 14A también proporcionan propiedades de unión a VSR deseadas, como se demuestra por el anticuerpo AM14. Por lo tanto también se desvela un anticuerpo, o un equivalente funcional del mismo que tiene una secuencia de cadena ligera que es al menos 70 % idéntica a la secuencia DIQMTQS PS SLSASVGDRTV I TCQASQDIKKYLNWYHQKPGKVPPELLMHDASNLETGVPSRF SGRGSGDTFTLI
 SSLQPEDI GTYYCQQYDNLPLTFGGGKVEIKRTV. Un anticuerpo o parte funcional puede comprender preferentemente una secuencia de cadena pesada variable y/o una secuencia de cadena ligera variable que es al
 20 menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % idéntica a una secuencia de cadena pesada y/o una secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 14A. Cuanto mayor sea la homología, más estrechamente se asemejará dicho anticuerpo o parte funcional al anticuerpo AM14. Un anticuerpo o parte funcional acorde puede comprender una cadena pesada así como cadena ligera que se asemeja a la cadena pesada y ligera de AM14. Se desvela además por lo tanto un anticuerpo o parte funcional que comprende una secuencia de cadena pesada y una
 25 secuencia de cadena ligera que son al menos 70 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % idéntica a la secuencia de cadena pesada y la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 14A.

30 Una realización proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en la secuencia de cadena pesada como se representa en la Figura 14A, y una secuencia de cadena ligera que consiste en la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 14A. Como alternativa, como se conoce bien por los expertos en la materia, es posible generar una secuencia de cadena pesada o cadena ligera acortada manteniendo al mismo tiempo una propiedad de unión de interés. Preferentemente, se genera dicha cadena pesada o cadena ligera acortada que tiene una región constante más corta, en comparación con la cadena pesada o ligera
 35 original. El dominio variable preferentemente se mantiene. Por ejemplo, se produce un fragmento Fab o fragmento F(ab')₂ basado en una secuencia de cadena pesada o secuencia de cadena ligera representada en la Figura 14A. Por lo tanto también se desvela un equivalente funcional de un anticuerpo que comprende al menos una parte funcional de una secuencia como se representa en la Figura 14A. Una parte funcional puede tener una longitud de al menos 20 aminoácidos y puede comprender una secuencia que es al menos 70 % idéntica a al menos una de las secuencias de CDR representadas en la Figura 14A.

Otro anticuerpo anti VSR particularmente preferido de acuerdo con la presente invención es el anticuerpo designado "AM16", que tiene una región de cadena pesada y una región de cadena ligera como se representa en la Figura 14B. Las secuencias de CDR de AM16, que en particular contribuyen a las propiedades de unión a antígeno de AM16,
 45 también se representan en la Figura 14B.

Ahora que la presente invención proporciona la información de que las secuencias de CDR representadas en la Figura 14B proporcionan características de unión a VSR deseadas, las variantes pueden comprender al menos una secuencia de CDR alterada. Por ejemplo, se aplica sustitución de aminoácidos conservativa. La sustitución de aminoácidos conservativa implica sustitución de un aminoácido con otro con propiedades en general similares (tamaño, hidrofobicidad, etc.), de modo que el funcionamiento general probablemente no se ve afectado gravemente.

También es posible cambiar al menos una secuencia de CDR representada en la Figura 14B para generar un anticuerpo variante, o un equivalente funcional del mismo, con al menos una propiedad alterada en comparación con AM16. Un anticuerpo o equivalente funcional puede comprender una secuencia de CDR que es al menos 70 % idéntica a una secuencia de CDR como se representa en la Figura 14B, de modo que las características de unión favorables de AM16 se mantienen al menos en parte o incluso se mejoran. Una secuencia de CDR como se representa en la Figura 14B puede alterarse de modo que el anticuerpo resultante o equivalente funcional
 60 comprende al menos una propiedad mejorada, tal como por ejemplo una afinidad, selectividad y/o estabilidad de unión mejorada, en comparación con AM16. Están disponibles en la técnica diversos métodos para alterar una secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, se sintetiza artificialmente una secuencia de cadena pesada o cadena ligera con una secuencia de CDR deseada. Preferentemente, una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de CDR se muta, por ejemplo usando mutagénesis aleatoria o dirigida.

65

Se desvela en el presente documento un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo que es capaz de unirse específicamente con el virus sincitial respiratorio y que comprende:

- 5 - una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia GFTFSSYN, y/o
- una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia ISAGSSYI, y/o
- 10 - una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia AREDYGPGNYSPNWFDP, y/o
- una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia SSNIGAGYD, y/o
- una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia GNT, y/o
- 15 - una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia HSYDRSLSG.

Un anticuerpo o un equivalente funcional puede comprender una secuencia de CDR que es al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 % idéntica a al menos una de las secuencias de CDR representadas en la Figura 14B. Más preferentemente, un anticuerpo o un equivalente funcional puede comprender una secuencia de CDR que es al menos 95 % idéntica a al menos una de las secuencias de CDR representadas en la Figura 14B. El anticuerpo particularmente preferido AM16, descrito anteriormente, comprende secuencias de CDR que consisten en las secuencias de CDR representadas en la Figura 14B. Una realización particularmente preferida de acuerdo con la invención proporciona por lo tanto un anticuerpo aislado, sintético o recombinante que es capaz de unirse específicamente con el virus sincitial respiratorio y que comprende:

- una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia GFTFSSYN y/o
- una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de ISAGSSYI,
- 30 - una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de AREDYGPGNYSPNWFDP,
- una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de SSNIGAGYD,
- una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia GNT y
- una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de HSYDRSLSG.

35 Se desvela en el presente documento un anticuerpo o equivalente funcional que comprende las tres secuencias de CDR de cadena pesada y las tres secuencias de CDR de cadena ligera como se representa en la Figura 14B, o secuencias que son al menos 70 % idénticas a las mismas. Se desvela además por lo tanto un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o un equivalente funcional del mismo que comprende una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia GFTFSSYN y una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia ISAGSSYI y una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia AREDYGPGNYSPNWFDP y una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la SSNIGAGYD y una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia GNT, y una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la HSYDRSLSG. Dicho anticuerpo o equivalente funcional comprende preferentemente secuencias de CDR que son al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % idénticas a las secuencias de CDR de cadena pesada mencionadas anteriormente y las secuencias de CDR de cadena ligera mencionadas anteriormente como se representa en la Figura 14B. También se desvela un anticuerpo o equivalente funcional que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada mencionada anteriormente de la Figura 14B así como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera mencionadas anteriormente de la Figura 14B.

55 También se desvelan anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos que comprenden una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos 70 % idéntica a una secuencia de cadena pesada como se representa en la Figura 14B. Dichas secuencias de cadena pesada proporcionan propiedades de unión a VSR deseadas, como se demuestra por el anticuerpo AM16. Se desvela además un anticuerpo o equivalente funcional del mismo, que tiene una secuencia de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia

60 EVQLVETGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMNWVRQAPGKGLEWVSHISAGSSYIYYSD
SVKGRFTVSRDNRNSVYLQMNSLRADTAVYYCAREDYGPGNYSPNWFDPWGQGTLVTVS S. Además, las secuencias de aminoácidos de cadena ligera que son al menos 70 % idénticas a una secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 14B también proporcionan propiedades de unión a VSR deseadas, como se demuestra por el anticuerpo AM16. También se desvela por lo tanto un anticuerpo, o un equivalente funcional del mismo que tiene una secuencia de cadena ligera que es al menos 70 % idéntica a la secuencia

65 QSWTQPPSVSGAPGQRVT I SCTGS SSNI GAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNTNRPSGVS D

RFSGSKSGTSASLAI TGLQAEDEADYYCHSYDRSLSGS-VFGGGTKLTV. Un anticuerpo o parte funcional puede comprender una secuencia de cadena pesada variable y/o una secuencia de cadena ligera variable que es al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % idéntica a la secuencia de cadena pesada y/o la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 14B. Cuanto mayor sea la homología, más estrechamente se asemejará dicho anticuerpo o parte funcional al anticuerpo AM16. Un anticuerpo o parte funcional puede comprender una cadena pesada así como una cadena ligera que se asemeja a la cadena pesada y ligera de AM16. Se desvela además por lo tanto un anticuerpo o parte funcional que comprende una secuencia de cadena pesada y una secuencia de cadena ligera que son al menos 70 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % idéntica a la secuencia de cadena pesada y la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 14B.

Una realización proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en la secuencia de cadena pesada como se representa en la Figura 14B, y una secuencia de cadena ligera que consiste en la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 14B. Como alternativa, como se conoce bien por los expertos en la materia, es posible generar una secuencia de cadena pesada o cadena larga acortada manteniendo al mismo tiempo una propiedad de unión de interés. Preferentemente, se genera dicha cadena pesada o cadena ligera acortada que tiene una región constante más corta, en comparación con la cadena pesada o ligera original. El dominio variable preferentemente se mantiene. Por ejemplo, se produce un fragmento Fab o fragmento F(ab')₂ basado en una secuencia de cadena pesada o secuencia de cadena ligera representada en la Figura 14B. Se desvela también por lo tanto un equivalente funcional de un anticuerpo que comprende al menos una parte funcional de una secuencia como se representa en la Figura 14B. Una parte funcional puede tener una longitud de al menos 20 aminoácidos y puede comprender una secuencia que es al menos 70 % idéntica a al menos una de las secuencias de CDR representadas en la Figura 14B.

Otro anticuerpo anti VSR particularmente preferido de acuerdo con la presente invención es el anticuerpo designado "AM23", que tiene una región de cadena pesada y una región de cadena ligera como se representa en la Figura 14C. Las secuencias de CDR de AM23, que en particular contribuyen a las propiedades de unión a antígeno de AM23, también se representan en la Figura 14C.

Ahora que la presente invención proporciona la información de que las secuencias de CDR representadas en la Figura 14C proporcionan características de unión a VSR deseadas, las variantes pueden comprender al menos una secuencia de CDR alterada. Por ejemplo, se aplica sustitución de aminoácidos conservativa. La sustitución de aminoácidos conservativa implica sustitución de un aminoácido con otro con propiedades en general similares (tamaño, hidrofobicidad, etc.), de modo que el funcionamiento general probablemente no se vea afectado gravemente.

También es posible cambiar al menos una secuencia de CDR representada en la Figura 14C para generar un anticuerpo variante, o un equivalente funcional del mismo, con al menos una propiedad alterada en comparación con AM23. Un anticuerpo o equivalente funcional puede comprender una secuencia de CDR que es al menos 70 % idéntica a una secuencia de CDR como se representa en la Figura 14C, de modo que las características de unión favorables de AM23 al menos se mantienen en parte o incluso se mejoran. Una secuencia de CDR como se representa en la Figura 14C puede alterarse de modo que el anticuerpo resultante o equivalente funcional comprenda al menos una propiedad mejorada, tal como por ejemplo una afinidad, selectividad y/o estabilidad de unión mejorada, en comparación con AM23. Están disponibles en la técnica diversos métodos para alterar una secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, se sintetiza artificialmente una secuencia de cadena pesada o cadena ligera con una secuencia de CDR deseada. Preferentemente, una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de CDR se muta, por ejemplo usando mutagénesis aleatoria, o dirigida.

Se desvela en el presente documento un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo que es capaz de unirse específicamente con el virus sincitial respiratorio y que comprende:

- una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia GFNFHNYG, y/o
- una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia VWYDGSKK, y/o
- una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia VRD KVGPTYFD S, y/o
- una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia NIGSET Y, y/o
- una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia de DDD, y/o
- una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia de QVWDRSNYH QV.

Un anticuerpo o un equivalente funcional puede comprender una secuencia de CDR que es al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 % idéntica a al menos una de las secuencias de CDR representadas en la Figura 14C. Más preferentemente, un anticuerpo o un equivalente funcional puede comprender una secuencia de CDR que es al menos 95 % idéntica a al menos una de las secuencias de CDR representadas en la Figura 14C. El anticuerpo particularmente preferido AM23, descrito anteriormente, comprende secuencias de CDR que consisten en las secuencias de CDR representadas en la Figura 14C. Una realización particularmente preferida de acuerdo con la invención proporciona por lo tanto un anticuerpo aislado, sintético o recombinante que es capaz de unirse específicamente con el virus sincitial respiratorio y que comprende:

- una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de GFNFHNYG,
- una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de VWYDGSKK,
- una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de VRDKVGPTPYFDS,
- una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de NIGSET,
- una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de DDD y
- una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de QVWDRSNYH QV.

Se desvela en el presente documento un anticuerpo o equivalente funcional que comprende las tres secuencias de CDR de cadena pesada y las tres secuencias de CDR de cadena ligera como se representa en la Figura 14C. Se desvela además un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o un equivalente funcional del mismo que comprende una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia GFNFHNYG y una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia VWYDGSKK y una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia VRDKVGPTPYFDS y una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia NIGSET y una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia de DDD y una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia QVWDRSNYH QV. Dicho anticuerpo o equivalente funcional preferentemente comprende secuencias de CDR que son al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % idénticas a las secuencias de CDR de cadena pesada mencionadas anteriormente y las secuencias de CDR de cadena ligera mencionadas anteriormente como se representa en la Figura 14C. También se desvela un anticuerpo o equivalente funcional que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada mencionadas anteriormente de la Figura 14C así como las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera mencionadas anteriormente de la Figura 14C.

También se desvelan anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos que comprenden una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que es al menos 70 % idéntica a una secuencia de cadena pesada como se representa en la Figura 14C. Dichas secuencias de cadena pesada proporcionan propiedades de unión a VSR deseadas, como se demuestra por el anticuerpo AM23. Se desvela además un anticuerpo o un equivalente funcional del mismo, que tiene una secuencia de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a la secuencia EVQLVESGGNVVVKPGTSLRLSCAATGTFNFHNYGMNWVRQAPGKGLEWVAWVWYDGSKKYYAD SVTGRFAI SRDNSKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDKVGPTPYFDSWGQGLTVTS S. Además, las secuencias de aminoácidos de cadena ligera que son al menos 70 % idénticas a una secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 14C también proporcionan propiedades de unión a VSR deseadas, como se demuestra por el anticuerpo AM23. Se desvela por lo tanto un anticuerpo, o un equivalente funcional del mismo que tiene una secuencia de cadena ligera que es al menos 70 % idéntica a la secuencia SYVLTQPPSVSLAPGGTAAI TCGRNNIGSETVHWYQQK-PGQAPVLWYDDDDRPSGI PERFS GSNSGNTATLT I SRVEAGDEADYYCQVWDRSNYHQVFGGGTKLTV. Un anticuerpo o parte funcional puede comprender una secuencia de cadena pesada variable o una secuencia de cadena ligera variable que es al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % idéntica a la secuencia de cadena pesada y/o la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 14C. Cuanto mayor sea la homología, más estrechamente se asemejará dicho anticuerpo o parte funcional al anticuerpo AM23. Un anticuerpo o parte funcional puede comprender una cadena pesada así como una cadena ligera que se asemeja a la cadena pesada y ligera de AM23. Se desvela además por lo tanto un anticuerpo o parte funcional que comprende una secuencia de cadena pesada y una secuencia de cadena ligera que son al menos 70 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % idéntica a la secuencia de cadena pesada y la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 14C.

Una realización proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en la secuencia de cadena pesada como se representa en la Figura 14C, y una secuencia de cadena ligera que consiste en la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 14C. Como alternativa, como se conoce bien por los expertos en la materia, es posible generar una secuencia de cadena pesada o cadena ligera acertada manteniendo al mismo tiempo una propiedad de unión de interés. Preferentemente, se genera dicha cadena pesada o cadena ligera acertada que tiene una región constante más corta, en comparación con la cadena pesada o ligera

original. El dominio variable preferentemente se mantiene. Por ejemplo, se produce un fragmento Fab o fragmento F(ab')₂ basado en una secuencia de cadena pesada o secuencia de cadena ligera representada en la Figura 14C. También se desvela por lo tanto un equivalente funcional de un anticuerpo que comprende al menos una parte funcional de una secuencia como se representa en la Figura 14C. Una parte funcional puede tener una longitud de al menos 20 aminoácidos y puede comprender una secuencia que es al menos 70 % idéntica a al menos una de las secuencias de CDR representadas en la Figura 14C.

La presente invención proporciona anticuerpos específicos de VSR como se define en las reivindicaciones que tienen propiedades mejoradas en comparación con anticuerpos de la técnica anterior. Los inventores han conseguido generar anticuerpos específicos de VSR con valores de CI50 bajos. Dichos anticuerpos tienen una afinidad particularmente alta o fuerte por VSR y son por lo tanto particularmente adecuados para contrarrestar y/o al menos en parte prevenir una infección por VSR y/o efectos adversos de una infección por VSR. Una divulgación proporciona un anticuerpo que tiene un valor de CI50 de menos de 10 ng/ml en un ensayo de neutralización *in vitro* en el que se infectan células HEp-2 con VSR, y un equivalente funcional de dicho anticuerpo. Dicho anticuerpo o equivalente funcional preferentemente tiene un valor de CI50 de menos de 5 ng/ml, más preferentemente menos de 2 ng/ml. El anticuerpo preferido D25 tiene un valor de CI50 de aproximadamente 0,5-1,5 ng/ml en el ensayo de neutralización *in vitro* descrito en los ejemplos (véase Figura 8).

Un anticuerpo de acuerdo con la invención es preferentemente un anticuerpo humano. El uso de anticuerpos humanos para terapia humana reduce la probabilidad de efectos secundarios debido a una reacción inmunológica en un individuo humano contra secuencias no humanas. En otra realización preferida un anticuerpo o parte funcional, derivado o análogo de acuerdo con la invención es un anticuerpo quimérico. De esta manera, pueden incluirse secuencias de interés, tales como por ejemplo un sitio de unión de interés, en un anticuerpo o equivalente funcional de acuerdo con la invención.

La invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención. Dicho ácido nucleico se aísla por ejemplo de un linfocito B que es capaz de producir un anticuerpo de acuerdo con la invención, como se perfila en más detalle posteriormente. Una secuencia de ácido nucleico desvelada en el presente documento puede comprender una secuencia que es al menos 70 % homóloga de al menos una parte funcional de una secuencia de ácido nucleico como se representa en la Figura 11, Figura 12, Figura 14A, Figura 14B y/o Figura 14B. Dicha secuencia de ácido nucleico puede comprender una secuencia que es al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % homóloga de al menos una parte funcional de una secuencia de ácido nucleico como se representa en la Figura 11, Figura 12, Figura 14A, Figura 14B y/o Figura 14B. Dicha parte funcional tiene una longitud de al menos 30 nucleótidos, preferentemente al menos 50 nucleótidos, más preferentemente al menos 75 nucleótidos. Dicha parte funcional puede codificar al menos una secuencia de ácido nucleico como se representa en la Figura HD, Figura 12, Figura 14A, Figura 14B y/o Figura 14B. Dicha secuencia es preferentemente una secuencia de CDR.

Un anticuerpo de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para uso como una medicina o agente profiláctico. También se proporciona por lo tanto con la presente un anticuerpo de acuerdo con la invención, para su uso como un medicamento y/o agente profiláctico. En una realización particularmente preferida dicho anticuerpo comprende anticuerpo D25, AM14, AM16 y/o AM23. Dicho medicamento o agente profiláctico se usa preferentemente para contrarrestar o al menos prevenir en parte infección por VSR o para contrarrestar o al menos prevenir en parte efectos adversos de una infección por VSR. Se desvela también por lo tanto un uso de un anticuerpo, parte funcional, derivado o análogo de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento y/o un agente profiláctico para al menos en parte tratar y/o prevenir un trastorno relacionado con VSR, así como un método para al menos en parte tratar o prevenir un trastorno relacionado con VSR, comprendiendo el método administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o equivalente funcional de acuerdo con la invención. Dicho anticuerpo comprende preferentemente el anticuerpo D25, AM14, AM16 y/o AM23.

Para contrarrestar VSR, un anticuerpo de acuerdo con la invención puede administrarse a un individuo antes de que haya tenido lugar una infección por VSR. Como alternativa, un anticuerpo de acuerdo con la invención puede administrarse cuando un individuo ya está infectado por VSR. Dicho anticuerpo puede administrarse a individuos con un riesgo aumentado de trastornos relacionados con VSR, tales como por ejemplo niños con nacimiento prematuro, individuos con enfermedad pulmonar crónica, enfermedad cardíaca congénita y/o inmunidad comprometida, y niños con una edad menor de 6 semanas. Además los ancianos tienen un riesgo aumentado de trastornos relacionados con VSR. Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden administrarse por vía oral o por una o más inyecciones. Los intervalos de dosis de anticuerpos de acuerdo con la invención para usar en las aplicaciones terapéuticas como se ha descrito anteriormente en el presente documento se diseñan basándose en estudios de dosis creciente en la clínica en ensayos clínicos para los que existen requisitos de protocolo rigurosos. Las dosis típicas son entre 0,1 y 10 mg por kg de peso corporal. Para aplicación terapéutica, los anticuerpos de acuerdo con la invención se combinan típicamente con un vehículo, adyuvante, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos adecuados comprenden por ejemplo hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero (por ejemplo BSA o RSA) y ovoalbúmina. Muchos adyuvantes adecuados, basados en aceite y

basados en agua, se conocen por los expertos en la materia. En una realización, dicho adyuvante comprende Specol. En otra realización, dicho vehículo adecuado comprende una solución como por ejemplo solución salina.

En otra realización más se usa un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención. Tras la administración de dicho ácido nucleico, se producen anticuerpos o equivalentes funcionales por la maquinaria del hospedador. Los anticuerpos o equivalentes funcionales producidos son capaces de prevenir y/o contrarrestar la infección por VSR y/o los efectos adversos de una infección por VSR. También se proporciona por lo tanto con la presente una secuencia de ácido nucleico, de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento y/o agente profiláctico. Dicho ácido nucleico se usa preferentemente para contrarrestar el VSR. Se desvela además por lo tanto un uso de una secuencia de ácido nucleico, parte, derivado y/o análogo funcional de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento y/o agente profiláctico para al menos en parte tratar y/o prevenir un trastorno relacionado con VSR.

Por al menos una parte funcional de un ácido nucleico se entiende una parte de dicho ácido nucleico, de al menos 30 pares de bases de longitud, preferentemente menos 50 pares de bases de longitud, más preferentemente al menos 100 pares de bases de longitud, que comprende al menos una característica de expresión (en tipo no necesariamente en cantidad) como un ácido nucleico de la invención. Dicha parte funcional codifica al menos una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia que es al menos 70 % idéntica a una secuencia de CDR como se representa en la Figura HD, Figura 14A, Figura 14B y/o Figura 14C.

La invención proporciona además una célula productora de anticuerpos aislada capaz de producir un anticuerpo, de acuerdo con la invención. Se perfilan modos posibles (pero no limitantes) de obtener dichas células productoras de anticuerpos en detalle en los ejemplos. Los inventores han desarrollado y usado un nuevo método para mejorar la estabilidad de células productoras de anticuerpos específicos de VSR. Usando este método, se generan células productoras de anticuerpos específicos de VSR que son estables durante al menos seis meses. También se desvela por lo tanto con la presente una célula productora de anticuerpos específicos de VSR de acuerdo con la invención, que es estable durante al menos nueve semanas, preferentemente durante al menos tres meses, más preferentemente durante al menos seis meses.

Los presentes inventores han usado su información de que la estabilidad de una célula productora de anticuerpos específicos de VSR está influida por la cantidad de producto de expresión de BCL6 y/o Blimp-1 dentro de dicha célula productora de anticuerpos. La cantidad de producto de expresión de BCL6 y/o Blimp-1 está influida directa o indirectamente. Preferentemente las cantidades de productos de expresión tanto de BCL6 como de Blimp-1 dentro de dicha célula productora de anticuerpos están reguladas, ya que ambos productos de expresión están implicados en la estabilidad de una célula productora de anticuerpos. La estabilidad de una célula productora de anticuerpos se define como la capacidad de dicha célula productora de anticuerpos para permanecer en un cierto estadio del desarrollo (preferentemente después de que dicha célula se ha llevado a dicho estadio). Los diferentes estadios del desarrollo de una célula implican al menos una característica diferente de dicha célula. Por ejemplo, se sabe que un linfocito B de memoria se diferencia tras la estimulación en una célula plasmática secretora de anticuerpo mediante un estadio que algunos investigadores denominan un plasmablasto. Un linfocito B de memoria, un plasmablasto y una célula plasmática son diferentes estados del desarrollo de un linfocito B, en los que el linfocito B tiene características diferentes. Un linfocito B de memoria muestra baja proliferación y secreción de anticuerpos. Un plasmablasto muestra tanto mayores niveles de proliferación como mayores niveles de secreción de anticuerpos en comparación con un linfocito B de memoria, mientras que una célula plasmática secreta altos niveles de anticuerpo pero no es capaz de proliferar. Con los métodos desvelados en el presente documento ha sido posible regular la vida útil replicativa de una célula productora de anticuerpos. Una vida útil replicativa de una célula productora de anticuerpos se define en el presente documento como el periodo de tiempo en el que un linfocito B y sus células descendientes son capaces de replicar manteniendo al mismo tiempo su capacidad para producir anticuerpos y/o desarrollarse a una célula que produce anticuerpo. Preferentemente la vida útil replicativa de una célula productora de anticuerpos se prolonga, lo que significa que dicha célula productora de anticuerpos no se diferenciará de forma terminal, o solamente después de un periodo mayor en comparación con el mismo tipo de células productoras de anticuerpos que se usan en la actualidad, y continúan proliferando *in vitro*. De acuerdo con los inventores es posible regular la cantidad de producto de expresión de BCL6 y/o Blimp-1 en una célula productora de anticuerpos en tal grado que la célula productora de anticuerpos se lleve a y/o se mantenga en un estadio del desarrollo predeterminado en el que las células continúan proliferando. Con el método desvelado de los inventores ha sido por lo tanto posible aumentar la vida útil replicativa de una célula productora de anticuerpos ya que es posible mantener un linfocito B en un cierto estadio del desarrollo en el que se produce replicación. Se hace referencia al documento PCT/NL2006/000625, presentado por el mismo solicitante. Se desvelan en el presente documento medios y métodos para producir células productoras de anticuerpos específicas de VSR estables.

Una célula productora de anticuerpos se define como una célula que es capaz de producir y/o secretar anticuerpo o un equivalente funcional del mismo, y/o siendo dicha célula capaz de desarrollarse a una célula que es capaz de producir y/o secretar anticuerpo o un equivalente funcional del mismo. Una célula productora de anticuerpos específicos de VSR se define en el presente documento como una célula capaz de producir y/o secretar anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos que son capaces de unirse específicamente con VSR y/o un componente de VSR, tal como por ejemplo un epítipo de la proteína F (fusión) de VSR, la proteína G (unión) de VSR o la

proteína SH (hidrófoba pequeña) de VSR. Preferentemente, dicha célula productora de anticuerpos específicos de VSR comprende un linfocito B y/o una célula plasmática derivada de linfocitos B. Un linfocito B se denomina en el presente documento una célula productora de anticuerpos, incluso cuando el linfocito B está en un estadio en el que la producción de anticuerpos es baja o no está presente en absoluto, tal como un linfocito B no tratado previamente o un linfocito B de memoria, que se activa o no, porque dichas células son capaces de desarrollarse a células que producen anticuerpo, tales como un plasmablasto y/o una célula plasmática.

Una célula productora de anticuerpos específicos de VSR preferentemente comprende una célula de mamífero. Los ejemplos no limitantes incluyen células productoras de anticuerpos derivadas de un individuo humano, roedor, conejo, llama, cerdo, vaca, cabra, caballo, simio, gorila. Preferentemente, dicha célula productora de anticuerpos comprende una célula humana, una célula murina, una célula de conejo y/o una célula de llama.

BCL6 codifica un represor transcripcional que se requiere para el desarrollo y maduración de linfocitos B y linfocitos T normales y que se requiere para la formación de centros germinales. (Ye, 1997). BCL6 está altamente expresado en linfocitos B de centro germinal mientras que apenas se expresa en células plasmáticas. BCL6 inhibe la diferenciación de linfocitos B activados en células plasmáticas. Se requiere el represor transcripcional proteína de maduración inducida por linfocitos B 1 (Blimp-1) para el desarrollo de un linfocito B en una célula plasmática. La variante humana de Blimp-1 se denomina Prdml. Como se usa en el presente documento, cualquier referencia a Blimp-1 incluye una referencia a Prdml. Blimp-1 conduce la diferenciación de células plasmáticas. BCL6 y Blimp-1 reprimen la expresión del otro; por lo tanto en una situación natural en la que uno alcanza un nivel de expresión mayor que el otro, se impone el estadio de diferenciación. En el cuerpo humano, la diferenciación de células plasmáticas de linfocitos B sin tratamiento previo o de memoria activadas implica regulación negativa de BCL6 y regulación positiva de Blimp-1. En células de centro germinal la expresión de BCL6 es alta y la expresión de Blimp-1 es baja. En células de memoria en reposo la expresión de BCL6 y Blimp-1 son bajas. Las señales que desencadenan diferenciación provocan una regulación positiva de Blimp-1, y este Blimp-1 contrarresta la expresión de BCL6. El estadio en el que tanto BCL6 como Blimp-1 se expresan es de vida corta y se denomina un plasmablasto. Con niveles de Blimp-1 progresivamente crecientes, la expresión de BCL6 se extingue, dando como resultado una célula plasmática.

Puede proporcionarse una célula productora de anticuerpos específicos de VSR en la que BCL6 y Blimp-1 se coexpresan (lo que significa que tanto BCL6 como Blimp-1 se expresan en dicha célula productora de anticuerpos durante al menos 1 día, preferentemente al menos una semana, más preferentemente al menos seis semanas, más preferentemente al menos tres meses. Dicha célula productora de anticuerpos específicos de VSR es capaz de proliferar cuando se proporciona una señal apropiada. Se ha descubierto que la coexpresión de BCL6 y Blimp-1 da como resultado una célula productora de anticuerpos que es capaz de proliferar y producir anticuerpo. BCL6 y Blimp-1 se coexpresan preferentemente en un linfocito B, preferentemente un linfocito B humano. La coexpresión de BCL6 y Blimp-1 en un linfocito B da como resultado estabilización de dicho linfocito B en un estadio de tipo plasmablasto. Los plasmablastos, como células plasmáticas, son capaces de secretar anticuerpo. Sin embargo, los plasmablastos aún son capaces de proliferar, mientras que las células plasmáticas han perdido su capacidad de proliferar. Las células plasmáticas son por lo tanto inadecuadas para cultivar líneas celulares productoras de anticuerpo.

Una célula productora de anticuerpos específicos de VSR puede comprender una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica BCL6 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo. Un ácido nucleico exógeno se define en el presente documento como una secuencia de ácido nucleico que no pertenece de forma natural al genoma de una célula. Con dicha molécula de ácido nucleico exógena es posible regular una concentración de BCL6 en una célula productora de anticuerpos independientemente de la expresión de BCL6 endógeno. Por lo tanto, incluso si la expresión de BCL6 endógeno es baja o está ausente, por ejemplo provocado por Blimp-1, una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica BCL6 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo aún es capaz de producir una concentración de BCL6 que es suficiente para influir en la estabilidad de una célula productora de anticuerpos. Preferentemente, dicha secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo está constitutivamente activa, de modo que la expresión de BCL6 se mantiene incluso cuando la expresión de BCL6 endógena de dicha célula se inhibe por un represor endógeno tal como Blimp-1. Más preferentemente, la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo está regulada por un inductor exógeno de represor, de modo que el alcance de la expresión de BCL6 se regula a voluntad.

Preferentemente, como se perfila posteriormente en más detalle, una célula productora de anticuerpos específicos de VSR puede comprender una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica Bcl-xL o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo. Si Bcl-xL o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo está presente, es posible cultivar plasmablastos en condiciones de baja densidad celular. La expresión de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica Bcl-xL o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo se regula preferentemente por un inductor exógeno de represor, de modo que el alcance de la expresión de Bcl-xL está regulado a voluntad. Se desvela en el presente documento una célula productora de anticuerpos específicos de VSR que comprende: - una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica BCL6 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo y/o - una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica Bcl-xL o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo.

Dicha célula productora de anticuerpos específicos de VSR preferentemente comprende tanto una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica BCL6 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo, como una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica Bcl-xL, o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo. Preferentemente, la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6, Bcl-xL o una parte, derivado y/o análogo funcional de BCL6 o Bcl-xL está regulada por un activador y/o represor que es inducible por un compuesto exógeno. Por ejemplo, se usa un sistema de promotor inducible tal como sistema de Tet-on o Tet-off.

Una célula productora de anticuerpos específicos de VSR estable puede generarse coexpresando BCL6 y Blimp-1 en una célula productora de anticuerpos específicos de VSR. Una célula productora de anticuerpos específicos de VSR se obtiene preferentemente de un individuo que se ha expuesto a VSR. Se conocen bien en la técnica métodos para aislar células productoras de anticuerpos. Por ejemplo, se incuban compuestos derivados de VSR que se marcan con un marcador y/o una etiqueta con una muestra de un individuo que ha expuesto a VSR, comprendiendo dicha muestra células productoras de anticuerpos. Se aíslan células productoras de anticuerpos específicos de VSR que reconocen los compuestos derivados de VSR marcados mientras que las células no unidas se retiran por lavados. Las células productoras de anticuerpos específicas de VSR resultantes se estabilizan posteriormente coexpresando BCL6 así como Blimp-1.

Las células productoras de anticuerpos totales de un donante expuesto a VSR pueden estabilizarse en primer lugar y después aislarse células que reconocen el compuesto derivado de VSR marcado. Como alternativa las células productoras de anticuerpos se equipan con un marcador (fluorescente) cadena abajo de su receptor de linfocitos B (BCR, forma expresada en membrana del anticuerpo) que señala cuando la célula productora de anticuerpos se une con un antígeno no marcado/no etiquetado mediante el BCR. Se seleccionan células productoras de anticuerpos en las que el marcador está activado y se estabilizan posteriormente coexpresando BCL6 así como Blimp-1. Cuando no hay compuestos derivados de antígenos disponibles pero cuando hay ensayos disponibles para explorar con respecto a anticuerpos únicos, pueden estabilizarse células productoras de anticuerpos totales/en conjunto coexpresando BCL6 así como Blimp-1 y, opcionalmente, también Bcl-XL. En consecuencia, se cultivan células a densidades bajas, preferentemente entre 10 y 100 células por 96 pocillos, en presencia de células L (cultivos de volumen mini, MBC). Pueden usarse sobrenadantes de cultivo directamente en ensayos de exploración, como ELISA, transferencia de Western o ensayos funcionales como ELISPOT, ensayos de neutralización o ensayos de migración celular. Pueden seleccionarse MBC y, para obtener líneas celulares monoclonales de la célula productora de anticuerpos de interés, se forman previamente cultivos de dilución limitante y, preferentemente 2-3 semanas después, se exploran sobrenadantes de esos cultivos de nuevo en el ensayo preferido.

Como se conoce bien por los expertos en la materia, están disponibles en la técnica muchos métodos alternativos. Los métodos mencionados anteriormente son no limitantes.

Se desvela además por lo tanto un método para producir una célula productora de anticuerpos, que es estable durante al menos tres meses y que es capaz de producir anticuerpos específicos de VSR o equivalentes funcionales de los mismos, comprendiendo el método:

- aumentar un nivel de expresión de Blimp-1 en una célula que es capaz de producir anticuerpos específicos de VSR o equivalentes funcionales de los mismos; y
- aumentar y/o mantener un nivel de expresión de BCL6 en dicha célula.

Se ha hecho posible convertir un linfocito B específico de VSR en una célula de tipo plasmablasto y estabilizar dicha célula, de modo que no se produzca diferenciación rápida en una célula plasmática. Esto es contrario al desarrollo natural de células plasmáticas, en las que la expresión de Blimp-1 en un linfocito B de memoria da como resultado desarrollo rápido en una célula plasmática, inhibiendo de este modo la expresión de BCL6 de modo que la célula plasmática resultante apenas exprese BCL6. Una realización de la divulgación implica por lo tanto la coexpresión tanto de BCL6 como de Blimp-1 en un linfocito B específico de VSR, dando como resultado una célula que es capaz tanto de proliferar como de producir anticuerpos. El nivel de expresión de BCL6 en dicho linfocito B específico de VSR se lleva preferentemente, y se mantiene a esencialmente el mismo nivel o a un nivel mayor en comparación con un plasmablasto. De este modo se genera un cultivo estable de linfocitos B específicos de VSR, permaneciendo dichas células capaces de producir anticuerpos específicos de VSR. Estos linfocitos B específicos de VSR que coexpresan BCL6 y Blimp-1 se estabilizan adicionalmente, preferentemente mediante la adición del gen antiapoptótico Bcl-xL. Con la introducción de Bcl-xL es posible ahora cultivar plasmablastos en condiciones de baja densidad celular. Por lo tanto, la invención también proporciona un método para cultivar plasmablastos en condiciones de baja densidad celular que comprende generar una célula productora de anticuerpos específicos de VSR con niveles de expresión de BCL6, Blimp-1 y Bcl-xL con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

La cantidad de producto de expresión de BCL6 (preferentemente una proteína BCL6) en una célula productora de anticuerpos específicos de VSR está regulada de diversas maneras.

Una célula productora de anticuerpos puede desvelarse con un compuesto capaz de influir directa o indirectamente en la expresión de BCL6. Una célula productora de anticuerpos se desvela preferentemente con un compuesto

capaz de potenciar la expresión de BCL6, para contrarrestar la regulación negativa de BCL6 durante la expresión de Blimp-1. Dicho compuesto preferentemente comprende una proteína transdutora de señal de activación y transcripción 5 (STAT5) o una parte, derivado y/o análogo funcional de la misma, y/o una secuencia de ácido nucleico que la codifica. STAT5 es un transductor de señal capaz de potenciar la expresión de BCL6. Hay dos formas conocidas de STAT5, STAT5a y STAT5b, que se codifican por dos genes diferentes, unidos en tándem. La administración y/o activación de STAT5 da como resultado niveles de BCL6 potenciados. Por lo tanto, la regulación negativa de BCL6 por Blimp-1 está al menos en parte compensada por la expresión de regulación positiva de BCL6 por STAT5 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo. Por lo tanto, STAT5 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo es capaz de influir directamente en la expresión de BCL6. También es posible influir indirectamente en la expresión de BCL6. Esto se realiza por ejemplo regulando la cantidad de un compuesto que a su vez es capaz de activar directa o indirectamente STAT5 y/o regular la expresión de STAT5. Por lo tanto la expresión y/o actividad de STAT5 endógeno y/o exógeno aumenta. Es por lo tanto posible potenciar indirectamente la expresión de BCL6 cultivando una célula productora de anticuerpos en presencia de interleucina (IL) 2 y/o IL 4 que son capaces de activar STAT5.

Una célula productora de anticuerpos específicos de VSR puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT5 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo, en el que dicha secuencia de ácido nucleico está constitutivamente activa, lo que significa que STAT5 se expresa continuamente, independientemente de la presencia de reguladores (endógenos). En el caso de que la expresión de STAT5 endógeno sea baja, o esté ausente, se aplica preferentemente una secuencia de ácido nucleico constitutivamente activa exógena que codifica STAT5 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo dando como resultado una concentración de STAT5 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo que es suficiente para potenciar la expresión de BCL6. Más preferentemente, una célula productora de anticuerpos específicos de VSR puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un compuesto que comprende STAT5 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo, preferentemente una proteína de fusión, cuya actividad se regula por un inductor exógeno de represor, de modo que el alcance de la activación de expresión de BCL6 está regulado a voluntad. Otro sistema que permite la inducción de BCL-6 se proporciona por un sistema Tet-on en el que la adición de tetraciclina y/o derivados de tetraciclina inducen la actividad de un transactivador que induce la transcripción del gen de BCL6 seguido de síntesis de proteína BCL. En una realización preferida de la divulgación, una célula productora de anticuerpos puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de estrógenos (ER) y STAT5 como una proteína de fusión ER-STAT5. Esta proteína de fusión está inactiva porque forma un complejo con proteínas de choque térmico en el citosol. De esta manera, STAT5 es incapaz de alcanzar el núcleo y no se potencia la expresión de BCL6. Tras la administración del inductor exógeno 4 hidroxitamoxifeno (4HT), la proteína de fusión ER-STAT5 se disocia de las proteínas de choque térmico, de modo que STAT5 es capaz de entrar en el núcleo y activar la expresión de BCL6.

Adicionalmente, o como alternativa, la expresión de BCL6 en una célula productora de anticuerpos específicos de VSR se potencia cultivando dicha célula productora de anticuerpos en presencia de un compuesto capaz de potenciar directa o indirectamente la expresión de BCL6.

Se desvela en el presente documento un método para producir una célula productora de anticuerpos específicos de VSR que comprende:

- proporcionar una célula productora de anticuerpos específicos de VSR con un compuesto capaz de potenciar directa o indirectamente la expresión de BCL6; y/o
- cultivar una célula productora de anticuerpos específicos de VSR en presencia de un compuesto capaz de potenciar directa o indirectamente la expresión de BCL6. Dicho compuesto capaz de potenciar directa o indirectamente la expresión de BCL6 comprende preferentemente STAT5 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo.

Se desvela por lo tanto un método que comprende proporcionar dicha célula productora de anticuerpos específicos de VSR con STAT5 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo, o con una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT5 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo. Dicha célula productora de anticuerpos puede cultivarse después de la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT5 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo en dicha célula. Dicha secuencia de ácido nucleico se introduce por ejemplo en dicha célula por transfección y/o transferencia génica mediada por virus. Están disponibles en la técnica muchos métodos alternativos para introducir una secuencia de ácido nucleico en una célula que no necesita más explicación en el presente documento.

Con un compuesto capaz de potenciar directa o indirectamente la expresión de BCL6 es posible potenciar la expresión de BCL6 endógeno. Sin embargo una célula productora de anticuerpos puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo. Como se explica en el presente documento anteriormente, se prefiere un ácido nucleico exógeno que codifica BCL6 porque esto permite la regulación de una concentración de BCL6 dentro de una célula independientemente de la expresión de BCL6 endógeno. Por lo tanto, incluso si la expresión de BCL6 endógeno es baja o está ausente, por ejemplo provocado por Blimp-1, una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica BCL6 o una parte, derivado y/o análogo

funcional del mismo aún es capaz de producir una concentración de BCL6 que es suficiente para influir en la estabilidad de una célula productora de anticuerpos. También se desvela por lo tanto un método que comprende proporcionar una célula productora de anticuerpos específicos de VSR con una secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo. Preferentemente, dicha célula productora de anticuerpos se proporciona con una secuencia de ácido nucleico constitutivamente activa que codifica BCL6 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo, de modo que la expresión de BCL6 se mantiene incluso cuando la expresión de BCL6 endógeno de dicha célula se inhibe por un represor endógeno tal como Blimp-1. Más preferentemente, la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo está regulada por un inductor exógeno de represor, de modo que el alcance de la expresión de BCL6 está regulado a voluntad. Por ejemplo, se usa un sistema de promotor inducible tal como un sistema Tet-on o Tet-off, como ya se ha descrito.

También se desvela un método en el que la cantidad de BCL6 está indirectamente regulada por la provisión de una célula productora de anticuerpos específicos de VSR con una secuencia de ácido nucleico que codifica E47 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo. E47 codifica un factor de transcripción que pertenece a una familia de proteínas de hélice-bucle-hélice, concretamente proteínas E. Hay cuatro proteínas E, E12, E47, E2-2 y HEB, que están implicadas en el desarrollo de linfocitos. E12 y E47 están codificadas por un gen, denominado E2A, que se corta y empalma de forma diferente. Las proteínas E puede inhibirse por el inhibidor de proteína E Id2 y Id3, y por ABF-1 (Mathas S., 2006). Se han descrito proteínas E como supresores tumorales y se ha mostrado que la sobreexpresión induce apoptosis. Una de las dianas específicas de E47 son los genes de Socsl y Soc3. Estos genes de Socs se conocen como reguladores negativos de STAT [delta]b y por lo tanto indirectamente de BCL6. En otras palabras, la expresión de E47 dentro de un linfocito B potencia la expresión de Blimp-1 que da como resultado diferenciación de linfocitos B a un fenotipo productor de anticuerpos (célula plasmática).

La cantidad de expresión de Blimp-1 en una célula productora de anticuerpos específicos de VSR también está regulada de diversas formas. Una célula productora de anticuerpos específicos de VSR se proporciona con un compuesto capaz de influir directa o indirectamente en la expresión de Blimp-1. Adicionalmente, o como alternativa, una célula productora de anticuerpos se cultiva en presencia de un compuesto capaz de influir directa o indirectamente en la expresión de Blimp-1. Se desvela además por lo tanto un método que comprende proporcionar una célula productora de anticuerpos específicos de VSR con un compuesto capaz de influir directa o indirectamente en la expresión de Blimp-1. Se desvela además un método que comprende cultivar dicha célula productora de anticuerpos en presencia de un compuesto capaz de influir directa o indirectamente en la expresión de Blimp-1. Puede usarse un compuesto que es capaz de potenciar la expresión de Blimp-1 para contrarrestar la regulación negativa de Blimp-1 durante la expresión de BCL6. Dicho compuesto comprende más preferentemente IL-21.

Dicho compuesto capaz de influir directa o indirectamente en la expresión de Blimp-1 puede comprender una proteína transductora de señal de activación y transcripción 3 (STAT3) o una parte, derivado y/o análogo funcional de la misma, y/o una secuencia de ácido nucleico que la codifica. STAT3 es un transductor de señal que está implicado en el desarrollo y diferenciación de linfocitos B. STAT3 es capaz de regular positivamente la expresión de Blimp-1. Se desvela además por lo tanto un método en el que dicho compuesto capaz de influir directa o indirectamente en la expresión de Blimp-1 comprende STAT3 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo, o una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo. Más preferentemente, la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo está regulada positivamente por un inductor exógeno de represor, de modo que el alcance de la expresión de STAT3 está regulada a voluntad. Por ejemplo, se usa un sistema de promotor inducible tal como por ejemplo un sistema Tet-on o Tet-off. Puede introducirse un producto de fusión que comprende STAT3, un derivado o análogo, y ER en dicha célula permitiendo la regulación de la expresión de STAT3 por hidroxitamoxifeno.

Ya que STAT3 es capaz de influir en la expresión de Blimp-1, también es posible regular indirectamente la expresión de Blimp-1 administrando un compuesto capaz de regular directa o indirectamente la actividad y/o expresión de STAT3. Puede proporcionarse una célula productora de anticuerpos con un compuesto que es capaz de potenciar la actividad de STAT3, de modo que la expresión de Blimp-1 también está potenciada indirectamente. Se proporciona además por lo tanto un método en el que se proporciona una célula productora de anticuerpos con un compuesto capaz de potenciar directa o indirectamente la actividad de STAT3.

Se puede proporcionar una célula productora de anticuerpos con un compuesto capaz de activar directa o indirectamente STAT3, para potenciar la expresión de Blimp-1.

Se activa STAT3 de diversas maneras. Preferentemente, se activa STAT3 proporcionando una célula productora de anticuerpos con una citocina. Las citocinas, que están implicadas de forma natural en la diferenciación de linfocitos B, son muy eficaces en la regulación de proteínas STAT. Son activadores muy eficaces de STAT3 IL-21 e IL-6, pero también se sabe que IL-2, IL-7, IL-10, IL-15 e IL-27 activan STAT3. Además, los receptores de tipo Toll (TLR) que están implicados en la inmunidad innata también son capaces de activar STAT3. Una realización de la presente divulgación proporciona por lo tanto un método en el que dicho compuesto capaz de influir directa o indirectamente en la expresión de Blimp-1 comprende IL-21, IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, IL-15 y/o IL -27. Más preferentemente se usa IL-

21, ya que IL-21 es particularmente adecuado para influir en la estabilidad de una célula productora de anticuerpos. IL-21 es capaz de regular positivamente la expresión de Blimp-1 incluso cuando la expresión de Blimp-1 está contrarrestada por BCL6.

5 Adicionalmente o como alternativa se usa una quinasa Janus (JAK) mutada para activar STAT3. De forma natural, una JAK es capaz de fosforilar STAT3 después de haberse activado en sí misma por al menos una citocina. Una quinasa Janus capaz de activar STAT3, independiente de la presencia de citocinas, es particularmente adecuada en un método desvelado en el presente documento.

10 Como ya se ha explicado antes, un compuesto capaz de potenciar la expresión de Blimp-1 puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica STAT3 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo. La presencia funcional de una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica STAT3 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo permite una presencia continua de STAT3 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo incluso cuando la expresión de STAT3 endógeno es muy baja o está ausente.

15 También es posible reducir la expresión y/o actividad de STAT5 para regular positivamente Blimp-1. Si la cantidad y/o actividad de STAT5 se reduce, la activación de la expresión de BCL6 también se reduce, lo que da como resultado una cantidad reducida de producto de expresión de BCL6. Ya que BCL6 y Blimp-1 contrarrestan cada uno la expresión del otro, una cantidad reducida de producto de expresión de BCL6 da como resultado una cantidad
20 aumentada de producto de expresión de Blimp-1. Los compuestos capaces de regular negativamente la actividad de STAT5 son por lo tanto capaces de regular positivamente de forma indirecta Blimp-1. Dichos compuestos comprenden por ejemplo miembros de las proteína supresoras de la señalización de citocinas (SOCS). La cantidad de producto de expresión de Blimp-1 en una célula productora de anticuerpos específicos de VSR puede por lo tanto regularse positivamente proporcionando dicha célula con una proteína SOCS, y/o activando una proteína SOCS
25 dentro de dicha célula.

La expresión y/o actividad de STAT5 puede reducirse cuando se proporciona una célula productora de anticuerpos específicos de VSR con una secuencia de ácido nucleico que codifica E47 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo. La expresión de E47 dentro de linfocitos B que expresan altos niveles de STAT [delta]b
30 interviene en la diferenciación y proliferación, es decir bloqueo de STAT5 mediante E47 y SOCS da como resultado niveles de BCL6 y posteriormente niveles de Blimp-1 aumentados. Los niveles regulados positivamente de Blimp-1 dan como resultado una proliferación reducida y en una diferenciación de la célula implicada hacia una célula productora de anticuerpos. En otras palabras, la expresión de E47 dentro de un linfocito B potencia la expresión de Blimp-1 lo que da como resultado una diferenciación de linfocitos B hacia un fenotipo productor de anticuerpos
35 (célula plasmática).

Por al menos una parte funcional de una proteína STAT5, una proteína STAT3, Bcl-xL y/o BCL6 se entiende una molécula proteica que tiene la misma capacidad, en tipo, no necesariamente en cantidad, de influir en la estabilidad de una célula productora de anticuerpos en comparación con una proteína STAT5, una proteína STAT3, Bcl-xL y/o
40 BCL6, respectivamente. Una parte funcional de una proteína STAT5 o una proteína STAT3 está por ejemplo desprovista de aminoácidos que no están implicados, o lo están muy poco, en dicha capacidad. Un derivado de una proteína STAT5, una proteína STAT3, Bcl-xL y/o BCL6 se define como una proteína que se ha alterado de modo que la capacidad de dicha proteína para influir en la estabilidad de una célula productora de anticuerpos es esencialmente igual en tipo, no necesariamente en cantidad. Se proporciona un derivado de muchas maneras, por
45 ejemplo mediante sustitución de aminoácidos conservativa en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido con propiedades en general similares (tamaño, hidrofobicidad, etc.), de modo que el funcionamiento general probablemente no se ve afectado gravemente. Un derivado comprende por ejemplo una proteína de fusión, tal como una proteína de fusión STAT5-ER o STAT3-ER cuya actividad depende de la presencia de 4 hidroxitamoxifeno (4HT). Un análogo de una proteína STAT5, una proteína STAT3, Bcl-xL y/o BCL6 se define como una molécula que
50 tiene la misma capacidad de influir en la estabilidad de una célula productora de anticuerpos en tipo, no necesariamente en cantidad. Dicho análogo no deriva necesariamente de dicha proteína STAT5, proteína STAT3, Bcl-xL y/o BCL6.

Dicha célula productora de anticuerpos específicos de VSR puede cultivarse en presencia de IL-21 antes de que
55 dicha célula productora de anticuerpos se proporcione con una secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo. Se prefiere cultivar células productoras de anticuerpos específicos de VSR, preferentemente linfocitos B, en presencia de IL-21 antes de que dicha célula se proporcione con una secuencia de ácido nucleico que codifique BCL6 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo, porque la estabilidad, proliferación y/o producción de anticuerpos está particularmente bien mejorada.

60 La divulgación proporciona un método para influir en la estabilidad de una célula productora de anticuerpos específicos de VSR como se describe en el presente documento, que comprende además aumentar directa o indirectamente la cantidad de producto de expresión de Bcl-xL dentro de dicha célula productora de anticuerpos. Esto se consigue por ejemplo proporcionando dicha célula productora de anticuerpos con una secuencia de ácido
65 nucleico que codifica Bcl-xL o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo o con secuencias de ácido nucleico que codifican otros agentes antiapoptóticos incluyendo pero sin limitación Bcl-2. En otra realización más de

la presente divulgación esto se consigue proporcionando dicha célula productora de anticuerpos con un compuesto capaz de potenciar directa o indirectamente la expresión de Bcl-xL, preferentemente dicho compuesto comprende APRIL, BAFF, CD40, estimulación de BCR, citocinas, factores de crecimiento o efectores corriente abajo como JNK y AKT (PKB).

Bcl-XL es un miembro de la familia de Bcl-2 antiapoptótica, las proteínas Bcl2 interaccionan con y contrarrestan miembros de la familia de solamente dominio de homología con Bcl-2 3 (BH3) tales como Bax, Bak, Bim y Bad, que inducen la liberación de citocromo c después de estímulos de muerte intrínsecos (Boise, L. H, 1993). Por lo tanto, la protección de la integridad de la membrana mitocondrial mediante proteínas como Bcl-xL es crítica para la supervivencia celular.

Se ha mostrado que la activación de STAT5 protege células de la muerte celular. Se ha mostrado que STAT5 regula la expresión de Bcl-xL, lo que apoya un papel antiapoptótico para STAT5. STAT5 regula positivamente la expresión de Bcl-xL mediante elementos de unión a STAT dentro del promotor de Bcl-xL. *In vivo*, la expresión de Bcl-xL está ausente en médula ósea de ratones doblemente deficientes para STAT5A/B. Además, la supervivencia de eritroblastos mediada por STAT5 depende de la regulación positiva de Bcl-xL. Recientemente, se ha mostrado que la sobreexpresión transgénica de Bcl-xL en linfocitos B de ratón promueve la supervivencia de linfocitos B y focos de células plasmáticas no malignas.

Un método de la presente divulgación es particularmente adecuado para producir un cultivo celular que comprende células productoras de anticuerpos específicos de VSR que pueden usarse para producir un cultivo de linfocitos B *ex vivo*. Dichos linfocito B de memoria es preferentemente humano de modos que se producen anticuerpos humanos. Dicho linfocito B preferentemente se origina de un individuo, habiéndose expuesto previamente dicho individuo a virus sincitial respiratorio. Pueden aislarse linfocitos B específicos de VSR de una muestra de sangre periférica y/o una muestra de amígdala, usando métodos conocidos en la técnica. Los linfocitos B de memoria se aíslan por ejemplo por selección (clasificación con perlas magnéticas) con respecto al marcador de linfocitos B CD19 y/o CD22 y selección (posterior) con respecto a IgG de superficie celular y/o CD27 y/o mediante selección negativa con respecto a IgM, IgD y/o IgA. En un linfocito B de centro germinal, la expresión de BCL6 es alta mientras que la expresión de Blimp-1 es baja. El desarrollo natural a una célula secretora de anticuerpos implica la regulación positiva de la expresión de Blimp-1. Ya que Blimp-1 reprime la expresión de BCL6, la regulación positiva de Blimp-1 da como resultado regulación negativa de BCL6 en una situación natural. Sin embargo, la expresión de Blimp-1 está regulada positivamente mientras que la expresión de BCL6 se mantiene al menos en parte. Esto da como resultado una célula productora de anticuerpos específicos de VSR en la que BCL6 y Blimp-1 se coexpresan. Dicha célula productora de anticuerpos específicos de VSR es capaz de proliferar y secretar anticuerpos anti VSR y es por lo tanto adecuada para su uso en un cultivo de linfocitos B *ex vivo*. Dicha célula productora de anticuerpos puede protegerse por apoptosis por Bcl-xL. Una célula productora de anticuerpos específicos de VSR proporciona la ventaja de que es estable y no experimenta diferenciación terminal durante un período prolongado. Dicha célula productora de anticuerpos es estable durante al menos una semana, preferentemente durante al menos un mes, más preferentemente durante al menos tres meses, más preferentemente durante al menos seis meses. Un linfocito B se cultiva preferentemente en presencia de CD40L ya que la replicación de la mayoría de linfocitos B está favorecida por CD40L.

La expresión de BCL6 puede mantenerse esencialmente al mismo nivel, o a un nivel mayor, en comparación con un linfocito B de centro germinal ya que una expresión de BCL6 significativa, junto con expresión de Blimp-1, da como resultado una célula productora de anticuerpos con proliferación y propiedades de producción de anticuerpos y/o estabilidad preferidas. Dicha expresión de BCL6 y/o expresión de Blimp-1 pueden acompañarse de expresión de Bcl-xL, dando como resultado proliferación y propiedades de producción de anticuerpos y/o estabilidad aún más preferidas.

Se desvela en el presente documento un método para producir una célula productora de anticuerpos específicos de VSR que es estable durante al menos una semana, preferentemente durante al menos un mes, más preferentemente durante al menos tres meses, más preferentemente durante al menos seis meses, comprendiendo el método:

- proporcionar un linfocito B de memoria específico de VSR;
- aumentar un nivel de expresión de Blimp-1 en dicha célula; y
- aumentar y/o mantener un nivel de expresión de BCL6 en dicha célula. También se proporciona un método *ex vivo* para producir una célula productora de anticuerpos específicos de VSR que comprende aumentar un nivel de expresión de Blimp-1 en un linfocito B de memoria específico de VSR y aumentar y/o mantener un nivel de expresión de BCL6 en dicha célula. Dichos niveles de expresión de BCL6 y Blimp-1 se llevan preferentemente y/o se mantienen esencialmente en el mismo nivel, o en un nivel mayor, en comparación con un plasmablasto. Dicho linfocito B puede transducirse con BCL6 y Bcl-xL. Se proporciona además por lo tanto un método para producir una célula productora de anticuerpos específicos de VSR que es estable durante al menos tres meses, que comprende:

- proporcionar un linfocito B capaz de producir anticuerpos específicos de VSR con BCL6, o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo; y
- proporcionar dicho linfocito B con Bcl-xL o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo; y
- cultivar dicho linfocito B.

5 Dicho linfocito B se proporciona preferentemente con una secuencia de ácido nucleico que codifica BCL6, o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo, y con una secuencia de ácido nucleico Bcl-xL o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo.

10 Dicho linfocito B se cultiva preferentemente en presencia de un compuesto capaz de potenciar la expresión de Blimp-1, tal como por ejemplo IL-21, IL-2, IL-6, 11-7, IL-10, IL-15, IL-27 o una quinasa Janus mutada. Preferentemente, IL-21 se usa porque esta citocina es particularmente adecuada para potenciar la expresión de Blimp-1 y estabilizar una célula productora de anticuerpos con un método desvelado en el presente documento. Además, para potenciar la eficacia de transducción, dicho linfocito B se cultiva preferentemente en presencia de IL-21 antes de que dicho linfocito B se transduzca con una secuencia de ácido nucleico que codifique BCL6 y/o Bcl-xL, o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo.

20 Dicho linfocito B se proporciona con una proteína SOCS o una parte, derivado y/o análogo funcional de la misma, o un ácido nucleico que la codifica, ya que una proteína SOCS o una parte, derivado y/o análogo funcional de la misma es capaz de potenciar indirectamente la expresión de Blimp-1. En otra realización alternativa o adicional de la presente divulgación, dicho linfocito B se proporciona con E47 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo, o un ácido nucleico que lo codifica. Como ya se ha perfilado anteriormente, como resultado de un nivel aumentado de E47 o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo, la función de la proteína de Socs se potencia y la expresión de Blimp-1 se aumenta indirectamente.

25 En los ejemplos se muestran realizaciones particularmente preferidas de la divulgación. De acuerdo con una realización particularmente preferida de la divulgación, los linfocitos B específicos de VSR se cultivan en primer lugar en presencia de IL-21. Posteriormente los linfocitos B se someten a una reacción de transducción usando un ácido nucleico que codifica BCL6 y un ácido nucleico que codifica Bcl-xL. Preferentemente se usa transducción de espín. Más preferentemente, los linfocitos B y virus que comprenden al menos un ácido nucleico de interés se mezclan, cuando después la mezcla se centrifuga para conseguir una eficacia de transducción alta. Después de la transducción, los linfocitos B se cultivan en ausencia de 11-21 y en presencia de 11-4 y células L durante 3-5 días para permitir la expresión de BCL6. Posteriormente, los linfocitos B pueden someterse de nuevo a una reacción de transducción usando un ácido nucleico que codifica BCL6 y un ácido nucleico que codifica Bcl-xL. A continuación, los linfocitos B se cultivan de nuevo en ausencia de 11-21 y en presencia de 11-4 y células L durante 3-5 días para permitir la expresión de BCL6. Posteriormente, se aíslan células que expresan BCL6 y Bcl-xL y se administra IL-21 de nuevo al cultivo para potenciar la replicación y la producción de anticuerpos. Los anticuerpos que se secretan por células que expresan Bcl-6, Blimp 1 y Bcl-xL en el sobrenadante de cultivo se exploran preferentemente con respecto a una capacidad/actividad/reactividad neutralizante *in vitro* a VSR. Se seleccionan además preferentemente células productoras de anticuerpos que producen esos anticuerpos, por ejemplo mediante cultivo de dilución limitante. Se obtienen por lo tanto linfocitos B específicos de VSR estables en los que se coexpresan BCL6 y Blimp-1. Dichos linfocitos B son capaces de replicar y producir anticuerpos en un cultivo *in vitro* durante al menos seis meses.

45 Se desvela en el presente documento un método que comprende además seleccionar y/o aislar un anticuerpo específico de VSR o equivalente funcional del mismo. Pueden seleccionarse y/o aislarse células productoras de IgM y células productoras de IgG. Preferentemente se selecciona y/o aísla una célula productora de IgG.

50 Las células productoras de anticuerpos específicos de VSR generadas con un método desvelado en el presente documento son adecuadas para producir anticuerpos contra VSR. Sin embargo, los genes que codifican las cadenas pesadas y/o ligeras de Ig se aíslan de dicha célula y se expresan en una segunda célula, tal como por ejemplo células de una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) o células 293 (T). Dicha segunda célula, también denominada en el presente documento una célula productora, se adapta preferentemente a la producción de anticuerpos comerciales. La proliferación de dicha célula productora da como resultado una línea celular productora capaz de producir anticuerpos específicos de VSR. Preferentemente, dicha línea celular productora es adecuada para producir compuestos para su uso en seres humanos. Por lo tanto, dicha línea celular productora está preferentemente libre de agentes patógenos tales como microorganismos patógenos.

60 Se usa preferentemente un método desvelado en el presente documento para generar una célula productora de anticuerpos que es estable durante al menos una semana, preferentemente al menos un mes, más preferentemente al menos tres meses, más preferentemente al menos seis meses de modo que se ha hecho posible la producción de anticuerpo comercial. Más preferentemente se produce una línea celular estable capaz de producir anticuerpos monoclonales. Esta se realiza preferentemente usando linfocitos B de memoria que se han aislado por ejemplo de una muestra por selección con respecto a CD19 y/o CD22 (marcador de linfocitos B) e IgG de superficie celular y/o CD27 (para marcar células de memoria) y/o mediante selección negativa con respecto a IgM, IgD y/o IgA. Además, una célula productora de anticuerpos específicos de VSR se selecciona por ejemplo en un ensayo de unión usando

VSR o un componente derivado de VSR, tal como por ejemplo la proteína F, proteína G y/o proteína SH de VSR. Posteriormente, Blimp-1 y BCL6 pueden coexpresarse en dicha célula productora de anticuerpos específicos de VSR, dando como resultado un cultivo de células capaces de unirse específicamente a (un componente de) VSR. En otra realización preferida más de la divulgación, dicho linfocito B se proporciona adicionalmente con Bcl-xL o una parte, derivado y/o análogo funcional del mismo.

Si solamente se usa una célula de memoria, se obtiene una línea celular que produce anticuerpos monoclonales. También es posible generar una línea celular productora de anticuerpos monoclonales que comienza con linfocitos B capaces de producir anticuerpos contra el VSR. Después de haberse producido un cultivo de linfocitos B estable con un método desvelado en el presente documento, se aísla un linfocito B capaz de producir anticuerpos contra un antígeno específico de VSR y al menos una parte funcional de un gen que codifica la cadena pesada y/o cadena ligera de Ig de dicho linfocito B se expresa preferentemente en una segunda línea celular. Preferentemente al menos una parte funcional del gen que codifica la cadena pesada de Ig y al menos una parte funcional del gen que codifica la cadena ligera de Ig de dicho linfocito B se expresan en una segunda línea celular.

Puede usarse en un método de la presente divulgación una célula productora de anticuerpos, preferentemente pero no necesariamente un linfocito B de memoria, que se ha obtenido a partir de un individuo que se ha expuesto previamente a VSR. De esta manera, ha sido posible producir anticuerpos humanos de interés *ex vivo*.

Se desvela además por lo tanto un método para producir anticuerpos que son capaces de unirse específicamente con y/o neutralizar virus sincitial respiratorio, comprendiendo el método:

- producir una célula productora de anticuerpos capaz de producir anticuerpos específicos de VSR con un método de acuerdo con la invención; y
- obtener anticuerpos producidos por dicha célula productora de anticuerpos.

También se proporciona un anticuerpo aislado o recombinante, como se define en las reivindicaciones así como una célula productora de anticuerpos aislados o recombinantes, como se define en las reivindicaciones que puede obtenerse por un método de acuerdo con la invención, como se define en las reivindicaciones. Dicho anticuerpo comprende preferentemente anticuerpo D25, AM14, AM16 y/o AM23.

Una vez que se ha obtenido una célula productora de anticuerpos específicos de VSR de acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones, preferentemente se aísla y/o se genera artificialmente una parte funcional de un gen que codifica la cadena pesada y cadena ligera de Ig de dicha célula. Se proporciona una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos una parte funcional de una secuencia de ácido nucleico como se representa en la Figura 11, Figura 12, Figura 14A, Figura 14B o Figura 14C. Dicha parte funcional comprende al menos una secuencia de ácido nucleico como se representa en la Figura 11D, Figura 12, Figura 14A, Figura 14B y/o Figura 14C. Dicha parte funcional codifica las CDR como se representan en Figura HD, Figura 12, Figura 14A, Figura 14B o Figura 14C.

Se desvela además una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de cadena pesada que es al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 % homóloga de al menos parte de la secuencia

CAGGTGCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGATGGTCTC
 CTGCCAGGCCTCTGGAGGCCCTCAGAA, ACTATATTATCAAC,
 TGGCTACGACAGGCCCTGGACAAGGCCCTGAGTGGATGGGA,
 GGGATCATTCTGTCTTGGGTACAGTACACTACGCACCGAAGTTCCAGGGC,
 AGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACAGACACAGCCTACATCCATCTGATCAGCCTGAG
 ATCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCGACG,
 GAAACAGCTCTGGTTGTATCTACTACCTACCTACCACACTACTTTGACAAC,
 TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG, y/o
 CAGGTGCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGATGGTCTC
 CTGCCAGGCCTCTGGAGGCCCTCAGAACTATATTATCAACTGGCTACGACAGGCCCTG
 GACAAGGCCCTGAGTGGATGGGAGGGATCATTCTGTCTTGGGTACAGTACACTACGCACCG
 AAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACAGACACAGCCTACATCCATCT
 GATCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCGACGGAACAGCTCTGGTTG
 TATCTACTACCTACCACACTACTTTGACAACCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC TCCTCAG,
 teniendo dicha parte al menos 15 nucleótidos. Dicha secuencia de cadena pesada deriva preferentemente del anticuerpo D25. Dicha secuencia de cadena pesada preferentemente puede comprender una secuencia que es al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 % homóloga de una secuencia como se representa en la Figura HD. También se desvela con la presente una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en cualquiera de las secuencias de cadena pesada mencionadas anteriormente.

También se desvela una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de cadena ligera que es al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos

90 % homóloga de al menos una parte de la secuencia
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCAGCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT CACTTGC,
 CAGGCGAGTCAGGACATTGTCAACTATTTAAAT,
 5 TGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTAC, GTTGCATCCAATTTGGAGACA,
 GGGGTCCTCATCAAGGTTCAAGTGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTAGTCTCACCATCAGCAG
 CCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACATATTATTGT, CAACAATATGATAATCTCCCA,
 CTCACATTCGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAAAAGA y/o
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCAGCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
 10 CACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTGTCAACTATTTAAATTGGTATCAACAGAAACCAGGGA
 AAGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGTTGCATCCAATTTGGAGACAGGGGTCCTCATCAAGGTTT
 AGTGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTAGTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGT
 TGCAACATATTATTGTCAACAATATGATAATCTCCACTCACATTCGGCGGAGGGACCAAGG
 TTGAGATCAAAAAGA, teniendo dicha parte al menos 15 nucleótidos. Dicha secuencia de cadena ligera
 15 preferentemente deriva del anticuerpo D25.

Dicha secuencia de cadena ligera preferentemente comprende una secuencia que es al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 % homóloga de una secuencia como se representa en la Figura HD. También se desvela con la presente una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en cualquiera de las secuencias de cadena ligera mencionadas anteriormente.

20 Se desvela además una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de cadena pesada que es al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 % homóloga de al menos una parte de la secuencia

25 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTC
 CTGTGCGCCTCT, GGATTCAGCTTCAGTCACTATGCC,
 ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCAGTT,
 ATATCTTATGATGGAGAAAATACA,
 30 TATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCTCCATCTCCAGAGACAATTTCAAGAACACAGT
 GTCTCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTCTATATTACTGT,
 GCGAGAGACCGCATAGTGGACGACTACTACTACGGTATGGACGTC,
 TGGGGCCAAGGGGCCACGGTCAACCGTCTCCTCAG y/o
 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTC
 CTGTGCGCCTCTGGATTGAGTTCAGTCACTATGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
 35 GCAAGGGACTGGAGTGGTGGCAGTTATATCTTATGATGGAGAAAATACATATTACGCAGAC
 TCCGTGAAGGGCCGATTCTCCATCTCCAGAGACAATTTCAAGAACACAGTGTCTCTGCAAAT
 GAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTCTATATTACTGTGCGAGAGACCGCATAGTGGACG
 ACTACTACTACTACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGGCCACGGTCAACCGTCTCCTCA, teniendo dicha parte
 40 al menos 15 nucleótidos. Dicha secuencia de cadena pesada preferentemente deriva del anticuerpo AM14. También se desvela con la presente una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en cualquiera de las secuencias de cadena pesada mencionadas anteriormente.

También se desvela una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de cadena ligera que es al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 % homóloga de al menos una parte de la secuencia

45 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
 CACTTGCCAGGCGAGT, CAGGACATTAAGAAGTAT,
 TTAATTGGTATCATCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTGAGCTCCTGATGCAC, GATGCATCC,
 50 AATTTGGAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGGGGATCTGGGACAGATTTTACTCT
 CACCATTAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGGAACATATTACTGT,
 CAACAGTATGATAATCTGCCTCCGCTCACT, TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC y/o
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
 CACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAAGAAGTATTTAAATTGGTATCATCAGAAACCAGGGA
 55 AAGTCCCTGAGCTCCTGATGCACGATGCATCCAATTTGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTT
 AGTGGCAGGGGATCTGGGACAGATTTTACTCTCACCATTAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATAT
 TGGAAACATATTACTGTCAACAGTATGATAATCTGCCTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCA
 AAGTGGAGATCAAACGAACTGTG, teniendo dicha parte al menos 15 nucleótidos. Dicha secuencia de cadena
 60 ligera deriva preferentemente del anticuerpo AM14.

También se desvela con la presente una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en cualquiera de las secuencias de cadena ligera mencionadas anteriormente.

65 Se desvela además una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de cadena pesada que es al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al

menos 90 % homóloga de al menos parte de la secuencia
 GAGGTGCAGCTGGTGGAGACCGGGGAGGCCTGGCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC
 CTGTGCAGCCTCT, GGATTACATTAGTAGTTATAAC,
 5 ATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCACAC,
 ATTAGTGGGGTAGTAGTTACATA,
 TACTACTCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAACGTCAGGAACTCAGT
 ATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGCTGACACGGCTGTGTATTACTGT,
 GCGAGAGAGGATTATGGTCCGGGAAATTATTATAGTCCTAACTGGTTCCGACCCC,
 TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG y/o
 10 GAGGTGCAGCTGGTGGAGACCGGGGAGGCCTGGCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC
 CTGTGCAGCCTCTGGATTACATTAGTAGTTATAACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCACATTAGTGGGGTAGTAGTTACATATACTACTCAGAC
 TCAGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAACGTCAGGAACTCAGTATATCTGCAAAT
 GAACTGAGACTGAGAGCCGCTGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGATTATGGTCCGG
 15 GAAATTATTATAGTCCTAACTGGTTCCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCA, teniendo
 dicha parte al menos 15 nucleótidos. Dicha secuencia de cadena pesada deriva preferentemente del anticuerpo
 AM16. También se desvela con la presente una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que
 comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en cualquiera de las secuencias de cadena pesada
 mencionadas anteriormente.
 20 También se desvela una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una
 secuencia de cadena ligera que es al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos
 90 % homóloga de al menos parte de la secuencia de
 CAGTCTGTCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGAGTCACCATCTC
 25 CTGCACTGGGAGC, AGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGAT,
 GTACACTGGTACCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCAACTCCTCATCTAT, GGCAACACT,
 AATCGGCCCTCAGGGGTCTCCGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCT
 GGCCATCACTGGACTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGC, CACTCCTATGACAGAAGCCTGAGTGGT,
 TCAGTATTCGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCTCAG y/o
 30 CAGTCTGTCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGAGTCACCATCTC
 CTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACTGGTACCAGCAGCTTC
 CAGGAACAGCCCCAACTCCTCATCTATGGCAACTAATCGGCCCTCAGGGGTCTCCGAC
 CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGACTCCAGGCTGA
 GGATGAGGCTGATTATTACTGCCACTCCTATGACAGAAGCCTGAGTGGTTCAGTATTCGGCG
 35 GAGGGACCAAGCTGACCGTC, teniendo dicha parte al menos 15 nucleótidos. Dicha secuencia de cadena ligera
 deriva preferentemente del anticuerpo AM16. También se desvela con la presente una secuencia de ácido nucleico
 aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en cualquiera de
 las secuencias de cadena ligera mencionadas anteriormente.
 40 Se desvela además una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una
 secuencia de cadena pesada que es al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al
 menos 90 % homóloga de al menos parte de la secuencia
 CAGGTGCAAATGGTGGAGTCTGGGGGAAATGTGGTCAAGCCTGGGACGTCCCTGAGACTGTC
 45 CTGTGCAGCGACT, GGATTCAACTTCCATAACTACGGC,
 ATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCGGTT,
 GTTTGGTATGATGGAAGTAAGAAA,
 TACTATGCAGACTCCGTGACGGGCGATTCCGCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCT
 GTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTTTATTATTGT, GTGAGAGATAAAGTGGGAC-
 CGACTCCCTACTTTGACTCC, TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTATCCTCAG y/o
 50 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAAATGTGGTCAAGCCTGGGACGTCCCTGAGACTGTC
 CTGTGCAGCGACTGGATTCAACTTCCATAACTACGGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
 GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCGTTGTTTGGTATGATGGAAGTAAGAAATACTATGCAGAC
 TCCGTGACGGGCCGATTCCGCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCTGTATCTGCAAAT
 GAAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTTTATTATTGTGTGAGAGATAAAGTGGGACCGA
 55 CTCCCTACTTTGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT, teniendo dicha parte al menos 15
 nucleótidos. Dicha secuencia de cadena pesada deriva preferentemente del anticuerpo AM23. También se desvela
 con la presente una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de
 cadena pesada que consiste en cualquiera de las secuencias de cadena pesada anteriormente mencionadas.
 60 También se desvela una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una
 secuencia de cadena ligera que es al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, preferentemente al menos 90 %
 homóloga de al menos parte de la secuencia
 TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTACTGGCCCCAGGAGGGACGGCCGCGATCAC
 CTGTGGAAGAACT, AACATTGGAAGTGAAGT,
 65 GTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCTGCTAT, GATGATGAC,
 GACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCT

GACCATCAGCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGT,
 CAGGTGTGGGATAGGAGTAATTATCATCAGGTA, TTCGGCGGAGGGACCAAGTTGACCGTCCTAG y/o
 TCCTATGTGCTGACTCAGCCCCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGAGGGACGGCCCGGATCAC
 CTGTGGAAGAAACAACATTGGAAGTGAAACTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGG
 5 CCCCTGTGCTGGTCTATGATGATGACGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCT
 GGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGC
 CGACTATTACTGTGAGGTGTGGGATAGGAGTAATTATCATCAGGTATTTCGGCGGAGGGACCA AGCTGACCGTC,
 teniendo dicha parte al menos 15 nucleótidos. Dicha secuencia de cadena ligera deriva preferentemente del
 anticuerpo AM23. También se desvela con la presente una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o
 10 recombinante que comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en cualquiera de las secuencias de
 cadena pesada anteriormente mencionadas.

También se desvela una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que es al menos
 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 % idéntica a al menos una parte funcional
 15 de una secuencia de aminoácidos como se representa en la Figura 11, Figura 14A, Figura 14B y/o Figura 14C,
 teniendo dicha parte al menos 5 restos de aminoácidos. Dicha secuencia de ácido nucleico puede codificar una
 secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de CDR de cadena pesada 1, 2 y/o 3 y/o
 secuencia de CDR de cadena ligera 1 o 2 representada en la Figura 11D. Dicha secuencia de ácido nucleico puede
 20 codificar una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a al menos una de las secuencias de CDR
 representadas en la Figura 14A, en la Figura 14B y/o en la Figura 14C. Dicha secuencia de ácido nucleico puede
 codificar una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica a una secuencia de cadena pesada
 representada en la Figura 11A, a una secuencia de cadena pesada representada en la Figura 14A, a una secuencia
 de cadena pesada representada en la Figura 11B, a una secuencia de cadena pesada representada en la Figura
 14C, a una secuencia de cadena ligera representada en la Figura 11A, a una secuencia de cadena ligera
 25 representada en la Figura 14A, a una secuencia de cadena ligera representada en la Figura 14B y/o a una
 secuencia de cadena ligera representada en la Figura 14C.

Se desvela además por lo tanto una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende
 una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %,
 30 más preferentemente al menos 85 % idéntica a una secuencia de aminoácidos como se representa en la Figura
 11A-D. Dicha secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %
 idéntica a la secuencia de CDR de cadena pesada 1, 2 y/o 3 y/o la secuencia de CDR de cadena ligera 1 o 2 como
 se representa en la Figura 11A-D. Una realización desvela una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o
 recombinante que comprende una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %
 35 idéntica a la secuencia de aminoácidos NYIIN, y/o al menos 75 % idéntica a la secuencia GIIPVLGTVHYAPKFQG
 y/o al menos 70 % idéntica a la secuencia ETAL WSTTYLPH YFD N, y/o al menos 85 % idéntica a la secuencia
 QASQDIVNYLN, y/o al menos 70 % idéntica a la secuencia VASNLET, y/o al menos 70 % idéntica a la secuencia
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVMVSCQASGGPLRNYIINWLRQAPGGQPEWMGGII PVLGTVHYAPKFQGRVTITADEST-
 DTAYIHLISLRSEDTAMYYCATETALWST TYLPHYFDN WGQGLTVTVSS, y/o al menos 70 % idéntica a la
 40 secuencia DIQMTQSPSSLSAAVGDRTITCQASQDIVNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYVASN
 LETGVPSRFSGSGSGTDFSLTISLQPEDVATYYCQYDNLPLTFGGGKVEIK RTV. Una secuencia de ácido
 nucleico desvelada en el presente documento puede ser al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más
 preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % homóloga de cualquiera de las secuencias
 45 enumeradas anteriormente.

Se desvela además una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una
 secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más
 preferentemente al menos 85 % idéntica a una secuencia de aminoácidos como se representa en la Figura 14A-C.
 Dicha secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica a
 una secuencia de CDR como se representa en la Figura 14A, 14B y/o 14C. Una secuencia de ácido nucleico
 50 aislada, sintética o recombinante puede comprender una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos que
 es al menos 70 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: GFSFSHYA,
 ISYDSENT, ARDRIVDDYYYYGMDV, QDIKKY, DAS, QQYDNLPLLT,
 EVQLVESGGGWQPGRSLRLSACAASGFSFSHYAMHWVRQAPGKGLEWVAVIS
 55 YDSENTYYADSVKGRFSISRDNKNTVSLQMNSLRPEDTALYYCARDRIVDD YYYYYGMDVWGQATVTVSS,
 DIQMTQSPSSLSAAVGDRTITCQASQDIKKYLNWYHQKPKGKVPPELLMHDASNLETGVPSRF
 SGRGSGTDFLTISLQPEDIGTYCQQYDNLPLTFGGGKVEIKRTV, GFTFSSYN, ISAGSSYI,
 AREDYGPNGYSPNWFDP, SSNIGAGYD, GNT, HSYDRSLSG,
 EVQLVETGGGLAQPGSLRLSACAASGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLEWVSHI SAGS SYIYYS D
 60 SVKGRFTVSRDNVRNSVYLQMNSLRAADTAVYYCAREDYGPNGYSPN-WFDPWGQGLTVTVSS s,
 QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNTNRPSPGVS
 RFGSGKSGTSASLAITGLQAEDADYYCHSYDRSLSGSVFGGGKTLTV, GFNFHNYG, VVYDGSKK,
 VRDKVGPTPYFDS, NIGSET, DDD, QVWDRSNYHQV, EVQ LVESGGNWKPGTSLRLSACAATGFNFHNY
 GMNWRVQAPGKGLEWVA VVYDGSKKYYAD SVTGRFAI
 65 SRDNKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDKVGPTPYFDSWGQGLTVTVSS, y S YVLTQPPSVS LAPGGTAAI
 TCGRNII GSETVHWYQQKPGQAPVL WYDDDDRPSGI PERFS GSNSGNTATLT I

SRVEAGDEADYYCQVWDRSNYHQVFGGGTKLTV. Una secuencia de ácido nucleico desvelada en el presente documento puede ser al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % homóloga de cualquiera de las secuencias enumeradas anteriormente.

5 Como ya se ha explicado en el presente documento anteriormente, las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención como se define en las reivindicaciones son particularmente adecuadas para expresar un anticuerpo de acuerdo con la invención, preferentemente D25, AM14, AM16, AM23 en un sistema de expresión de ácido nucleico. Una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención como se define en las
10 reivindicaciones se expresa preferentemente en una célula, más preferentemente en una célula productora adaptada para la producción de anticuerpos.

La invención se explica además en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que sirven únicamente para clarificar la invención.

15 Ejemplos

Materiales y métodos

20 Mantenimiento y aislamiento de linfocitos B humanos

Usando procedimientos convencionales, se aislaron linfocitos B humanos CD19 positivos a partir de capa leucocítica derivada de banco de sangre (otras fuentes pueden ser sangre nueva con un factor anticoagulación, o un órgano linfóide por ejemplo amígdala o bazo). Brevemente, se aislaron células mononucleares de sangre periférica totales (PBMC) usando separación por densidad de Ficoll (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido). Se usaron perlas
25 marcadas con CD22 para seleccionar positivamente linfocitos B por técnica de clasificación celular de MACS como se describe por el fabricante (Miltenyi, Utrecht, Países Bajos). Las células se tiñeron posteriormente con combinaciones apropiadas de anticuerpos monoclonales (mAb) para CD19, CD27, IgD, IgM e IgA (Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). Los linfocitos B de memoria que son positivos para CD19 y CD27 y negativos para IgM, IgA e IgD se clasificaron después usando el FACS Aria (BD) (Figura 1). Además de linfocitos B de memoria, pueden aislarse otros subconjuntos de linfocitos B, como linfocitos B sin tratamiento previo, foliculares, de memoria, productores de anticuerpos, centroblastos, centrocitos, de centro germinal, plasmablastos, células plasmáticas, de zona germinal, perisinusoidales o transicionales (muchos de esos subconjuntos solamente se han
30 determinado en ratones) usando marcadores apropiados.

35 Cultivo celular

Las células clasificadas se lavaron y se cultivaron en placas de 24 pocillos ($1,5$ a 2×10^5 células/ml) en células L que expresan CD40L irradiadas con 80 Gray (5×10^4 células/ml; proporcionadas por el Dr. J. Banchereau, Schering Plough Francia, Dardilly Francia), en medio completo (Medio Esencial Mínimo D Modificado por Iscove que contiene
40 suero de ternero fetal al 8 % (FCS) y penicilina/Estreptomina). A no ser que se mencione de otro modo, estas células L que expresan CD40L siempre están presentes en los cultivos en combinación con FCS 8 %. Para preparar el linfocito B para transducción retroviral se cultivaron células durante 36 horas en presencia de IL-21 de ratón (50 ng/ml, R&D, Minneapolis, MN, Estados Unidos). Después de la transducción las células se cultivan preferentemente en presencia de IL-21, sin embargo las células responden a IL-4, IL-15 e IL-10 (sin excluir otras citocinas). Por
45 ejemplo, la expansión de linfocitos B inducida por IL-4 es menor en comparación con IL-21 y pueden requerirse niveles menores de división celular en algunos experimentos.

Construcciones retrovirales y producción de retrovirus recombinante

50 Se han descrito previamente mutantes activos constitutivos de STAT5a y b. Se obtuvo ADN que codificaba estos mutantes y STAT5b de tipo silvestre de T. Kitamura (IMSUT, Tokio, Japón). Se identificó Bcl-6 en una exploración de rescate de senescencia en fibroblastos murinos como un inhibidor de señalización de p19ARF-p53 antiproliferativa. Bcl-XL se identificó como un factor antiapoptosis, que se proporcionó amablemente por el Dr. Korsmeyer (Instituto Médico Howard Hughes, Boston, Estados Unidos). Estos ADN se ligaron al vector LZRS-enlazador-IRES-GFP (o IRES-YFP o IRES-NGFR) que se había descrito previamente (Heemskerk *et al.*, 1997; Heemskerk *et al.*, 1999). En
55 lugar del marcador de IRES-GFP (proteína verde fluorescente) también se usó IRES-YFP (Proteína Amarilla Fluorescente) o un IRES-NGFR (receptor del factor de crecimiento nervioso). NGFR es un mutante incompetente para señalización del NGFR, proporcionado amablemente por el Dr. C. Bonini. Se usó un anticuerpo monoclonal contra NGFR (Chromaprobe, Mountain View, CA, Estados Unidos o Miltenyi) para visualizar células que expresan
60 NGFR.

Para la producción de retrovirus recombinante, los plásmidos retrovirales se transfectaron en una línea celular productora anfotrópica sin virus auxiliar Phoenix-A, un derivado de la línea celular de riñón embrionario humano 293 (Kinsella y Nolan, 1996) (un amable regalo del Dr. G. Nolan, Universidad de Stanford, Palo Alto, CA), usando
65 Fugene-6 (Roche Diagnostics Países Bajos, Almere, Países Bajos) de acuerdo con protocolos del fabricante. Dos días después se inició la selección de células transfectadas mediante la adición de puromicina $2 \mu\text{g/ml}$ (Becton

Dickinson Clontech Laboratories, Palo Alto, CA). De diez a 14 días después de la transfección se sembraron 6×10^6 células por cada placa de Petri de 10 cm (Becton Dickinson Discovery Labware, Bedford, MA) en 10 ml de medio completo sin puomicina. Al día siguiente el medio se renovó y al día siguiente se recogió el sobrenadante retroviral, se centrifugó y se congeló en alícuotas sin células a -70°C . Este enfoque proporciona una producción retroviral reproducible rápida, a gran escala y de alta titulación de más de 3×10^6 partículas infecciosas de virus/ml.

Transducción retroviral

Se analizó el procedimiento de transducción de fragmentos de fibronectina humana recombinante CH-296 (RetroNectin™; Takara, Otsu, Japón) como se ha descrito previamente (Heemskerk *et al.*, 1997; Heemskerk *et al.*, 1999). Se recubrieron placas de 24 pocillos tratadas con cultivo no tisular (Costar, Badhoevedorp, Países Bajos) con 0,3 ml de fragmento de fibronectina humana recombinante CH-296 $30 \mu\text{g/ml}$ a temperatura ambiente durante 2 horas o durante una noche a 4°C . Cuando se usaron placas de cultivo no tisular de diferentes tamaños, los reactivos se usaron proporcionalmente. Se retiró la solución de CH-296, seguido de incubación con albúmina de suero humano (HSA) 2% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavado una vez con PBS. Se sembraron en placas 5×10^5 linfocitos B, que se prepararon para transducción retroviral en 0,25 ml de RPMI sin FCS y células L y se mezclan con 0,25 ml de sobrenadante retroviral descongelado. Para la transducción doble de Bcl-6 Bcl-XL se mezclaron 125 μl de Bcl-6-IRES-NGFR (o IRES-YFP) (Shvarts A. *et al.* Genes Dev., 2002) y 125 μl de Bcl-XL-IRES-GFP (proporcionado por S. Korsmeyer, Instituto Médico Howard Hughes, Hospital Infantil, Boston, Estados Unidos) y se añadieron a las células. El cultivo se centrifugó posteriormente a 1800 rpm a 25°C durante 60 minutos y se incubó durante 6 horas a 37°C . A continuación se retiraron 0,25 ml de sobrenadante y se añadieron 0,25 ml de sobrenadante retroviral nuevo. El cultivo se centrifugó de nuevo a 1800 rpm a 25°C durante 60 minutos y se incubó a 37°C durante una noche. Al día siguiente las células se transfirieron a placa tratada con cultivo tisular de 24 pocillos (Costar) y se cultivó durante 3-5 días en condiciones normales en presencia de IL-4 humano (50 ng/ml) o IL-21 de ratón (50 ng/ml, R&D, Minneapolis, MN, Estados Unidos). La eficacia de transducción se determinó mediante tinción con anticuerpos de un mutante incompetente para señalización, truncado, del receptor de factor de crecimiento nervioso (ΔNGFR , proporcionado por C. Bonini, Hospital de San Rafael, Milán, Italia) o (co)expresión de GFP y/o YFP. Las células que contienen el transgén o los transgenes de interés se seleccionan después para experimentos adicionales.

Citometría de flujo

Se usaron anticuerpos contra las moléculas humanas IgD, IgG, CD3, CD19, CD20, CD27, CD38, CD40, CD45, CD56, CD70, CD80, CD86, HLA-DR (BD) directamente marcadas con FITC, PE, PERCP, PE-Cy5, APC o APC-Cy7 e IgM, cadena ligera kappa, cadena ligera lambda, CD138, marcados directamente con PE (DAKO) para análisis de citometría de flujo. Las células teñidas se analizaron usando un LSRII (BD) y los datos de FACS se procesaron con software informático FlowJo (Tree Star, Inc).

Experimento de proliferación

Se aislaron linfocitos B sin tratamiento previo y de memoria a partir de PBMC nuevos en el FACSaria: linfocitos B sin tratamiento previo: CD19-PE-Cy7 pos, CD27-APC neg, linfocitos B de Memoria IgD-PE pos: CD19-PE-Cy7 pos, CD27 APC pos, IgD-PE neg, IgA-FITC neg. Las células se lavaron en PBS y se resuspendieron en 0,5 ml de RPMI (37°C) sin FCS. Se añadió una cantidad igual de IMDM que contenía carboxifluoresceín succinimidil éster (CFSE) $2 \mu\text{M}$ a la mezcla celular y se incubó durante 7 minutos a 37°C . Se detuvo el marcaje positivo de las células mediante lavado de la célula con FCS frío. Las células se resuspendieron en 500 μl de IMDM-FCS 8% y se cultivaron con células L y en ausencia o presencia de IL-21. Se usaron células no marcadas como control. Después de 36 horas (inmediatamente antes de la transducción), se analizó una proporción de células con respecto a su contenido de CFSE. Las células restantes se transdujeron por espín con Bcl-6-IRES-NGFR, se cultivaron durante 3 días, y se analizaron con respecto a su contenido de CFSE usando el LSRII. Los datos se analizaron usando un software FlowJo (Treestar)

Aislamiento de linfocitos B humanos específicos de antígeno usando clasificación celular individual de alta velocidad

Además del método de aislamiento de linfocitos B de memoria descrito anteriormente que comienza con MBC (es decir cultivos de 100 células/pocillo), los linfocitos B de memoria humanos también pueden incubarse con un antígeno marcado con fluorescente y clasificarse basándose en el reconocimiento de antígenos. Un ejemplo es el aislamiento de linfocitos B que se unen con toxoide del tétanos marcado con ficoeritrina (PE) (proporcionado por A. Radbruch, Berlín, Alemania) (Figura 4). Las células se cultivaron a 1 célula/pocillo y se comprobaron con respecto a unión con TT. A pesar de eso puede usarse cualquier otro antígeno marcado.

Determinación de la expresión del receptor de linfocitos B (BCR) después de cultivo a largo plazo de células transducidas con Bcl-6 y Bcl-XL

Se sabe que los linfocitos B que se diferencian durante el cultivo *in vitro* pierden su expresión en membrana de BCR, que también se observa en linfocitos B transformados con VEB. Por lo tanto los linfocitos B transducidos con Bcl-6 y

Bcl-XL y cultivados en presencia de IL-21 se tiñeron con respecto a GFP, NGFR, CD19, Kappa y/o Lambda o IgG o con toxoide del tétanos marcado. Para mostrar la utilidad de la expresión de BCR se clasificaron células de unión a TT-PE (Radbruch) usando el FACS Aria (BD) a 1 célula/pocillo en placas de 96 pocillos, que se sembraron con células L y medio de cultivo que contenía IL-21. Después de tres semanas se comprobó la unión con toxoide del tétanos de clones en crecimiento usando el FACS Canto (BD). Por lo tanto las células se recogieron y se tiñeron en placas de 96 pocillos con GFP, NGFR, CD19 y TT-PE.

Desarrollo de líneas de linfocitos B dobles positivos para Bcl-6 y Bcl-XL que segregan anticuerpos

Se crearon líneas de linfocitos B que producen anticuerpos monoclonales y son 100 % dobles positivas para Bcl-6 y Bcl-XL. En primer lugar esto se consiguió induciendo la proliferación y diferenciación usando IL-21. Entre tanto estas células se transducen con los retrovirus Bcl-6-IRES-NGFR y Bcl-XL-IRES-GFP. Las células se mantienen en IL-4 durante 3-4 días. Las células que se transducen con uno o ambos retrovirus expresan después el transgén y por lo tanto expresarán la proteína NGFR o GFP. La expresión de NGFR y/o GFP puede visualizarse usando el LSR II (BD). Si es necesario, las células pueden transducirse de nuevo para obtener mayores números de células que expresan ambos transgenes. Independientemente de una segunda transducción las células que expresan ambos transgenes se clasifican usando el FACS Aria (BD) y se cultivan a una densidad celular que varía de 10-500 células/pocillo en placas de 96 pocillos en presencia de IL-21 y de 2500 a 5000 células L/pocillo. Estos cultivos de volumen mini (MBC) secretan cantidades relativamente grandes de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo ya el día 5, lo que después puede usarse para fines de exploración. La exploración puede basarse en técnicas disponibles para el antígeno de interés por ejemplo ELISA/EIA/RIA, transferencia de Western o ensayos funcionales directos como experimentos de neutralización de bloqueo de citocinas. Después de la exploración y selección del MBC que reconocen el antígeno de interés (TT y VSR en los experimentos de los inventores), las células se subclonan a 0,5-1 célula/pocillo en 96 pocillos en presencia de IL-21. La subclonación normalmente tarda 2-3 semanas y puede realizarse mediante cultivos en dilución limitante (DL) o clasificación de células individuales usando citometría de flujo (FACS Aria).

Reserva de virus VSR A-2 y línea celular HEp2

El virus VSR A-2 (proporcionado amablemente por G. van Bleek, WKZ, Utrecht) y la línea celular HEp2 (Clinical Laboratory, AMC, Ámsterdam), se cultivaron en cantidades grandes y se congelaron en nitrógeno líquido.

La línea celular HEp2 adherente se cultivó en medio normal en frascos Falcon T175 antes de congelarse las alícuotas.

Para obtener una reserva de VSR de alto título, se sembraron células HEp2 y se cultivaron hasta alcanzar 50-60 % de confluencia. Se añadió a la reserva de VSR original (dilución 1/20 del volumen total 5 ml) durante 45 minutos a TA en las células HEp2. Se añadieron 15 ml de medio nuevo y las células se dejaron durante una noche a 37 °C, CO₂ 5 % con la tapa abierta. Al día siguiente se retiró cuidadosamente el sobrenadante de cultivo y se añadieron 15 ml de medio que contenía FCS 1 %. Las células se dejaron durante 24 a 36 horas a 37 °C, CO₂ 5 % con la tapa cerrada. Cuando eran claramente visibles sincitios inducidos por VSR y la mayoría de los sincitios aún estaban intactos, el medio se recogió, se filtró (0,22 µm) y se centrifugó a 1450 rpm a TA antes de congelarse instantáneamente las muestras y almacenarse en nitrógeno líquido. Puede obtenerse una segunda recogida añadiendo inmediatamente nuevo medio que contiene FCS 1 % y congelando este lote 4-6 horas después.

Lisado de VSR para ELISA

Las células HEp2 que se habían infectado con VSR A-2 para obtener reservas de virus se usaron para aislar proteínas de VSR. En primer lugar las células se lavaron cuidadosamente con PBS y se tripsinizaron. Se retiró por lavado la tripsina (Gibco) y el sedimento celular se lisó con octilglucósido 1 % (sedimento celular de un matraz T175 se trató con 2 ml de octilglucósido). La suspensión se homogeneizó con jeringa y aguja (10 veces arriba y abajo), se incubó durante 1 hora en hielo y después se dializó frente a 2 l de tampón de TBS pH 7,4, durante una noche a 4 °C. Se obtuvo sobrenadante después de sedimentar por centrifugación los residuos celulares. El contenido de proteínas se determinó a 3,6 mg/ml y se usó a 20 µg/ml (50 µl) en ELISA.

Determinación de DICT₅₀ y UFP de reservas de VSR

Para determinar la DICT₅₀, se sembraron 10⁴ HEp2 en placas de 96 pocillos y se infectaron con una dilución en serie de 2 o 10 etapas de virus VSR en 4-plo. 2-3 días después se retiró el sobrenadante de cultivo y las células se fijaron con acetona 80 % durante 10 minutos a TA. Después de retirar la acetona, la capa celular fija se secó y se mantuvo a 4 °C o se congeló a -20 °C. Para teñir células HEp2 con VSR las placas se bloquearon en primer lugar con leche en polvo al 5 % en PBS Tween 20 0,1 %. Después las placas se lavaron 3 veces antes de incubarse durante 3-5 horas a 37 °C con anti VSR-HRP de cabra policlonal (1:500, Biotest, Saco, ME, Estados Unidos) y se lavaron exhaustivamente. A continuación los pocillos se incubaron con sustrato de AEC durante 30 minutos a TA. Los focos infectados se tiñen de rojo y pueden observarse a la vista usando un microscopio óptico y pueden contarse. Se usó software Excel convencional para determinar la DICT₅₀.

Para determinar la cantidad de unidades formadoras de placas (UFP) del virus, se incubaron 1×10^5 /ml de células HEP2 en placas de 24 pocillos con diluciones en serie 10 veces (10^{-3} - 10^{-7}) de reserva de virus VSR en medio con FCS 1 % a 37 °C durante 45 minutos (200 µl) antes de cubrirse las células y virus con 0,5 ml de agar seaplaque 0,25 % calentado con la mano (Biozyme). La capa de agarosa evita la propagación del virus a células no infectadas a través del medio de cultivo. Por lo tanto el virus puede infectar solamente células adyacentes, que con el tiempo se destruyen por el virus que crea placas en la monocapa de células HEP2. Esas placas pueden visualizarse mejor tiñendo las células fijas (etanol 96 % - ácido acético 100 % - formalina 10 % 6:2:1) con solución de violeta cristal 1 %. Las placas se recuentan (por al menos dos personas diferentes) y puede determinarse el valor de UFP.

10 Selección de anticuerpos neutralizantes de virus sincitial respiratorio (VSR)

Para obtener clones de linfocitos B anti virus sincitial respiratorio (VSR), se aislaron células de sangre periférica (PBMC) de dos donantes de capas leucocíticas derivadas del banco de sangre (donante B62 y B63). Antes de clasificar células CD19^{pos}IgM^{neg}IgD^{neg}IgA^{neg}CD27^{pos} usando el FACSAria (BD) (Figura 1), se aislaron células CD22+ usando perlas MACS y columnas (Miltenyi). Solamente si se menciona de otro modo, las células se cultivaron con células L. Las células se cultivaron durante 36 horas en presencia de IL-21 antes de transducirse con Bcl-6-IRES-NGFR solamente. Después de 12 horas las células se recogieron y se cultivaron durante 3 días en presencia de IL-4 antes de clasificarse las células que expresaban NGFR usando perlas MACS (Miltenyi) y se transdujeron inmediatamente con Bcl-XL-IRES-GFP. Los linfocitos B que no se unían con las perlas MACS se lavaron y se transdujeron con Bcl-6 y Bcl-XL al mismo tiempo. Después de 12 horas las células se recogieron, se agruparon y se cultivaron durante 3 días en presencia de IL-4 antes de clasificarse en expresión de GFP y NGFR en el FACSAria. Las células se lavaron y se cultivaron a una densidad de 100 células/pocillo en placas de 96 pocillos (Costar) en presencia de IL-21.

25 Los cultivos celulares doblemente transducidos con Bcl-6 y Bcl-XL se exploraron con respecto a unión con VSR usando un ELISA de lisado de células HEP2 infectadas por VSR y se ensayaron en paralelo usando un experimento de microneutralización de VSR. Brevemente, se sembraron 10^4 células HEP2 en placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar) en medio completo. Al día siguiente el medio se reemplazó durante 1 hora a TA con la mezcla de virus VSR y sobrenadante de cultivo celular que se ha preincubado durante 30 minutos a 37 °C. El volumen total es de 25 µl y la concentración final de VSR es de 0,1 MOI. Después de 1 hora la mezcla de sobrenadante del virus se diluye 9 veces con PBS y se reemplaza con 100 µl de IMDM/FCS 5 %. Después de 2 días las células se fijan con acetona al 80 % y se tiñen con anti VSR-HRP policlonal (Biosdesign). Usando H₂O₂ y AEC las células infectadas con VSR desarrollan una tinción roja. Usando microscopía óptica las células infectadas pueden observarse y contarse si es necesario. Como control para neutralización de VSR se usa un anti VSR policlonal de cabra (Abcam, Cambridge, MA).

RT-PCR y clonación de regiones VH y VL

40 Se aisló ARN total de $\sim 5 \times 10^5$ linfocitos B con el mini kit RNeasy® (Qiagen, Venlo, Países Bajos). Se transcribieron de forma inversa 250 ng de ARN total en un volumen de 20 µl que contenía tampón de primera cadena 1X, dNTP 500 µM, 250 ng de hexámeros aleatorios, DTT 5 mM, 40 U de RNasina (Promega) y 200 U de SuperScript III RT (Invitrogen). El ADNc se diluyó 10X en agua Ultrapura y se sometieron 2,5 µl de ADNc a PCR en una solución de 50 µl que contenía Tris-HCL 20 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 250 µM, 1 U de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems Inc.) y 25 pmoles de cada cebador. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 8 minutos de etapa de desnaturalización a 96 °C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 96 °C, 30 segundos a 60 °C, 1 min a 72 °C y una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Se procesaron productos de PCR en geles de agarosa, se purificaron y se clonaron en el vector de clonación pCR2.1 TA de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se realizó análisis de secuencia usando química de BigDye Terminator (Applied Biosystems Inc.) y software Vector-NTI (Invitrogen).

Para descartar mutaciones inducidas por transcriptasa inversa y/o ADN polimerasa, se realizaron varias conversiones de ADNc y reacciones de PCR y se clonaron individualmente y se analizó la secuencia. Se determinaron las secuencias consenso con software Vector-NTI Contig Express.

55 Para expresión de anticuerpos de proteínas recombinantes en células 293T se generaron construcciones de cadena pesada y ligera de longitud completa en pcDNA3.1(+)-Zeo (Invitrogen). El vector de expresión de cadena pesada se construyó por amplificación por PCR de la secuencia líder de cadena pesada y región VH del clon D25 introduciendo un sitio 5'-NheI y un sitio 3'-XhoI. La región constante IgG1 (CH1-bisagra-CH2-CH3) se amplificó a partir del mismo ADNc introduciendo al mismo tiempo un sitio 5'-XhoI y un 3'-NotI. El vector de expresión de cadena pesada de longitud completa se obtuvo por ligamiento de tres puntos en pcDNA3.1(+)-Zeo digerido con NheI/NotI. La construcción de expresión de cadena ligera de longitud completa se generó mediante amplificación por PCR de la secuencia líder de cadena ligera, región VL y región constante de cadena ligera con cebadores introduciendo un sitio 5'-NheI y 3'-NotI. Este último producto se clonó en pcDNA3.1(+)-Zeo digerido con NheI/NotI para obtener un vector de expresión de cadena ligera de longitud completa.

Se realizó análisis de secuencia para confirmar la corrección de las construcciones de expresión.

5 Se realizó transfección doble transitoria (Fugene-6, Roche, Alemania o Lipofectamine LTX, Invitrogen) de células 293T con vectores de expresión de cadena tanto pesada como ligera para producir anticuerpo monoclonal recombinante. Se realizó una tinción de FACS con el sobrenadante de cultivo resultante (48 horas) en células Hep2 infectadas por VSR para mostrar la unión funcional del anticuerpo con la proteína F de VSR.

Los oligonucleótidos usados para amplificaciones por PCR fueron:

regiones VH:

10

VH1-Dir	5'-AAATCGATACCACCATGGACTGGACCTGGAGG-3'
VH1B-Dir	5'-AAATCGATACCACCATGGACTGGACCTGGAGM-3'
VH2A-Dir	5'-AAATCGATACCACCATGGACACACTTTGCTMCAC-3'
VH2B-Dir	5'-AAATCGATACCACCATGGACATACTTTGTTCCAAC-3'
VH3-Dir	5'-AAATCGATACCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC-3'
VH3B-Dir	5'-AAATCGATACCACCATGGARYTKKGRCTBHGC-3'
VH4-Dir	5'-AAATCGATACCACCATGAAACACCTGTGGTTCTT-3'
VH5-Dir	5'-AAATCGATACCACCATGGGGTCAACCGCCATC-3'
VH6-Dir	5'-AAATCGATACCACCATGTCTGTCTCCTTCCCTC-3'
Cgamma-Inv	5'-GGGTCTAGACAGGCAGCCAGGGCCGCTGTGC-3'

regiones Vkappa:

Vk1-Dir	5'-AAATCGATACCACCATGGACATGAGGGTCCCY-3'
Vk1B-Dir	5'-AAATCGATACCACCATGGACATGAGRGTCCYY-3'
Vk2-Dir	5'-AAATCGATACCACCATGAGGCTCCCTGCTCAG-3'
Vk3-Dir	5'-AAATCGATACCACCATGGAARCCCCAGCGCA-3'
Vk4-Dir	5'-AAATCGATACCACCATGGTGTTCAGACCCAG-3'
Ck-Inv	5'-GATCGCGGCCGCTTATCAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT-3'

15 regiones Vlambda:

VIIa ECB	5'-AAATCGATACCACCATGGCCTGGTCCCCTCTCCTCC-3'
VI1g	5'-AAATCGATACCACCATGGCCGGCTTCCCCTCTCCTCC-3'
VI2/10	5'-AAATCGATACCACCATGGCCTGGGCTCTGCTCCTCC-3'
VI3jpah	5'-AAATCGATACCACCATGGCCTGGACCGCTCTCCTGC-3'
V15/7	5'-AAATCGATACCACCATGGCCTGGACTCCTCTCCTTC-3'
V16/9	5'-AAATCGATACCACCATGGCCTGGGCTCCTCTCCTTC-3'
VI3rm	5'-AAATCGATACCACCATGGCCTGGATCCCTCTCCTCC-3'
VI3I	5'-AAATCGATACCACCATGGCCTGGACCCCTCTCTGGC-3'
VI3e	5'-AAATCGATACCACCATGGCCTGGGCCACACTCCTGC-3'
VI4c	5'-AAATCGATACCACCATGGCCTGGGTCTCCTTCTACC-3'
VI8a	5'-AAATCGATACCACCATGGCCTGGATGATGCTTCTCC-3'
C12/7	5'-GATCGCGGCCGCTTATCAWGARCATTCTGYAGGGGCCACTG-3'

Los oligonucleótidos usados para construcciones de vectores de expresión fueron:

20 Vector de expresión de cadena pesada:

VH1-L-NheI:	5'-GCGGCTAGCCACCATGGACTGGACCTGGAGG-3'
JH4/5-XhoI:	5'-GCGCTCGAGACGGTGACCAGGGTTCCCTG-3'
CHfw-XhoI:	5'-CGCGCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC-3'
CHrev-NotI:	5'-GATCGCGGCCGCTTATCATTTACCCGGRGACAGGGAGAGGC-3'

Vector de expresión de cadena ligera:

25

VK1-L-NheI:	5'-GCGGCTAGCCACCATGGACATGAGGGTCCCY-3'
CK-NotI:	5'-GATCGCGGCCGCTTATCAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT-3'

RT-PCR de VEB

30 Para ensayar si la respuesta proliferativa fuerte estaba relacionada con la presencia de VEB, se realizó una RT-PCR de VEB. El procedimiento de RT se ha descrito anteriormente. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización de 7 minutos a 94 °C seguido de 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 62 °C (HPRT1), 52 °C (LMP-1) y 58 °C (EBNA1/2) y 30 s a 72 °C, y una extensión final de 7 minutos a 72 °C. Los oligonucleótidos usados

para RT-PCR fueron los siguientes: HPRT1 directo (5'-TATGGACAGGACTGAACGTCTTGC-3') y HPRT1 inverso (5'-GACACAAACATGATTCAAATCCCTGA-3'); LMP-1 directo: (5'-GCGACTCTGCTGGAAATGAT-3') y LMP-1 inverso (5'-GACATGGTAATGCCTAGAAG-3'); EBNA1/2 directo (5'-AGCAAGAAGAGGAGGTGGTAAG-3') y EBNA1/2 inverso (5'-GGCTCAAAGTGGTCTCTAATGC-3').

5 Además de la RT-PCR se realizó una PCR directamente en sedimento celular y ADN sobrenadante que se aisló usando el kit de aislamiento QIAmp (Qiagen).

10 EJEMPLO 1

Resultados

Fenotipo de linfocitos B

15 El uso de linfocitos B de memoria humanos como la plataforma para aislar medicinas terapéuticas se basa en la capacidad para cultivar y ensayar estas células durante un periodo de tiempo relativamente largo. Los linfocitos B humanos pueden cultivarse y mantenerse en una situación de laboratorio sin embargo no el suficiente tiempo para expandir, seleccionar y clonar líneas de linfocitos B individuales frente a un antígeno de interés. Se desarrollaron técnicas de inmortalización basadas en modificaciones genéticas de linfocitos B humanos. Se estudiaron dianas
20 cadena abajo de STAT5. Entre otras una diana es Bcl-6. Bcl-6 inhibe la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas que se detienen en proliferación. La sobreexpresión de Bcl-6 mantiene Blimp1 en equilibrio, un factor de transcripción cuya expresión está potenciada fuertemente por la estimulación de linfocitos B con IL-21 (actúa mediante STAT3). Blimp1 es necesario para inducir el desarrollo de células productoras de Ig (CD20-CD38+) mientras que Bcl-6 puede evitar esto (las células mantienen la expresión de CD20, el denominado fenotipo de centro
25 germinal).

Para estudiar el posible sesgado de ciertas poblaciones celulares dentro del compartimento de linfocitos B, el marcaje con CFSE antes de la estimulación de linfocitos B humanos de memoria y sin tratamiento previo nuevos reveló que todas las células comienzan a dividirse y que todas las poblaciones de linfocitos B se transducen
30 igualmente (Figura 2). Se muestran linfocitos B de memoria transducidos con Bcl-6 y se cultivan en presencia de IL-21 e IL-4. Se transdujeron linfocitos B sin tratamiento previo a un nivel menor y las velocidades de división fueron menores a las 36 horas pero fueron idénticas a linfocitos B de memoria después de otros 3 días de cultivo (datos no mostrados).

35 A continuación se mostró que Bcl-6, junto con Bcl-XL (diana corriente abajo antiapoptótica de STAT5), la señalización de CD40L y en presencia de IL-21, mantienen linfocitos B de memoria IgG humanos en el fenotipo CD20+CD38dull durante períodos de tiempo largos (>3 meses) (Figura 3). Además, los linfocitos B Bcl-6 Bcl-XL tienen un fenotipo correspondiente a linfocitos B activados (véase Tabla 1, ejemplificado por tinción con FACS de 3 clones de linfocitos B TT+), ya que estas células tienen alta expresión de CD80, CD86 y HLA-DR, determinado en
40 tres clones de linfocitos B Bcl-6 Bcl-XL diferentes cultivados con IL-21 y señalización de CD40L.

tinción	resultado	tinción	resultado
CD2	neg	CD69	neg
CD5	neg	CD70	pos
CD7	neg	CD71	pos
CD10	pos	CD73	neg
CD20	pos	CD80	pos/alto
CD21	pos	CD86	pos
CD22	pos	CD95	pos/alto
CD23	neg/5 % pos	CD126	neg
CD24	neg	CD132 (gamma común)	pos
CD25	pos	CD138	neg/2 %pos
CD27	neg/bajo	CD154 (CD40L)	8 %pos
CD28	neg	ICOSL	pos
CD30	pos(56-74 %)	IgM	neg
CD38	pos/intermedio	IgG	pos
CD40	pos	HLA-DR	pos(alto)
CD44	pos	Kappa	pos/neg
CD45	pos	Lambda	pos/neg
CD45RA	pos/alto	IL21-R	pos

Expresión en membrana de anticuerpos

Las células negativas para VEB, transducidas con Bcl-6 Bcl-XL permanecieron positivas para expresión de BCR como se determinó por unión a antígeno o tinción con Kappa o Lambda (Figura 3 y 4). Por lo tanto, dichas células son particularmente adecuadas para aislar y/o explorar después de un período de cultivo largo con respecto a una especificidad deseada, por ejemplo usando antígeno marcado, debido a que dichas células se unirán con dicho antígeno marcado con su BCR. Esto se confirmó mediante clasificación de células individuales de linfocitos B doblemente transducidos con Bcl-6 y Bcl-XL que se unen con TT marcado con PE usando el FACSaria. Después de tres semanas se tiñeron clones clasificados para células individuales con marcadores apropiados y TT-PE en placas de 96 pocillos y se midieron con respecto a unión en el FACS Canto (BD) (Figura 4). En conclusión, en casos en los que se desee la presencia de un receptor de linfocitos B en linfocitos B, tal como por ejemplo en ensayos de exploración, los linfocitos B se transducen preferentemente con Bcl-6 y Bcl-XL y no se infectan con VEB.

División celular y curvas de crecimiento

Los linfocitos B transducidos con Bcl-6 Bcl-XL se dividen en promedio 0,6 veces al día. La velocidad de división varía entre donantes y la densidad celular de los cultivos (Figura 5a). El clon anti VSR D25 tiene una velocidad de división de 0,47 veces al día (Figura 5b). Las células pueden cultivarse a densidades por debajo de 1 célula/96 pocillos para fines de clonación.

Secreción de anticuerpos de linfocitos B Bcl-6 Bcl-XL

Los linfocitos B transducidos con Bcl-6 Bcl-XL secretan de promedio un µg/ml de anticuerpos, lo que es suficiente para que crezcan cantidades necesarias para ensayos preclínicos (Figura 6). Sorprendentemente el clon D25 anti VSR produjo tres veces más anticuerpos en comparación con las otras líneas celulares ensayadas.

Determinación del contenido de VEB

RT-PCR de VEB en ARNm de líneas celulares Bcl-6 Bcl-XL que se cultivaron con IL-21 y señalización de CD40L. En las líneas celulares obtenidas con esta técnica de inmortalización no se ha detectado nunca un transcrito génico de VEB (datos no mostrados).

Procedimiento de selección

Debido a la estabilidad en el crecimiento y expresión del BCR, estas células son adecuadas para aislar linfocitos B específicos de antígeno. Proporcionó a los inventores la oportunidad de usar varios procedimientos de selección y clonación diferentes. Uno es obtener inmediatamente células específicas de antígeno después de introducción de Bcl-6 y Bcl-XL por FACS o clasificación de perlas magnéticas usando antígeno marcado de interés potenciando de este modo la probabilidad de generar múltiples clones de linfocitos B específicos de antígeno. Otra opción es cultivar linfocitos B de memoria transducidos, Bcl-6 Bcl-XL a granel, purificados (o cualquier otro) a densidades celulares bajas (por ejemplo 100 células/pocillo). Pueden recogerse sobrenadantes de estos cultivos de 100c/p y ensayarse con respecto a su especificidad. Los cultivos de 100 células/pocillo que resultan ser positivos para reconocimiento de antígenos, se subclonan después por cultivos de dilución limitante para obtener líneas celulares monoclonales. Usando ambos métodos se pudieron aislar más de 40 clones de linfocitos B que reconocían toxoide del tétanos (TT). Por tanto estos clones se seleccionaron con unión de TT con el BCR en el FACSaria o se seleccionaron por exploración de ELISA de una serie de cultivos hasta que se aisló la línea celular monoclonal anti TT individual (no mostrado).

Selección de anticuerpos neutralizantes de VSR

A partir del donante B63, 25 cultivos de 100 células/pocillo bloquearon completamente la infección y replicación de VSR. D10, uno de los cultivos de 100 células/pocillo neutralizantes produjo un fuerte anticuerpo anti-VSR que se clonó por cultivo en dilución limitante. Uno de los anticuerpos monoclonales, D25 se usó para continuar los estudios. D25, un anticuerpo monoclonal con una cadena pesada de IgG1, como se determinó por ELISA comercial (Sanquin, Ámsterdam, no mostrado) y una cadena ligera Kappa (Figura 7), bloqueó muy eficazmente la infección por VSR con un valor de CI_{50} de entre 0,5 y 1,5 ng/ml (± 10 pM) mientras que la CI_{50} del anticuerpo anti-VSR convencional usado en la clínica (palvizumab desarrollado por MedImmune) es de 0,453 µg/ml (3,02 nM) (H. Wu *et al.* 2005 J.Mol.Biol. y A. Mejias *et al.* 2005 Antimicrob. Agents Chemother.) (Figura 8).

Reconocimiento de antígenos

Además de los experimentos de neutralización, se determinó la unión de D25 con células HEp2 infectadas por VSR. Se infectaron células HEp2 usando el protocolo de producción de virus regular. Las células HEp2 infectadas con VSR se tripsinizaron y se incubaron con 25-50 µl de sobrenadante de cultivo. Las células se lavaron y se tiñeron con IgG-PE de ratón anti-humano (BD o Jackson) para detectar la unión del anticuerpo D25 con las células infectadas.

Se usó el anticuerpo de control de ELISA r-Biopharm como un control interno. Se muestra en la figura 9a la unión de D25 con células HEp2 infectadas por VSR intactas.

Ya que la proteína de envoltura (membrana) del VSR existe de dos proteínas, concretamente la proteína G y F, la unión de D25 se ensayó frente a células infectadas con el virus VSR pseudotipado sin proteína o con la proteína F de VSR o G de VSR (amablemente proporcionadas por John K Rose). Como se muestra en la figura 9b, D25 se unió fuertemente a células EL-4 infectadas con la proteína F de VSV. En un intento de estudiar el epítipo reconocido por D25 frente a palivizumab, se incubaron células EL-4 infectadas con proteína F de VSV con cantidades crecientes de D25 o palivizumab. Las células se lavaron y se tiñeron con una mezcla de 3 anticuerpos anti-F-VSR de ratón (Dako). A diferencia de Palivizumab que mostró competición por la unión con células VSV-F infectadas con el anticuerpo de ratón anti-F-VSR, la unión de D25 no se vio afectada (datos no mostrados).

La Figura 9c muestra la unión de Palivizumab (Synagis) y D25 de una manera dependiente de la concentración con células HEp2 infectadas. Ya que ambos anticuerpos se unen 1 a 1 con su proteína diana no hay diferencia en la unión con células HEp2 infectadas.

Frecuencia de unión a antígeno de VSR frente a controles neutralizantes

Se calculó que la frecuencia de linfocitos B de memoria específicos de antígeno que se unen con VSR era del 17 % y la frecuencia de células específicas de antígeno que neutralizaron VSR era del 6 %, como se determinó para el donante B63. D25 se une con un epítipo conformacional que es diferente del epítipo reconocido por palivizumab. Esto se ilustra en la figura 10 en la que D25 no se une con epítopos lineales desnaturalizados presentados por lisado celular infectado por VSR lisado aplicado en placas de ELISA mientras que palivizumab sí se une a proteína desnaturalizada (F).

Aislamiento y purificación de fragmentos de anticuerpo

A partir de varias líneas de linfocitos B incluyendo el clon altamente neutralizante de VSR D25 los inventores fueron capaces de cultivar volúmenes de hasta 500 ml. Estos sobrenadantes de cultivo contienen al menos 2 µl/ml, por lo tanto los inventores deberían ser capaces de obtener suficiente anticuerpo purificado para realizar estudios pre-clínicos (animales). La purificación se realiza usando Kit de Purificación de Antígeno de Montaje (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos) y columnas HiTrap de Proteína A HP (GE Healthcare, Diegem, Bélgica).

Además, se transfectaron células 293T con la cadena pesada y ligera de D25 que se subclonó en vectores de expresión de proteínas pCDA3.1 usando lipofectamine LTX (Invitrogen). La cantidad de IgG que estaba presente en el sobrenadante era de aproximadamente 22 µg/ml (volumen total 50 ml). Este anticuerpo derivado de la secuencia de nucleótidos clonada del anticuerpo expresado por la línea de linfocitos B D25 reconoció también células de HEp2 infectadas (datos no mostrados).

Secuencia de anticuerpos

La Figura 11a muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de cadena pesada y ligera del clon B63D10-D25. Usando RT-PCR convencional y cebadores específicos de anticuerpo, se determinaron las secuencias de cadena pesada (Vh1-69) y ligera (Vkl O8/018). La secuencia de anticuerpos completa se clonó usando vectores TOPO y después de control de secuencia, se subclonaron en el vector de expresión de proteínas de mamíferos pCDNA3.1 (Invitrogen). Las Figuras 11b y 11c representan la cadena VH y VL4 del clon, Astricks indica mutaciones comparadas con la secuencia de línea germinal del Vh1-69 que deben haber sucedido durante la maduración de afinidad y selección de linfocitos B adicional.

Resumiendo, se muestra aquí el aislamiento, la caracterización y el cultivo a largo plazo de linfocitos B de memoria humana usando los transgenes Bcl-6 y Bcl-XL. Proporcionan la herramienta necesaria para aislar anticuerpos con propiedades únicas, como el anticuerpo monoclonal anti-VSR B63D10-B25. Ya que los linfocitos B son de origen humano, pueden utilizarse fácilmente como una medicina terapéutica.

EJEMPLO 2

Las cadenas pesada y ligera de D25 se clonaron en vectores de expresión convencionales como se ha descrito anteriormente ("secuencia de anticuerpo" p44). Para crear una construcción de expresión que permite una expresión de proteína máxima las secuencias de cadena pesada y ligera D25 se optimizaron con respecto a sus codones por GENEART (Regensburg, Alemania). En este procedimiento se crearon sitios de restricción adicionales para simplificar los procedimientos de clonación futuros pero lo que es más importante los codones de nucleótidos que se traducen a secuencias de aminoácidos se optimizaron para traducción máxima a proteína. Por lo tanto la secuencia de nucleótidos se optimizó pero la secuencia de aminoácidos permaneció sin cambios. Se muestra en el EJEMPLO 4 la capacidad neutralizante de D25 derivado de sobrenadante de linfocitos B purificado, D25 recombinante y D25 optimizado por GENEART. Todos neutralizan eficazmente VSR.

Las modificaciones de GENEART en comparación con la secuencia de D25 original se representan en la Figura 12.
EJEMPLO 3

A continuación de los experimentos de neutralización de VSR *in vitro* se ensayó el anticuerpo monoclonal D25 en modelos *in vivo*. Los modelos que se han descrito para ensayos anti-VSR *in vivo* son ratones BALB/c y ratas algodoneras (*Sigmodon hispidus*) (Mejias A *et al.*, Antimicrobial Agents and chemotherapy 2004; p1811, Johnson S *et al.*, JID 1997; p1215 y Wu H *et al.*, JMB 2007: p652). El modelo de ratón BALB/c es claramente el modelo más débil pero ya que las ratas algodoneras son difíciles de obtener y mantener, se establecieron en primer lugar ensayos de D25 en ratones BALB/c.

Protocolo: anticuerpos específicos de VSR en BALB/c, Día 5

Diseño experimental:

- Día -1. Inyección I.P. de 100 µl de anticuerpos
- Día 0. Infección I.N: de 1×10^7 ufp de VSR A2 en 50 µl
- Días 1 a 5, comprobación de bienestar general y pesado de los ratones
- Día 5, autopsia, recogida de BAL, sangre y pulmones
- Extracción de sangre mediante punción venosa
- Recogida de 2,0 ml de BAL mediante cánula traqueal
- Recogida de los pulmones
- Comenzar inmediatamente DICT₅₀ en material de BAL (1 ml)
- Congelar 1 ml de material de BAL (ELISA de citocina/RT-PCR) -80 °C
- Realizar DICT₅₀ en material largo preparado (1 ml)
- Congelar 1 ml de material largo (ELISA de citocina/RT-PCR) -80 °C
- Recoger/centrifugar sangre para ELISA de hlgG en suero en almacenamiento a -80 °C

Los resultados se muestran en la Figura 13:

(A) Un día antes de la exposición a VSR (1×10^7 partículas de VSR-A2) por pulverización nasal, se inyectó IP a los animales diferentes cantidades de Synagis (MedImmune), D25 purificado o un anticuerpo de control IgG1 (Eureka) (Tabla 3). (Figura 13B) Los niveles de IgG humanos se determinaron en sueros de ratones desde el día 5 y el descenso en los niveles de anticuerpo en suero en 5 días; la Tabla 4 muestra una visión de conjunto de los valores de semividas. La Figura 13D representa títulos de virus hallados en lavados pulmonares (BAL) el día 5 en animales tratados y no tratados mientras que la figura 13E representa números de linfocitos T y B en sangre periférica de ratones tratados y no tratados. La Figura 13F muestra la histología de los pulmones con bronquios e infiltración de (normalmente principalmente eosinófilos) animales no tratados y tratados.

Conclusión/resultados:

Una estimación de la semivida de D25 es de 5 a 9 días basándose en el cálculo (lineal) de que se inyectaron 60 y 30 µg de anticuerpo el día 0 (2 y 1 mg/kg respectivamente) y el día 5 se detectaron 33 o 16 µg (volumen total de ratones 1,5). Cuando se inició con inyección de 0,5 mg/kg por animal el día 0 entonces los niveles de Ig descendieron desde 15 µg a 11 µg el día 5, lo que indicaría una semivida de 9 días (Tabla 4).

Tabla 4

mg/kg	total administrado	d0 (µg)	detectado el d5 (µg)	semivida (días)
2,0	60		33	5,6
1,0	30		16	5,4
0,5	15		11	9,4

El título del virus como determinó el ensayo de DICT50 muestra que en animales de control pueden detectarse 1×10^4 UFP mientras que no se detectó virus en los animales tratados con Synagis (2 mg/kg) o D25 (2, 1 y 0,5 mg/kg).

Los animales tratados con Synagis o D25 mantuvieron mayor % de linfocitos T CD4 periféricos y linfocitos B B220. Los animales tratados con Synagis (2 mg/kg) tienen menor % de linfocitos T CD4 en comparación con animales tratados con D25. Aunque esto puede no ser significativo es importante observar que los animales tratados con una dosis baja de D25 (1 y 0,5 mg/kg) mantienen altos niveles de linfocitos B y T en comparación con animales tratados con control.

Aunque los datos de histología (figura 13F) no son cuantitativos está claro que Synagis y D25 reducen el flujo de entrada de células inmunitarias en los pulmones y en torno a los bronquios en comparación con el control. Cuando

se comparan D25 y Synagis, entonces los animales tratados con D25 parecen tener menos infiltración celular a los pulmones y alrededor de los bronquios.

Para ensayar D25 en las ratas algodóneras, se preparan experimentos para comparar animales pretratados con Synagis y D25 antes de la exposición con el virus VSR-X en el NVI (Bilthoven, Países Bajos).

5

EJEMPLO 4

Además de B63-D10-D25, se aislaron tres nuevos anticuerpos neutralizantes de VSR potentes (AM14, AM16 y AM23) del mismo donante (B63). Se descongelaron 100 células por pocillo de cultivos de linfocitos B a granel que se seleccionaron originalmente para neutralización de VSR y se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido, y se ensayó el sobrenadante de cultivo con respecto a unión con células HEp2 infectadas por VSR. Se ensayó con respecto a unión con células Hep2 infectadas ya que ese es un marcador para reconocimiento de anticuerpos de proteínas de membrana de VSR nativas, oligoméricas, como proteína F y G y puede actuar como un buen predictor de neutralización. Cuando se detectó unión, las células se cultivaron en células individuales y se exploraron con respecto a unión para obtener clones. Los tres anticuerpos se clonaron en el vector de GENEART que se construyó originalmente para D25. Además como D25 todos reconocen la proteína F de VSR (no mostrado). Después de clonación y expresión en células 293T se purificó proteína recombinante (las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se representan en la figura 14A, B y C). Los anticuerpos se ensayaron con respecto a neutralización frente a varios aislados de VSR primarios en células Vero y Hep2 (Figura 15). Los tres anticuerpos son del isotipo IgG1. AM14 tiene una cadena ligera Kappa, mientras que AM16 y AM23 tienen una cadena ligera Lambda. Los tres anticuerpos, como D25, contienen hipermutaciones somáticas en sus dominios variables de anticuerpo lo que sugiere que han experimentado *in vivo* maduración de afinidad durante una reacción de centro germinal, un proceso que crea secuencias de anticuerpos únicas.

Los resultados se muestran en las Figuras 15-I y 15-II: ensayo de neutralización de virus RS con D25 derivado de sobrenadante de línea de linfocitos B purificada (sD25), D25 purificado recombinante (rD25), D25 con codones optimizados por GENEART recombinante (rD25 GA), AM14, AM16, AM23 (todos proteínas recombinantes purificadas) y Synagis. Se ensayó la neutralización por anticuerpos de virus en dos líneas celulares diferentes (Figura 15-I) Vero y (Figura 15-II) células Hep2 con diferentes anticuerpos: A2 (A), X (B) y 2006/1 (C) son VSR de subtipo A mientras que el virus Z (D) y 2007-2 (E) son subtipo B. Se añadió 100DICT₅₀ de cada virus a diluciones de anticuerpos en serie en DMEM/FCS 1 % y se incubó durante 1 hora a 37 grados antes de añadirse 100 µl de células Vero o Hep2 (1x10⁶/ml). La mezcla de anticuerpos del virus no se retiró por lavado. Después de tres días se retiró el sobrenadante y las células se fijaron con acetona al 80 % durante 10 minutos a TA. Después de la retirada de la acetona, la capa celular fija se secó y se mantuvo a 4 °C o se congeló a -20 °C. Para teñir células HEp2 infectadas por VSR, las placas se bloquearon en primer lugar con leche en polvo al 5 % en PBS Tween 20 0,1 %, después las placas se lavaron 3 veces antes de incubarse durante 3-5 horas a 37 °C con anti-VSR-HRP de cabra policlonal (1:500, Biotess, Saco, ME, Estados Unidos) y se lavó exhaustivamente. Posteriormente todos los pocillos se incubaron con sustrato de AEC durante 30 minutos a TA. Los focos infectados se tiñen de rojo y pueden observarse a la vista usando un microscopio óptico y pueden contarse.

40

Resultado/conclusión

Todos los anticuerpos neutralizan las cepas de VSR A y B (Tabla 5). En general los diferentes anticuerpos D25 neutralizan los virus VSR eficazmente, aunque pueden verse variaciones entre experimentos menores. AM14 es tan potente como D25 mientras que AM16 es tan potente como Synagis. AM23 sin embargo neutraliza las cepas de VSR A de forma muy eficaz, mientras que es menos potente en la neutralización de cepas de VSR B, aunque aún es comparable con Synagis.

45

Tabla 5 Valores de CI50 (ng/ml)

Línea celular usada	Subtipo de VSR	sD25	rD25	rD25 GA	AM14	AM16	AM23
Vero	A	3,4	1,6	3,2	15,2	304,3	19,4
Vero	B	9,0	0,3	1,2	1,1	126,4	168,8
HEp2	A	3,3	2,1	5,3	21,5	285,6	25,0
HEp2	B	14,3	1,9	1,3	6,7	124,8	190,7

El valor de CI50 para cada anticuerpo en el virus de RS subtipo A en células Vero o HEp2 se calculó como el promedio de neutralización al 50 % en tres cepas de virus (A2, X y 2006-1). El valor de CI50 para cada anticuerpo en virus de RS de subtipo B en células Vero o HEp2 se calculó como el promedio de neutralización al 50 % en dos cepas de virus (2007-2 y Z). Cada uno de los ensayos de neutralización se realizó por triplicado y se repitió dos veces (también mostrado en la figura 15A y B).

sD25 = sobrenadante de cultivo derivado de linfocitos B purificado

rD25 = D25 recombinante purificado

rD25 GA = sobrenadante de células 293T con D25 recombinante con codones optimizados por GENEART

50

EJEMPLO 5

Efectos sinérgicos y de bloqueo de anticuerpos anti-VSR.

5 Para analizar si D25, Synagis o el nuevo conjunto de anticuerpos AM interfieren entre sí para el reconocimiento de la proteína F de VSR, se pre-incubaron células HEp2 infectadas por VSR con concentraciones crecientes de anticuerpos no marcados hasta que alcanzaron la meseta de unión máxima. Se determinó para cada anticuerpo la fase de meseta en la que no se detectó aumento de la unión cuando se aumentó la cantidad de Ig (no mostrado). Después de lavar, las muestras se incubaron con una dosis convencional (3 pmol) de D25 marcado con PE o Synagis marcado con APC. Esta dosis proporciona también unión máxima.

Resultado

15 Como se muestra en la Figura 16 Synagis y D25 marcado muestran una unión reducida con células HEp2 infectadas por VSR, cuando estas células se pre-incubaron con Synagis o D25 no marcado. Synagis muestra además una ligera reducción de la unión inducida por AM16. La unión de D25 está bloqueada fuertemente por AM23 pero por el contrario la unión de D25 está fuertemente potenciada después de pre-incubación con AM14. Eso indica que el epítipo reconocido por D25 normalmente no está siquiera completamente expuesto sino que la exposición se potencia después de la unión de AM14 con su epítipo nativo. Eso demuestra que estos dos anticuerpos pueden trabajar juntos y potenciar la neutralización.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1.

25 Aislamiento de linfocitos B de memoria, humanos, positivos para IgG. Se incubaron PBMC aisladas de capa leucocítica usando separación de densidad de Ficoll (Amersham) con perlas magnéticas anti-CD22 antes de aislarse usando columnas MACS (Miltenyi). Se incubaron después células positivas para CD22 con anticuerpos contra CD19, CD27, IgM, IgD e IgA humanos (BD). Se clasificaron células negativas para IgM, IgD e IgA y positivas para CD19 y CD27 usando clasificación de células individuales de alta velocidad (FACS Aria, BD).

Figura 2

35 Tinción con CFSE. Se aislaron linfocitos B de memoria humanos nuevos, se marcaron con CFSE y se estimularon durante 36 h con IL-21 antes de transducirse con Bcl-6-IRES-NGFR. Las células se mantuvieron durante 3 días adicionales en IL-21 antes de determinarse el contenido de CFSE. El colorante de CFSE se diluye con cada división celular.

Figura 3

40 Un ejemplo de linfocitos B humanos transducidos con Bcl-6 y Bcl-XL o Bcl-XL solamente. Las células se mantuvieron con células L irradiadas que expresaban CD40L y la citocina IL-21. Se muestra a la izquierda la expresión de BCR como se determina por tinción kappa y lambda (93 % de las células positivas para kappa lambda son del isotipo IgG, no mostrado). A la derecha se muestra la expresión de CD38 en los ejes X y la expresión de CD20 en los ejes Y. La tinción de CD38^{duj}CD20⁺ indica linfocitos B de centro germinal o de memoria; la tinción CD38⁺CD20⁻ indica plasmablastos.

Figura 4

45 Aislamiento de linfocitos B humanos inmortalizados, específicos de antígeno. Se aislaron linfocitos B de memoria humanos como se describe en la figura 1 y se transdujeron posteriormente con Bcl-6-IRES-NGFR y Bcl-XL-IRES-GFP. Se aislaron células que expresaban NGFR, GFP y se unieron con Toxina del Tétanos marcada con PE usando el FACS Aria. Las células se cultivaron por células individuales en placas de fondo plano de 96 pocillos en presencia de células L irradiadas e IL-21 antes de seleccionarse basándose en unión de TT-PE usando el FACS Canto (BD).

Figura 5

55 Velocidad de crecimiento y división celular acumulativa de clones de linfocitos B 6XL. Se cultivaron linfocitos B de (A) dos clones anti-TT (B) y un clon anti-VSR (B63D10-D25) en presencia de IL-21 y células L irradiadas.

Figura 6

60 Se iniciaron cultivos nuevos con 200.000 células/24 pocillos en 1,0 ml de IMDM con FCS 8 % y pen/strep. El FCS usado fue normal (HyClone) o FCS IgG Bovino Ultrabajo (Gibco). Después de 3 días el sobrenadante de cultivo se reemplazó y los números de células se ajustaron a 200.000 células/ml. Se muestra el promedio de producción de IgG en 3 días medido en 3 puntos temporales consecutivos. La diferencia no fue significativa (p valor 0,2).

Figura 7

Para determinar el fenotipo de cadena ligera del clon D25 anti-VSR, se tiñó la línea de linfocitos B D25 con anticuerpos de kappa-ficoeritrina o lambda-ficoeritrina (BD). Solamente los anticuerpos de kappa-ficoeritrina se unieron con la línea celular, lo que muestra que este anticuerpo tiene una cadena ligera kappa.

Figura 8

A partir del donante B63, se cultivaron cultivos de 100 células/pocillo usando linfocitos B de memoria humanos positivos para Bcl-6 Bcl-XL. Uno de esos cultivos, D10 mostró fuerte neutralización. Se prepararon líneas celulares monoclonales derivadas de LD, un D25 neutralizó el virus VSR A-2 eficazmente. Se muestra aquí D25 en comparación con palivizumab (synagis) y anti-VSR policlonal de cabra. No se muestran sobrenadantes de cultivo relevantes de clones de linfocitos B transducidos con Bcl6 Bcl-XL cultivados con IL-21 y señalización de CD40L que producen altos niveles de anticuerpos pero no bloquean la infección por VSR. El clon D25 se usó para caracterización adicional.

Figura 9

En la figura 9a: se sembraron células HEp2 a $10-12 \times 10^6$ células por matraz T175 (Nunc) en IMDM/FCS al 5%. Al día siguiente el medio se reemplazó con 5 ml de medio con virus VSR (1,0 MOI) y se incubó durante 45 minutos a TA antes de añadir 20 ml de medio nuevo y las células se cultivaron durante una noche a 37 °C. Al día siguiente el medio se reemplazó con IMDM/FCS al 1% y se cultivó durante una noche con una tapa cerrada a 37 °C. Al día siguiente las células se lavaron con PBS y se trataron con tripsina. Para teñir células infectadas se realizó la incubación primaria con sobrenadante de cultivo. La incubación secundaria se realizó con IgG-PE anti-humano (BD). Las células se analizaron usando el LSR II (BD). Como control positivo se usó el control positivo del KIT de ELISA comercial de r-Biopharm.

En la figura 9b: se infectaron células EL-4 con virus VSV pseudotipado con proteína F o G de VSR (amablemente proporcionada por John Rose) y se incubó con sobrenadante de cultivo D25. Las células se lavaron y se incubaron con IgG-PE anti-humano (Jackson) para detectar la unión de D25 con las células infectadas. Solamente se detectó unión de D25 con las células infectadas por el virus VSV pseudotipadas con la proteína F de VSR. La figura 9c muestra la unión de Palivizumab (Synagis) y D25 de una manera dependiente de la concentración con células HEp2 infectadas. Se muestra la intensidad de fluorescencia media (IFM).

Figura 10

Unión de anti-VSR de cabra policlonal (control positivo), palivizumab (synagis) y D25 con lisado de células HEp2 infectadas recubiertas.

Figura 11

Análisis de secuencia del clon D25. 11a muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos predicha de los dominios de cadena pesada y ligera variables. 11b/c muestran la secuencia de cadena pesada y ligera de D25 en comparación con la línea germinal predicha. Los asteriscos indican mutaciones que se producen probablemente durante la selección y maduración de afinidad del clon de linfocitos B *in vivo*.

Figura 12

Clonación y expresión de anticuerpos humanos recombinantes de líneas de linfocitos B transducidas con BCL6 BCL-XL. Esto ya se ha descrito para el anticuerpo D25 (Figura 11). Se representan aquí las modificaciones de nucleótidos de GENEART en comparación con la secuencia de D25 original, obsérvese que estas mutaciones no cambian la composición de aminoácidos del anticuerpo D25.

Figura 13

Exposición de ratones BALB/c con D25 y Synagis derivados de sobrenadante de linfocitos B, purificados. (A) Un día antes de la exposición a VSR (1×10^7 partículas de VSR-A2) por pulverización nasal, se inyectó IP a los animales diferentes cantidades de Synagis (MedImmune), D25 purificado o un anticuerpo de control IgG1 (Eureka) (tabla 3). (B) los niveles de IgG humanos se determinaron en sueros de ratones desde el día 5 y el descenso en los niveles del anticuerpo en suero en 5 días (C); la tabla 4 muestra una visión de conjunto de los valores de semivida. La figura 13D representa títulos de virus hallados en lavados pulmonares (BAL) el día 5 en animales tratados y no tratados mientras que la figura 13E representa los números de linfocitos T y B en sangre periférica de ratones tratados y no tratados. (F) muestra la histología de los pulmones con bronquios e infiltración de (normalmente principalmente eosinófilos) animales tratados y no tratados.

Figura 14

Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de tres nuevos anticuerpos neutralizantes de VSR potentes (A) AM14, (B) AM16 y (C) AM23.

Figura 15

Ensayo de neutralización de virus de SR con D25 derivado de sobrenadante de línea de linfocitos B purificado (D25), D25 purificado recombinante (rD25), D25 con codones optimizados por GENEART recombinante (rD25 GA), AM14, AM16, AM23 (todos proteínas purificadas recombinantes) y Synagis. Se ensayó la neutralización de anticuerpos de virus en dos líneas celulares diferentes (figura 15-I) Vero y (figura 15-II) células HEp2 con diferentes anticuerpos A2 (A), X (B) y 2006/1 (C) son VSR de subtipo A mientras que el virus Z (D) 2007-2 (E) son

subtipo B. Se añadió 100DICT50 de cada virus a diluciones de anticuerpos en serie en DMEM/FCS al 1 % y se incubaron durante 1 hora a 37 grados antes de añadirse 100 µl de células Vero o HEp2 (1×10^6 /ml).

Figura 16

5 Unión relativa de una cantidad fija (3 pmol) de Synagis marcado con APC y rD25 marcado con PE a células HEp2 infectadas por VSR que se pre-incubaron con concentraciones crecientes de los anticuerpos no marcados indicados.

10 Referencias

10 Banchereau, J., de Paoli, P., Valle, A., Garcia, E., Rousset, F., (1991). Long term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40, *Science* 251, 70-2.

15 Boise, L. H., M. Gonzalez-Garcia, C. E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L. A. Turka, X. Mao, G. Nunez, y C. B. Thompson. (1993). Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74:597.

20 Dadgostar, H., Zarnegar, B., Hoffmann, A., Qin, X. F., Truong, U., Rao, G., Baltimore, D., y Cheng, G. (2002). Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 99, 1497-1502.

Heemskerk *et al*, 1997: *J.Exp.Med.* Vol 186, páginas 1597-1602

25 Heemskerk *et al*, 1999: *Cell Immunol.* Vol 195, páginas 10-17

Kinsella y Nolan, 1996: *Hum. Gene Ther.* Vol 7 páginas 1405-1413

30 Malisan, F., Briere, F., Bridon, J.M., Harindranath, N., Mills, F. C., Max, E. E., Banchereau, J., Martinez-Valdez, H. (1996). Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naïve B lymphocytes, *J.Exp.Med.* 183, 937-47.

35 Mathas S, Janz M, Hummel F, Hummel M, Wollert-Wulf B, Lusatis S, Anagnostopoulos I, Lietz A, Sigvardsson M, Jundt F, Johrens K, Bommert K, Stein H, Dorken B (2006). Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol.* 7, 207-215.

Mejias A *et al.*, *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 2004; p1811, Johnson S *et al.*, *JID* 1997; p1215 Wu H *et al.*, *JMB* 2007: p652

40 Shvarts A. *et al*, 2002: *Genes Dev.* Vol 16, páginas 681-686

45 Traggiai, E., Becker, S., Subbarao, K., Kolesnikova, L., Uematsu, Y., Gismondo, M.R., Murphy, B.R., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A. (2004). An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nature Medicine* Volume 10, n.º 8, 871-875.

Ye, B. H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R. S., *et al.* (1997). The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* 16, 161-170.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o parte funcional del mismo que es capaz de unirse específicamente con el antígeno F del virus sincitial respiratorio (VSR), y en el que el anticuerpo o parte funcional del mismo comprende:

- 5
- a. una región determinante de complementariedad (CDR) 1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos NYIIN (SEQ ID NO: 1), una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GIIPVLGTVHYAPKFQG (SEQ ID NO: 2), una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ETALVVSTTYLPHYFDN (SEQ ID NO: 3), una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QASQDIVNYLN (SEQ ID NO: 4), una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos VASNLET (SEQ ID NO: 5), y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QQYDNLPL (SEQ ID NO: 6); o
- 10
- b. una CDR 1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GFSFSHYA (SEQ ID NO: 73), una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ISYDGENT (SEQ ID NO: 74), una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ARDRIVDDYYYYGMDV (SEQ ID NO: 75), una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QDIKKY (SEQ ID NO: 76), una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos DAS y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QQYDNLPLPLT (SEQ ID NO: 77); o
- 15
- c. una CDR 1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYN (SEQ ID NO: 80), una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ISAGSSYI (SEQ ID NO: 81), una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos AREDYGPNGYSPNWFDP (SEQ ID NO: 82), una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SSNIGAGYD (SEQ ID NO: 83), una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos GNT y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos HSYDRSLSG (SEQ ID NO: 84); o
- 20
- d. una CDR 1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GFNFHNYG (SEQ ID NO: 87), una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos VWYDGSKK (SEQ ID NO: 88), una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos VRDKVGPTPYFDS (SEQ ID NO: 89), una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos NIGSET (SEQ ID NO: 90), una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos DDD, y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QVWDRSNYHQV (SEQ ID NO: 91).
- 25
- 30

2. El anticuerpo o parte funcional del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos QVQLVQSGAEVKKPGSSVMVSCQASGGPLRNIIINWLRQAPGGQPEWMMGGIIPVLG TVHYAPKFQGRVTITADESTDTAYIHLISLRSEDAMYYCATETA LVVSTTYLPHYFDN WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 7) y/o una secuencia de cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSAAVGDRTITCQASQDIVNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYVASNLETG VPSRFSGSGSGTDFSLTISLQPEDVATYYCQQYDNLPLTFGGGT KVEIKRTV (SEQ ID NO: 8).

35

3. El anticuerpo o parte funcional del mismo de la reivindicación 1, en el que la parte funcional del mismo es un anticuerpo de un único dominio, un anticuerpo monocatenario, un fragmento variable monocatenario (scFv), un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂.

40

4. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o parte funcional del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

45

5. La secuencia de ácido nucleico aislada de la reivindicación 4, en la que la secuencia de ácido nucleico comprende secuencias de nucleótidos de cadena pesada y ligera seleccionadas del grupo que consiste en:

50

- (i) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10;
 (ii) SEQ ID NO: 139 y SEQ ID NO: 141; y
 (iii) SEQ ID NO: 140 y SEQ ID NO: 142.

6. Una célula que expresa la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 4 o 5.

55

7. Un método para producir un anticuerpo o una parte funcional del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo los métodos cultivar en la célula de la reivindicación 6 *in vitro*, y obtener anticuerpos o partes funcionales de los mismos producidos por las células.

60

8. Una composición que comprende el anticuerpo o parte funcional de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

65

9. El anticuerpo o una parte funcional de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición de la reivindicación 8, o la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 4 o 5 para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno relacionado con VSR, o para prevenir o contrarrestar los efectos adversos de una infección por VSR en un sujeto humano.

10. Uso del anticuerpo o una parte funcional de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición de la reivindicación 8, o la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 4 o 5 en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir un trastorno relacionado con VSR, o prevenir o contrarrestar los efectos adversos de una infección por VSR en un sujeto humano.

5 11. El anticuerpo o una parte funcional, composición o la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 9 para uso de la reivindicación 9, o el uso de la reivindicación 10, en el que el sujeto humano tiene una enfermedad pulmonar crónica, enfermedad cardíaca congénita o inmunidad comprometida, o el sujeto humano es un niño de menos de 6 semanas de edad o un sujeto anciano, opcionalmente en el que el anticuerpo o parte funcional del mismo se formula
10 para la administración a una dosificación de 0,1 a 10 mg/kg del peso corporal del sujeto humano.

Figura 1

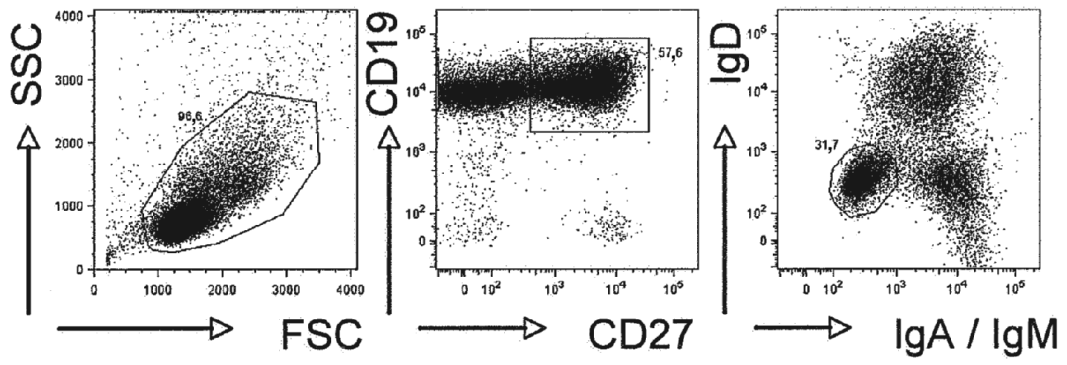
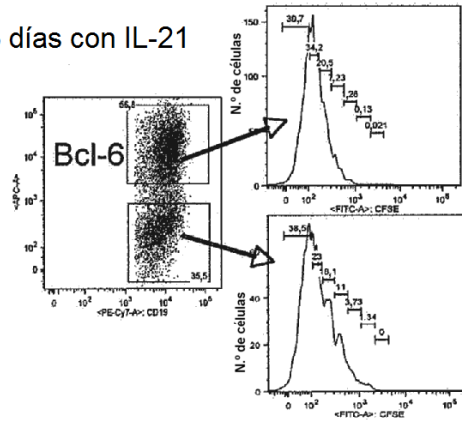


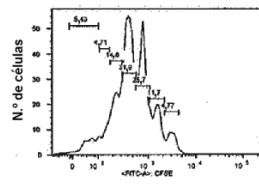
Figura 2

aislamiento - 36 h IL-21-
transducido con Bcl6

3 días con IL-21



Control: sin IL-21, sin
transducción
Solamente células L



3 días con IL-4

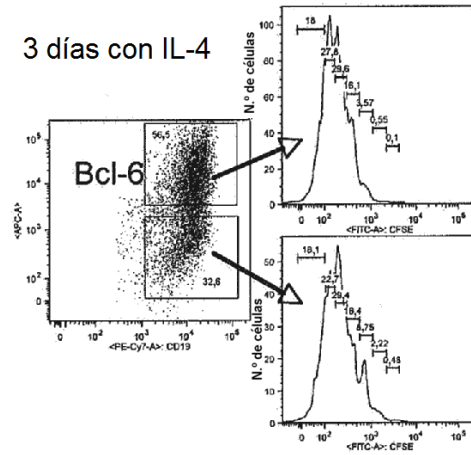


Figura 3

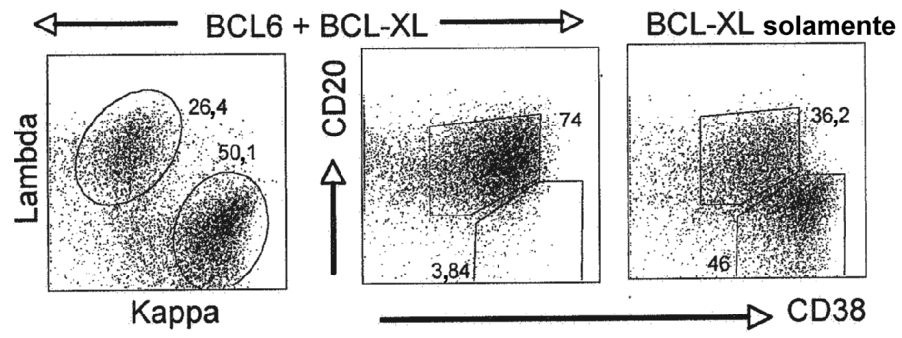


Figura 4

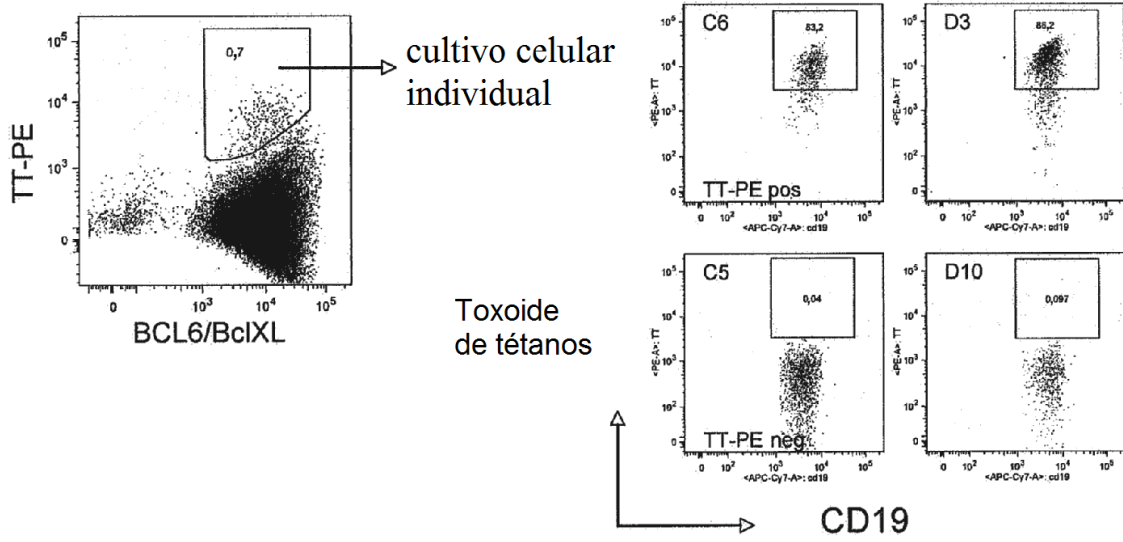


Figura 5

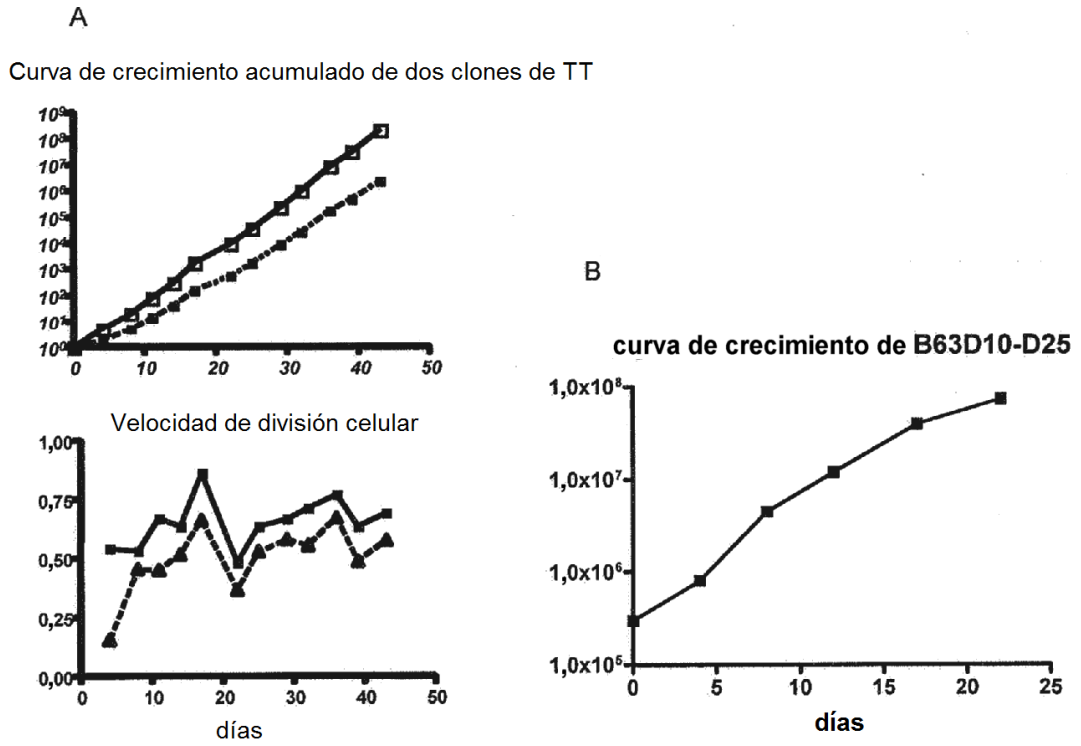


Figura 6

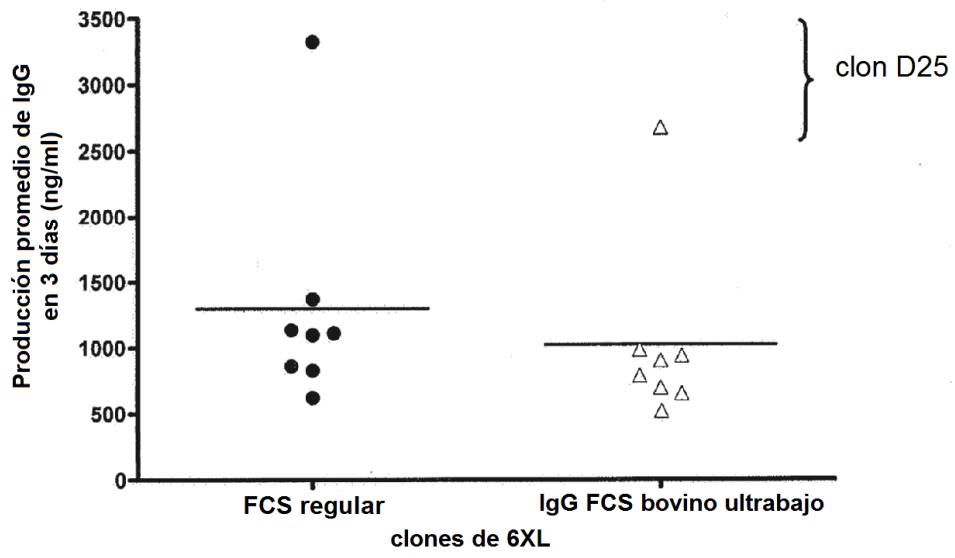


Figura 7

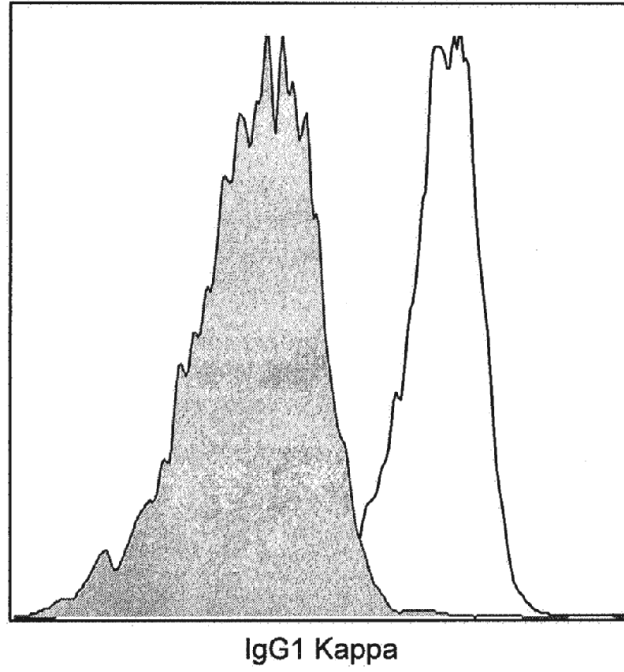


Figura 8

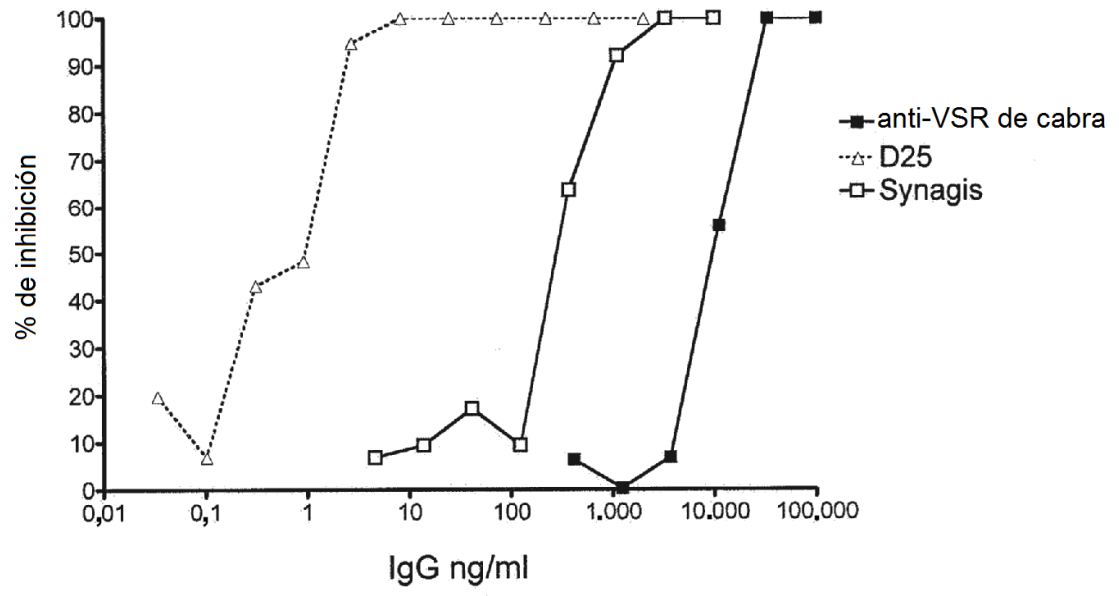


Figura 9

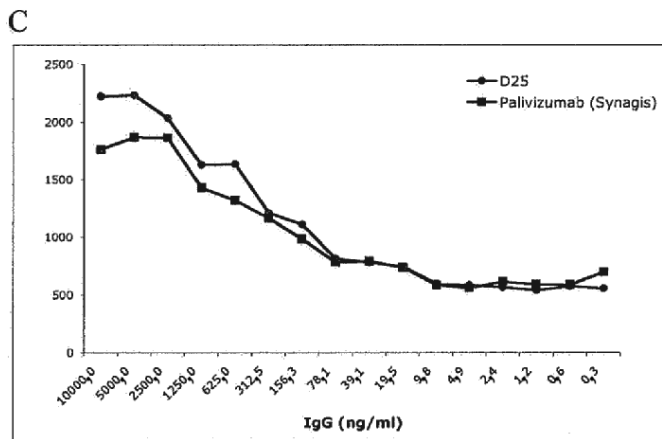
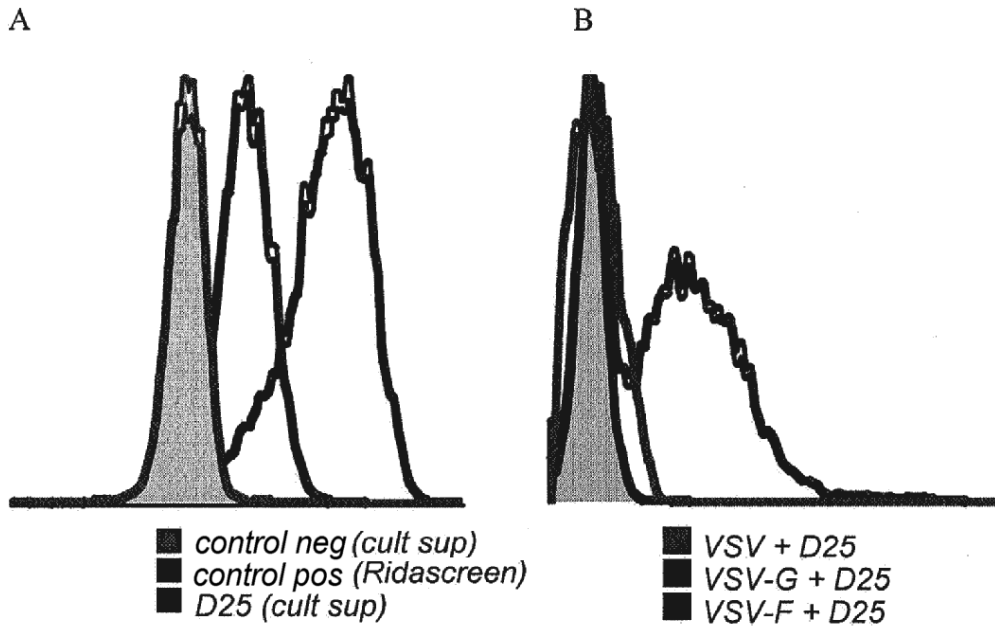


Figura 10

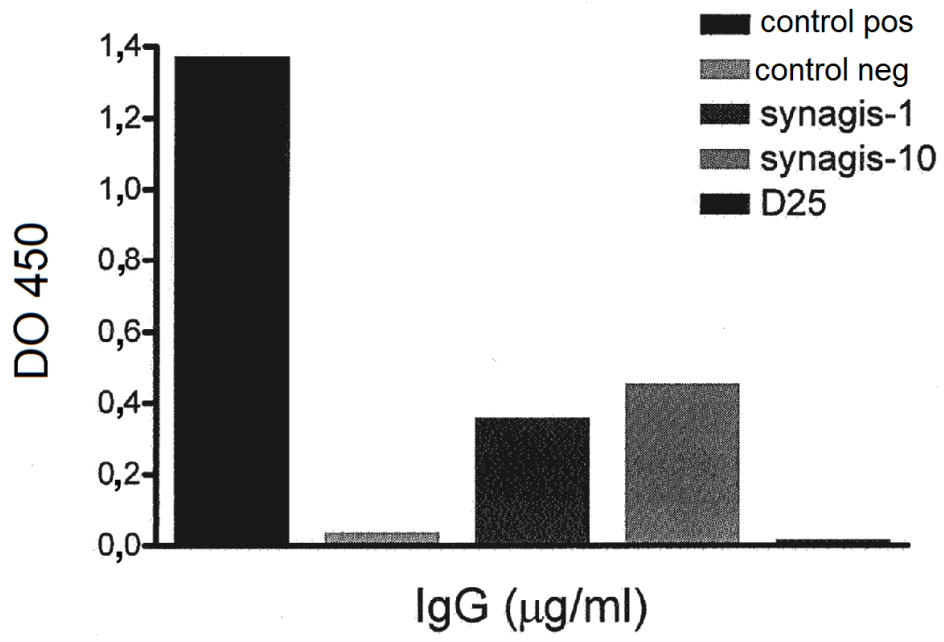


Figura 11A

Clon anti-VSR B63D10-D25

Región VH de secuencia de nucleótidos (segmentos V-D-J)

CAGGTGCAGCTGGTACAGTCTGGGGTGAAGTGAAGAGCCTGGTCCCTCGGTGATGGTCTCCTGCCAGGCCTCTGGAGGCCCTCAGAAACTAT
 ATTATCAACTGGCTACGACAGGCCCTGGACAAGCCCTGAGTGGATGGAGGGATCATTCCTGTCTTGGGTACAGTACACTACGCCACCGAAGTTC
 CAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACAGACACAGCCCTACATCCATCTGATCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGT
 GCGACGGAACAGCTCTGGTTGTATCTACTACCTACCCACTACTTTGACAACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCCGTCTCCCTCAG

Región VH de secuencia de aminoácidos (segmentos V-D-J)

QVQLVQSGAEVKKPQSSVMVSCQASGGPLRNYIINWLRQAPGQGPWMGGIIPVLGTFVHYAPKFFQGRVTITADESTDTAYIHLISLRSSEDTAMYIC
 AETALVVSITTYLPHYFDNWGQGLVTVSS

Región VL de secuencia de nucleótidos (segmentos V-J)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTGCAGCTGTAGGAGACAGATCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATGTCAACTAT
 TTAAATTGGTATCAACAGAAAACCCAGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTACGTTGCATCCAAATTTGGAGACAGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGGA
 AGTGGATCTGGGACAGATTTTAGTCTCACCATCAGCAGCCTGACGCTGAAAGATGTTGCAACATATTAATGTCAACAATATGATAAATCTCCCACCTC
 ACATTCGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAAAGA

Región VL de secuencia de aminoácidos (segmentos V-J)

DIQMTQSPSSLSAAVGDRTVITCQASQDIVNYLNWYQKPKAPKLLIYVANSLETGVPSRFSGSGSDTDFSLTIISSIQPEDVATYYCQQYDNLPL
 TFGGGTKVEIKR

Figura 11B

secuencia de cadena pesada del clon B63D10-D25 en comparación con la línea germinal

```

-----Fr1-----[-CDR1-]-----Fr2-----[-CDR2-----]-----Fr3-----[-CDR3-----]-----Fr4-----
VH1-69 Igem.   QVQLVQSGAEVKKPKGSSVSKASGTFE SYAIS WVRQAPGGQLEWNG GIIPIFGTANYAQKFG RVTITADESTSTAYMELSSLRASEDTAVYYCAR
n.º 7. B63D10-D25 QVQLVQSGAEVKKPKGSSVMVSCAAGPLR NYIIN WLROAPGGQPEWNG GIIPVLGTVHYAPKFG RVTITADESTDTAYIHLISLRASEDTAMYICAT ETALVSVSTYILPHYFDN WGQGLTVTVSS

```

Resultados del análisis de IMGT/unión:

http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest

- El nombre de V es IGHV1-69*01
- El nombre de D es IGHD5-5*01
- El nombre de J es IGJ4*02

Figura 11C

secuencia de cadena ligera del clon B63D10-D25 en comparación con la línea germinal

```

-----Fr1-----[-CDR1-]-----Fr2-----[-CDR2-]-----Fr3-----[-CDR3-]-----Fr4-----
VKI 08/O18   DIQMTQSPSSLSASVGRVITTC QASQDISNYEN WYQOKPKGKAPKLLIY DASNLET GVPSRFRSGSGGDTFTISSLQPEDVATYYC QQYDNLNLP
n.º 7. B63D10-D25 DIQMTQSPSSLSAAVGRVITTC QASQDIVNYEN WYQOKPKGKAPKLLIY VASNLET GVPSRFRSGSGGDTFSLTISLQPEDVATYYC QQYDNLNLP LTFGGGPKVEIKRVTY

```

Resultados del análisis de IMGT/unión:

http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest

- El nombre de V es IGKV 1-33*01
- El nombre de J es IGKJ4*01

Figura 12

Optimización de codones de región VH:

RSV#D25-IGVH1-69	1	50
RSV#D25-VH Optimizado	CAGGTGCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTC	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAG
RSV#D25-IGVH1-69	51	100
RSV#D25-VH Optimizado	GGTGATGGTCTCCTGCCAGGCCTCTGGAGGCCCCCTCAGAACTATATTA	CGTGATGGTGTCTCCTGCCAGGCCAGCGCGGACCCCTGCCGAACTACATCA
RSV#D25-IGVH1-69	101	150
RSV#D25-VH Optimizado	TCAACTGGCTACGACAGGCCCTGGACAAGGCCCTGAGTGGATGGGAGGG	TCAACTGGCTGCGGCAGGCCCCAGGCCAGGGCCCTGAGTGGATGGGCGGC
RSV#D25-IGVH1-69	151	200
RSV#D25-VH Optimizado	ATCATTCCCTGTCTTGGGTACAGTACACTACGCACCGAAGTTCCAGGGCAG	ATCATCCCCGTGCTGGGCACCGTGCCTACGCCCAAGTTCCAGGGCCG
RSV#D25-IGVH1-69	201	250
RSV#D25-VH Optimizado	AGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGGACACAGCCTACATCCATCTGA	GGTGACCATCACCGCCGACGAGAGCACCGACCCGCTACATCCACCTGA
RSV#D25-IGVH1-69	251	300
RSV#D25-VH Optimizado	TCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCGACGGAAACA	TCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCGCCACCGAGACC
RSV#D25-IGVH1-69	301	350
RSV#D25-VH Optimizado	GCTCTGGTTGTATCTACTACCTACCTACCACACTACTTTGACAACCTGGGG	GCCCTGGTGGTGTCCACCACCTACCTGCCCACTACTTCGACAACCTGGGG
RSV#D25-IGVH1-69	351	378
RSV#D25-VH Optimizado	CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	CCAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCGAGT

Optimización de codones de región VL:

RSV#D25-IGKV1-33	1	50
RSV#D25-VL Optimizado	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCAGCTGTAGGAGA	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCGCCGTGGGGCA
RSV#D25-IGKV1-33	51	100
RSV#D25-VL Optimizado	CAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTGTCAACTATTTAA	CCGGGTGACCATCACCTGCCAGGCCAGCCAGGACATCGTGAACCTACCTGA
RSV#D25-IGKV1-33	101	150
RSV#D25-VL Optimizado	ATTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTACGTT	ACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGTT
RSV#D25-IGKV1-33	151	200
RSV#D25-VL Optimizado	GCATCCAATTTGGAGACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAAGTGGATC	GCCAGCAACCTGGAAACCGGCGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTC
RSV#D25-IGKV1-33	201	250
RSV#D25-VL Optimizado	TGGGACAGATTTTAGTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTG	CGGCACCGACTTCAGCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACGTGG
RSV#D25-IGKV1-33	251	300
RSV#D25-VL Optimizado	CAACATATTATTGTCAACAATATGATAATCTCCCACTCACATTCGGCGGA	CCACCTACTACTGCCAGCAGTACGACAACCTGCCCTGACCTTTGGCGGC
RSV#D25-IGKV1-33	301	326
RSV#D25-VL Optimizado	GGGACCAAGGTTGAGATCAAAGAAC	GGAACAAAGGTGGAGATCAAGCGGAC

Figura 13

Tabla 3		Figura 13A		
5 ratones p/g	5 ratones p/g	día	0	5
2 mg/kg	ctrl IgG1		↑	↑
	Synagis		↑	↑
	D25		↑	↑
1 mg/kg	D25		↑	↑
0,5 mg/kg	D25		↑	↑
			Ig virus	análisis

Figura 13B. . Se muestra la cantidad de IgG humano el día 5 en sangre periférica de animales expuestos a VSR (detectado por ELISA).

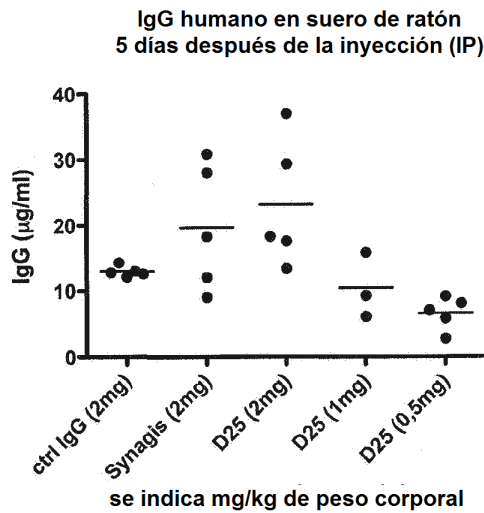


Figura 13C.

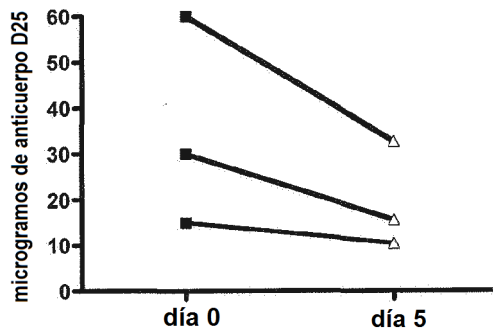


Figura 13D. Se muestra el título del virus derivado de lavados pulmonares (BAL) 5 días después de la exposición a VSR. El título de virus se determinó por ensayo de dilución de DICT50 convencional en células HEp2.

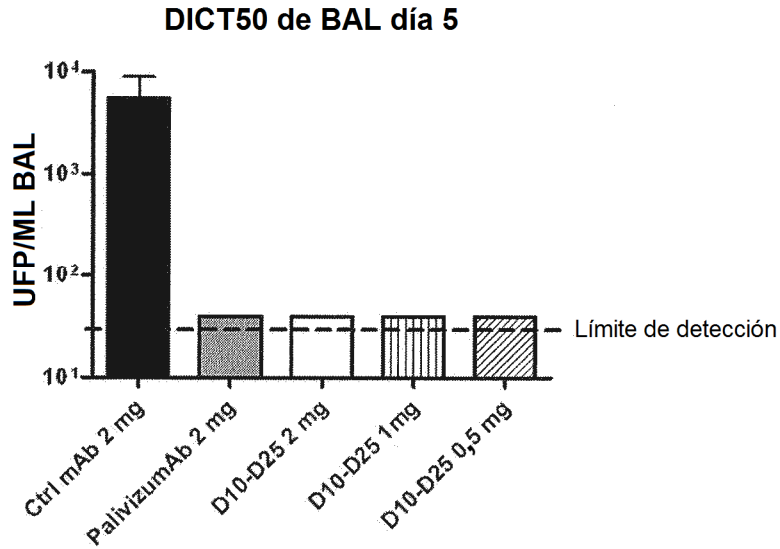


Figura 13E. Se muestra el porcentaje de linfocitos B (por tinción de B220) y linfocitos T en ratones expuestos a VSR y tratados con D25 o Synagis o anticuerpo de control.

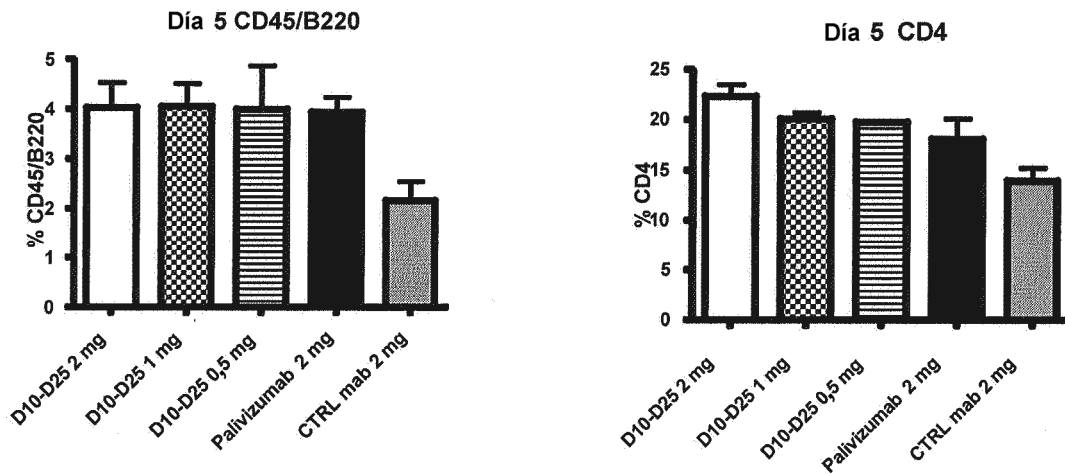
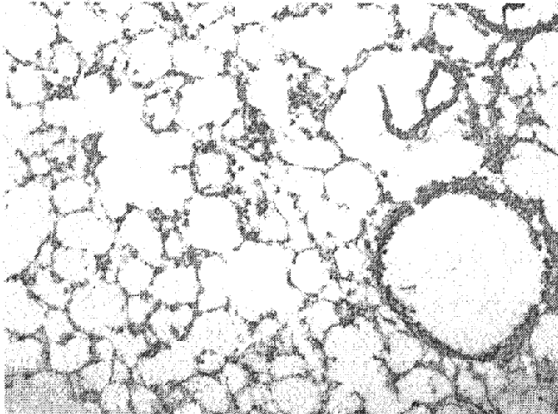


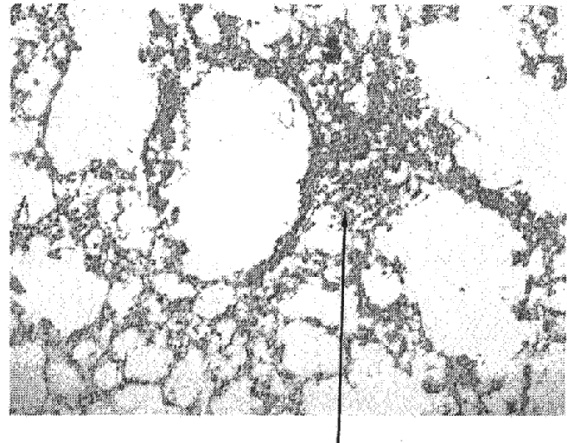
Figura 13F

Aumento 10X. La flecha indica infiltración celular en los pulmones, que se ve más alrededor de los bronquios. Hay otro conjunto de imágenes de histología tomadas de diferentes ratones tratados con Synagis o D25.

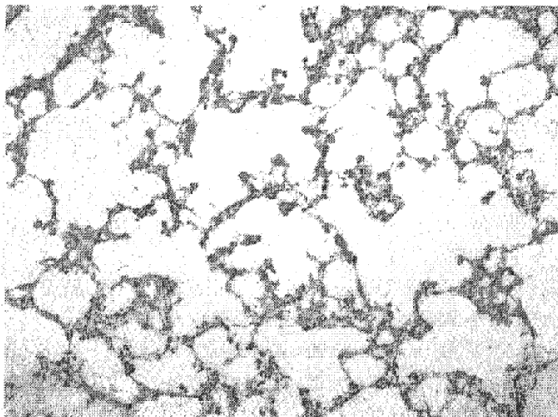
Simulación de infección



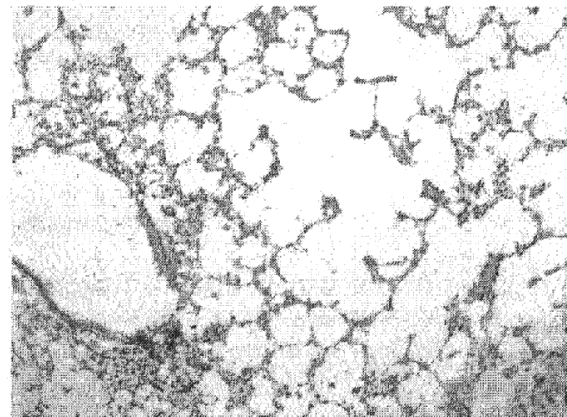
ctrl IgG



D10-D25

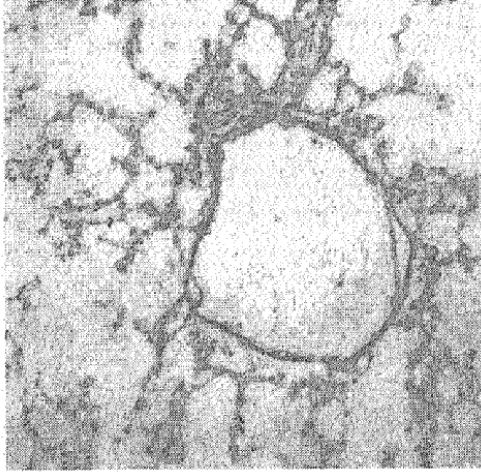


Synagis

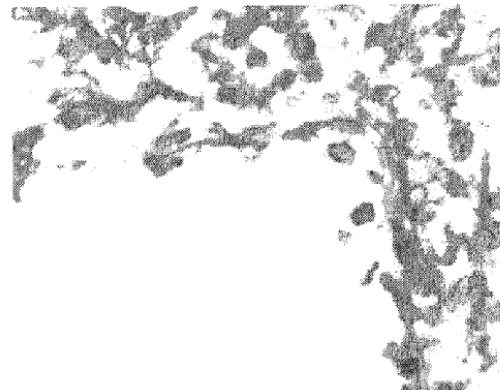
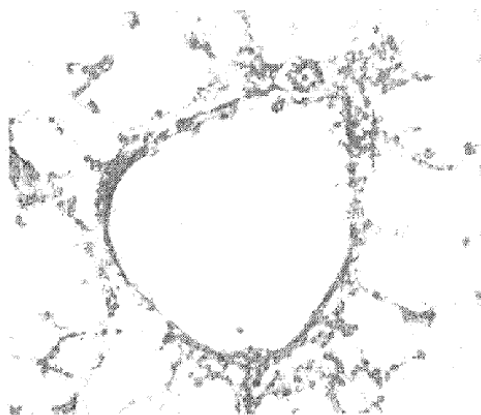
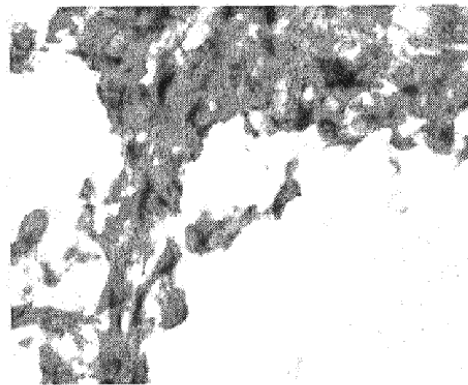
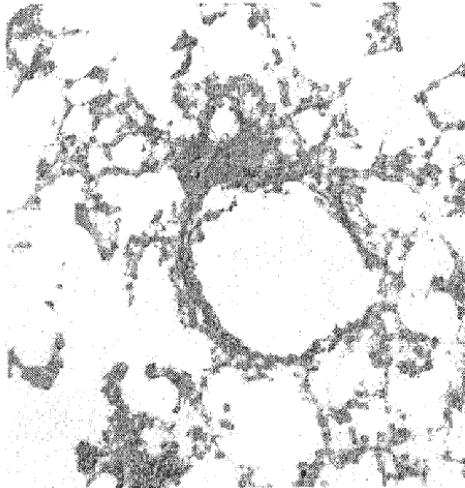
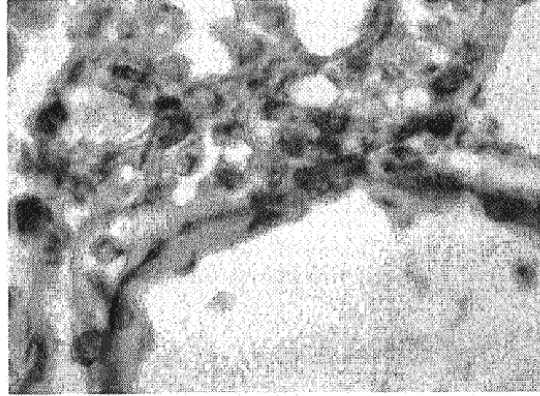


Muis 6 Synagis 2mg

10x



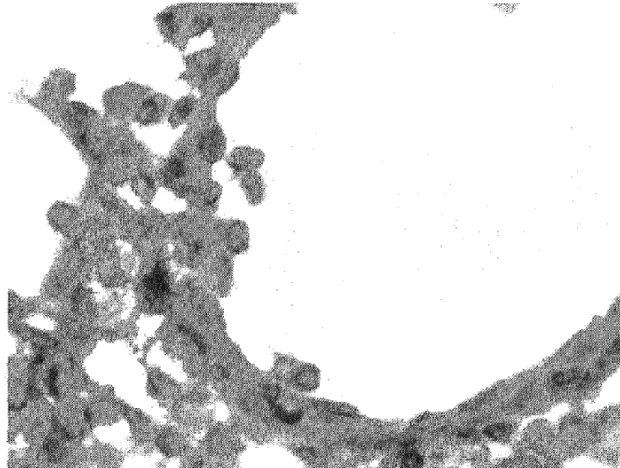
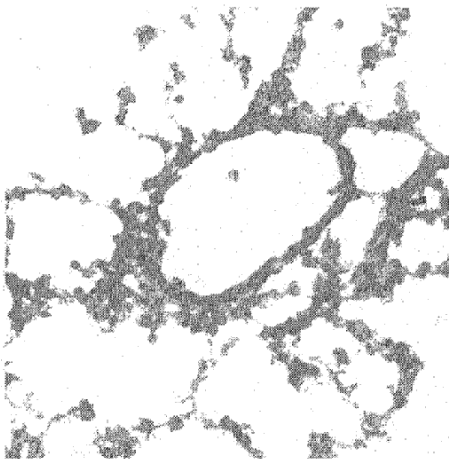
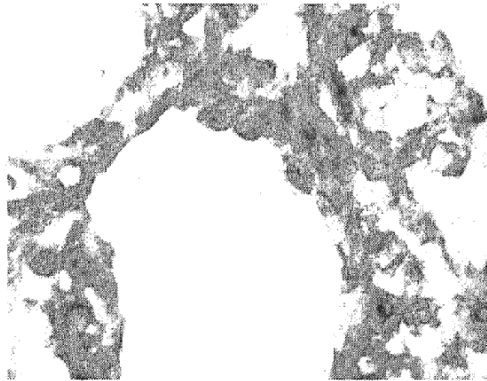
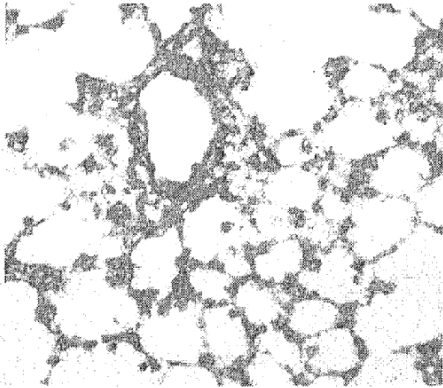
50x



Muis 9 Synagis 2mg

10x

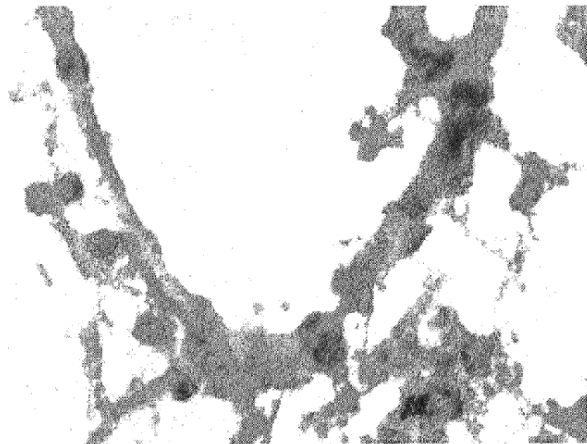
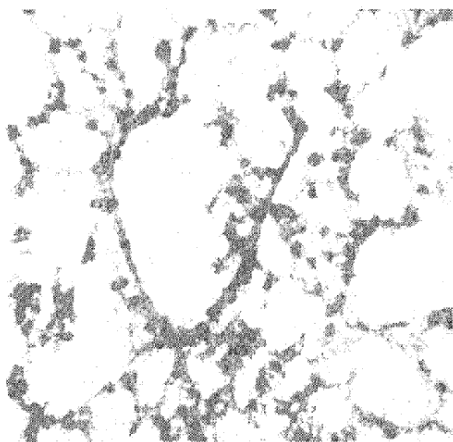
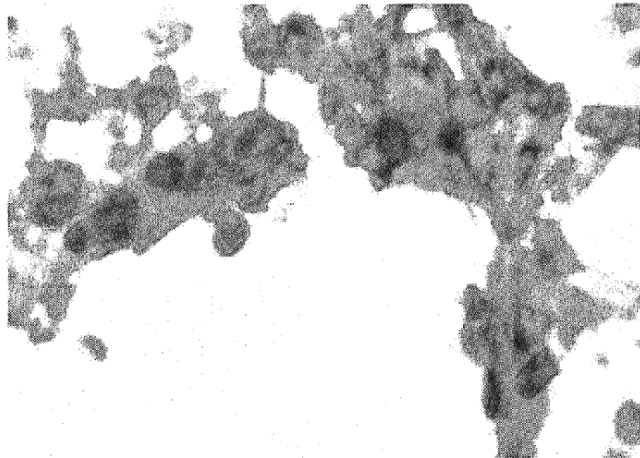
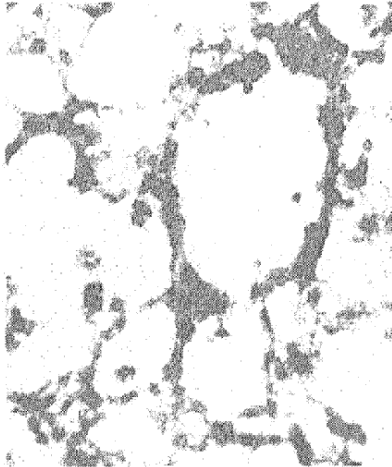
50x



Muis 1 D10-D25 2mg

10x

50x



Muis 14 D10-D25 2mg

10x

50x

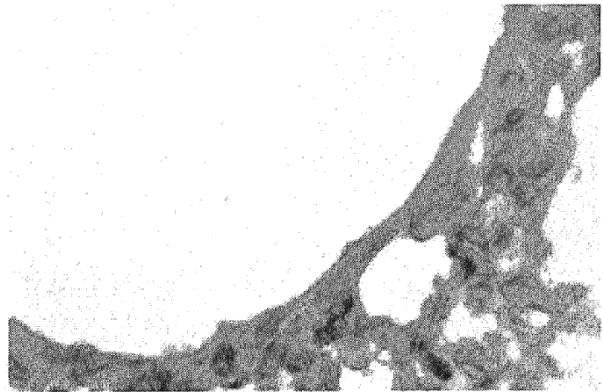
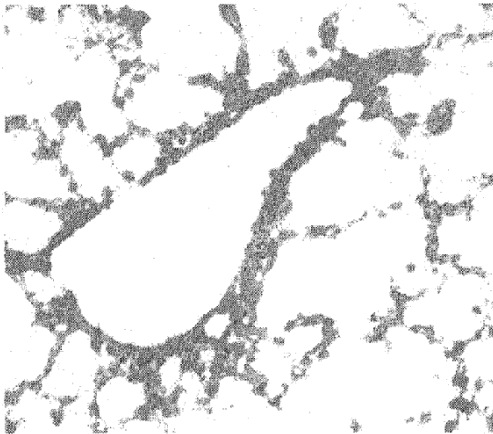
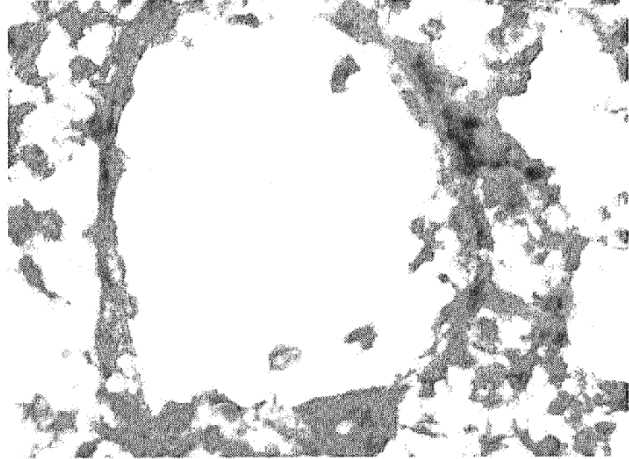
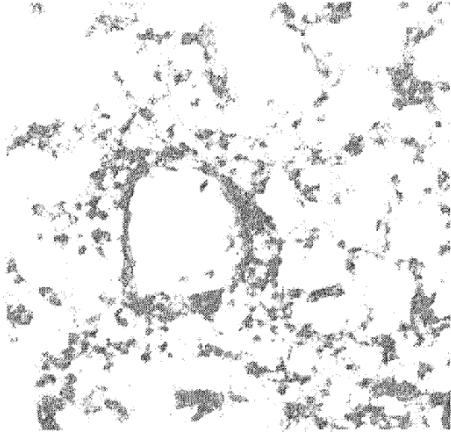


Figura 14A

clon anti-VSR AM14

Región VH de secuencia de nucleótidos AM14 (segmentos V-D-J)
 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGGGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCGGCCCTTGATTTCAGCTTCAGTCACTAT
 GCCATGCACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGACTGGAGTGGTGGCAGTTATATCTTATGATGGAGAAAATACATATTACGCAGACTCCGGTG
 AAGGCCGATTCTCCATCTCCAGAGACAATCCAAAGAACACAGTGTCTCTGCAAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTCTATATTACTGT
 GCGAGAGACCCGATAGTGGACCGACTACTACTACGGTATGGACGCTTGGGGCCCAAGGGCCACGGTCACCCGTCCTCCCTCA

Región VH de secuencia de aminoácidos AM14 (segmentos V-D-J)
 EVQLVESGGGVVQFGRSLRLSCLAAASGFSFHYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGENYYADSVKGRFSISRDNKNTVSLQMNSLRPEDTALYYC
 ARDRIVDDIYYYGMDVWQGATVTVSS

Región VL de secuencia de nucleótidos AM14 (segmentos V-J)
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCGAGTCAGGACATTAAGAAGTAT
 TTAATTTGGTATCATCAGAAAACCAAGGAAAGTCCCTGAGCTCCTGATGCCATCCAATTTGGAAAACAGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGC
 AGGGGATCTGGGACAGATTTTACTCTCACCATTAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGGAACAATTTACTGTCAACAGTATGATAATCTGCCCTCCG
 CTCACCTTCGGCGGAGGACCAAGGTGGAGATCAAAACGAACTGTG

Región VL de secuencia de aminoácidos AM14 (segmentos V-J)
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQDIKKYLNWYHQKPKGVPELLMHDASNLETGVPSRFSRGRSGTDFTLTISLQPEDIGTYQCQYDNLPP
 LTFGGGTKVEIKRTV

secuencia de cadena pesada del clon AM14 en comparación con la línea germinal

```

-----Fr1----- [-CDR1-] -----Fr2----- [-CDR2-] -----Fr3----- [-CDR3-] -----Fr4-----
IGHV3-30 lgerm. QVQLVESGGGVQPGKSLRLSCAAS GFTFSSYG MHWVROAPGKGLEWVAV ISYDGSNK YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYC AR
AM14 VH EVQLVESGGGVQPGKSLRLSCAAS GFSFSHYA MHWVROAPGKGLEWVAV ISYDGENT YADSVKGRFISRDNKNTVSLQMSLRPEDTALYYC ARDRIVDDYYYYGMDV WQQGATVTVSS
    
```

Resultados de los análisis de IMGT/unión:

http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest

gen V: IGHV3-30*04
 gen D: IGHD5-12*01
 gen J: IGHJ6*02

secuencia de cadena ligera del clon AM14 en comparación con la línea germinal

```

-----Fr1----- [CDR1] -----Fr2----- [CDR2] -----Fr3----- [-CDR3-] -----Fr4-----
IGKV1-33 lgerm. DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCOAS QDLSNY LNWYQQKPKGKAPKLLIY DAS NLETGVPSRFRSGSGGTDFTFTISSLPEDLATYYC QQYDNLPLLT
AM14 VL DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCOAS QDIKKY LNWYHQKPKGKVPPELLMH DAS NLETGVPSRFRSGSGGTDFTFTISSLPEDIGTYIC QQYDNLPLLT FGGGKVEIKRTV
    
```

Resultados de los análisis de IMGT/unión:

http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest

gen V: IGKV1-33*01
 gen J: IGKJ4*01

Figura 14A (continuación)

secuencias de CDR de AM14

secuencia de CDR1 de cadena pesada	GFSFSHYA
secuencia de CDR2 de cadena pesada	ISYDGENT
secuencia de CDR3 de cadena pesada	ARDRIVDDYYYYGMDV
secuencia de CDR1 de cadena ligera	QDIKKY
secuencia de CDR2 de cadena ligera	DAS
secuencia de CDR3 de cadena ligera	QQYDNLPLPLT

Secuencia de nucleótidos de región V pesada AM14 (segmentos V-D-J)

FR1 :
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTC
CTGTGCGGCTCT

CDR1 :
GGATTCAGCTTCAGTCACTATGCC

FR2 :
ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCAGTT

CDR2 :
ATATCTTATGATGGAGAAAATACA

FR3 :
TATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCTCCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACAGT
GTCTCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTCTATATTACTGT

CDR3 :
GCGAGAGACCCATAGTGGACGACTACTACTACTACGGTATGGACGTC

FR4 :
TGGGGCCAAGGGGCCACGGTCACCGTCTCCTCAG

Secuencia de nucleótidos de región V ligera AM14 (segmentos V-J)

FR1 :
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGCCAGGCGAGT

CDR1 :
CAGGACATTAAGAAGTAT

ES 2 575 129 T3

FR2 :

TTAAATTGGTATCATCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTGAGCTCCTGATGCAC

CDR2 :

GATGCATCC

FR3 :

AATTTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGGGGATCTGGGACAGATTTTACTCT
CACCATTAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGGAACATATTACTGT

CDR3 :

CAACAGTATGATAATCTGCCTCCGCTCACT

FR4 :

TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC

Figura 14B

clon anti-VSR AM16

Región VH de secuencia de nucleótidos AM16 (segmentos V-D-J)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGACCGGGGAGGCCTGGCCCAGCCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACATTCACTAGTTAT
AACATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCCACACATTAGTGGGGTAGTAGTTACATAATACTACTCAGACTCAGTG
AAGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGACAACGTCAGGAACTCAGTATACTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGCTGACACGGCTGTATTACTGT
GCCAGAGAGGATTATGGTCCCGGAAATTATTATAGTCTTAAGTCTTAAGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA

22

Región VH de secuencia de aminoácidos AM16 (segmentos V-D-J)

EVQLVETGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNNMNVRRQAPGKGLEWVSHISAGSSYIYSDSVKGRFTVSRDNRNSVYLQMNSLRAADTAVYYC
AREDYGPENYYSPNWFDPWGQGLVTVSS

Región VL de secuencia de nucleótidos AM16 (segmentos V-J)

CAGTCTGTCTGACCGCAGCCGCTCAGTGTCTGGGGCCAGGGCAGAGATCACCACTCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGCAGGT
TATGATGTACTGTTACCAGAGCTTCCAGGAACAGCCCAAACTCCTCATCTATGGCAACACTAATCGGCCCTCAGGGGTCTCCGACCATT
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCCTCCCTGGCCATCACTGGACTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTACTGCCACTCCTATGACAGAAGC
CTGAGTGGTTCAGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC

Región VL de secuencia de aminoácidos AM16 (segmentos V-J)

QSVVTQPPSVSGAFQQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQLPGTAPKLLIYGNTNRPVSGVSDRESGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCHSYDRS
LSGSVFGGGTKLTV

secuencia de cadena pesada del clon AM16 en comparación con la línea germinal

```

-----Fr1----- [-CDR1-] -----Fr2----- [-CDR2-] -----Fr3----- [-CDR3-] -----Fr4-----
IGHV3-21.lgerm.  EVQLVSGGGLVAPGGSLRLSCAAS  GFTFSSYS  MNWVRQAPGKLEWVSS  ISSSSSYI  YVADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYIC  AR
AM16 VH         *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
EVQLVETGGGLAQPGGSLRLSCAAS  GFTFSSYN  MNWVRQAPGKLEWVSH  ISAGSSYI  YYSDSVKGRFTVSRDNRVRSVYLQMNSLRAADTAVYIC  AREDYGPNYISPNWDFP  WCQGTILVTIVSS
  
```

Resultados del análisis de IMGT/unión:
http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest

- gen V: IGHV3-21*01
- gen D: IGHD3-10*01
- gen J: IGHJ5*02

secuencia de cadena ligera del clon AM16 en comparación con la línea germinal

```

-----Fr1----- [-CDR1-] -----Fr2----- [-CDR2-] -----Fr3----- [-CDR3-] -----Fr4-----
IGLV1-40.lgerm.  QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGS  SSNIGAGYD  VHWYQQLPGTAPKLLIY  GNS  NRPSGVDRFSGSKSGTASLAITGLQAEDEADYIC  QSYDSSLG
AM16 VL         *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGS  SSNIGAGYD  VHWYQQLPGTAPKLLIY  GNT  NRPSGVDRFSGSKSGTASLAITGLQAEDEADYIC  HSYDRSLSG  SVFSGGTKLIV
  
```

Resultados del análisis de IMGT/unión:
http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest

- gen V: IGLV1-40*02
- gen J: IGLJ2*01

Figura 14B (continuación)

secuencias de CDR de AM16

secuencia de CDR1 de cadena pesada	GFTFSSYN
secuencia de CDR2 de cadena pesada	ISAGSSYI
secuencia de CDR3 de cadena pesada	ARBDYGPGNYYSFNWFD
secuencia de CDR1 de cadena ligera	SSNIGAGYD
secuencia de CDR2 de cadena ligera	GNT
secuencia de CDR3 de cadena ligera	HSYDRSLSG

Secuencia de nucleótidos de región V pesada AM16 (segmentos V-D-J)

FR1 :
GAGGTGCAGCTGGTGGAGACCGGGGAGGCCTGGCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC
CTGTGCAGCCTCT

CDR1 :
GGATTCACATTCAGTAGTTATAAC .

FR2 :
ATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCACAC

CDR2 :
ATTAGTGCGGGTAGTAGTTACATA

FR3 :
TACTACTCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGACAACGTCAGGAACTCAGT
ATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGCTGACACGGCTGTGTATTACTGT

CDR3 :
GCGAGAGAGGATTATGGTCCGGGAAATTATTATAGTCCTAACTGGTTCGACCCC

FR4 :
TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

Secuencia de nucleótidos de región V ligera AM16 (segmentos V-J)

FR1 :
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGCCAGGCGAGT

CDR1 :
CAGGACATTAAGAAGTAT

ES 2 575 129 T3

FR2:

TTAAATTGGTATCATCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTGAGCTCCTGATGCAC

CDR2:

GATGCATCC

FR3:

AATTTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGGGGATCTGGGACAGATTTTACTCT
CACCATTAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGGAACATATTACTGT

CDR3:

CAACAGTATGATAATCTGCCTCCGCTCACT

FR4:

TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC

Figura 14C

clon anti-VSR AM23

Región VH de secuencia de nucleótidos AM23 (segmentos V-D-J)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAAATGTGGTCAAGCCTGGGACGTCCCTGAGACTGTCCCTGTGCAGCGACTGGATTCAACTTCCATAACTAC
 GCATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGCGTGTGGTATGATGGAAGTAAGAAATACTATGCAGACTCCGTG
 ACGGGCCGATTCCGCATCTCCAGAGACAATCCAAAGAACACTCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTTTATTATTGT
 GTGAGAGATAAAGTGGGACCGACTCCCTACTTTTGACTCCCTGGGGCCAGGAAACCCTGGTCACCCGTCCTCGAGT

Región VH de secuencia de aminoácidos AM23 (segmentos V-D-J)

EVQLVESGGNVVKPGTSLRLSCAATGFNFIHNYGMNWRQAPGKGLEWVAVVWYDGSKKYYADSVTGRFAISRDNKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYC
 VRDKVGPFPYFDSWGQTLVTVSS

Región VL de secuencia de nucleótidos AM23 (segmentos V-J)

TCCTATGTGCTGACTCAGCCCCCTCGGTGTCACTGGCCCCAGGAGGACGGCCCGGATCACCTGTGGAAGAAACAACATTTGGAAGTGAAAACCTGTG
 CACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCTATGATGATGACGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCC
 AACTCTGGGAACACGGCCACCCCTGACCATCAGCAGGGTCGAGGCCGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGGAGTAATTATCAT
 CAGGTATTCCGGCGGAGGACCAAGCTGACCCGTC

Región VL de secuencia de aminoácidos AM23 (segmentos V-J)

SYVLTPPPSVSLAPGGTAAITCGRNNIGSETVHWYQQKPGQAPVLIIVYDDDDRRPSGIPERFSGNSNGTATLTIISRVEAGDEADYYCQVWDRSNYH
 QVFGGKLTIV

secuencia de cadena pesada del clon AM23 en comparación con la línea germinal

```

-----Fr1----- [-CDR1-] -----Fr2----- [-CDR2-] -----Fr3----- [-CDR3-----] -----Fr4-----
IGHV3-33 lgerm.  QYQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS  GTFSSYG  MHWRVQAPGKGLEWVAV  IWDGSK  YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC  AR
* * * * *
AM23 VH  EYQLVESGGGVVVKPQTSRLSCAAT  GENFNHYG  MNWVRQAPGKGLEWVAV  VNYDGSKK  YYADSVTGRFALSRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC  VRDKVGFPPYFDS  WGQGLTVTVSS

```

Resultados de los análisis de IMGT/unión:
http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest

gen V: IGHV3-33*01
 gen D: IGHD 1-26*01
 gen J: IGHJ4*02

secuencia de cadena ligera del clon AM23 en comparación con la línea germinal

```

-----Fr1----- [-CDR1-] -----Fr2----- [-CDR2-] -----Fr3----- [-CDR3-----] -----Fr4-----
IGLV3-21 lgerm.  SYVLTQPPSVVAPGQTARIYTCGN  NIGSKS  VHWYQKPGQAFVLVYV  DDS  DRFSGIPEPFSGNSNGNTATLTISRVEAGDEADYIC  QVWDSSSDHQV
* * * * *
AM23 VL  SYVLTQPPSVVSLAPGGTAALTCGRN  NIGSET  VHWYQKPGQAFVLVYV  DDD  DRFSGIPEPFSGNSNGNTATLTISRVEAGDEADYIC  QVWDRSNYHQV  FGGGFKLTV

```

Resultados de los análisis de IMGT/unión:
http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest

gen V: IGLV3-21*02
 gen J: IGLJ2*01

Figura 14C (continuación)

secuencia de CDR1 de cadena pesada	GFNFHNYG
secuencia de CDR2 de cadena pesada	VWYDGSKK
secuencia de CDR3 de cadena pesada	VRDKVGPTYFDS
secuencia de CDR1 de cadena ligera	NIGSET
secuencia de CDR2 de cadena ligera	DDD
secuencia de CDR3 de cadena ligera	QVWDRSNYHQV

Secuencia de nucleótidos de región V pesada AM23 (segmentos V-D-J)

FR1 :

CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAAATGTGGTCAAGCCTGGGACGTCCCTGAGACTGTC
CTGTGCAGCGACT

CDR1 :

GGATTCAACTTCCATAACTACGGC

FR2 :

ATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCGGTT

CDR2 :

GTTTGGTATGATGGAAGTAAGAAA

FR3 :

TACTATGCAGACTCCGTGACGGGCCGATTGCGCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCT
GTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTTTATTATTGT

CDR3 :

GTGAGAGATAAAGTGGGACCGACTCCCTACTTTGACTCC

FR4 :

TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTATCCTCAG

Secuencia de nucleótidos de región V ligera de AM23 (segmentos V-J)

FR1 :

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCACTGGCCCCAGGAGGGACGGCCGCGATCAC
CTGTGGAAGAAAC

CDR1 :

AACATTGGAAGTGAAACT

ES 2 575 129 T3

FR2 :

GTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCGTCTAT

CDR2 :

GATGATGAC

FR3 :

GACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCT
GACCATCAGCAGGGTCGAGGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGT

CDR3 :

CAGGTGTGGGATAGGAGTAATTATCATCAGGTA

FR4 :

TTCGGCGGAGGGACCAAGTTGACCGTCCTAG

Figura 15-I

Neutralización de VSR en células VERO

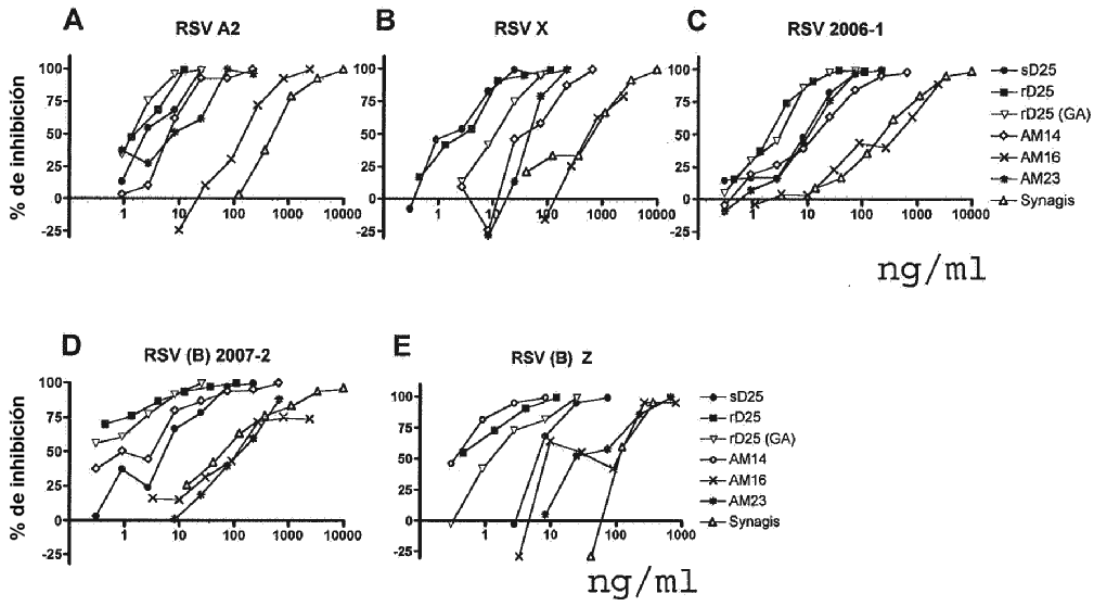


Figura 15-II

Neutralización de VSR en células HEp2

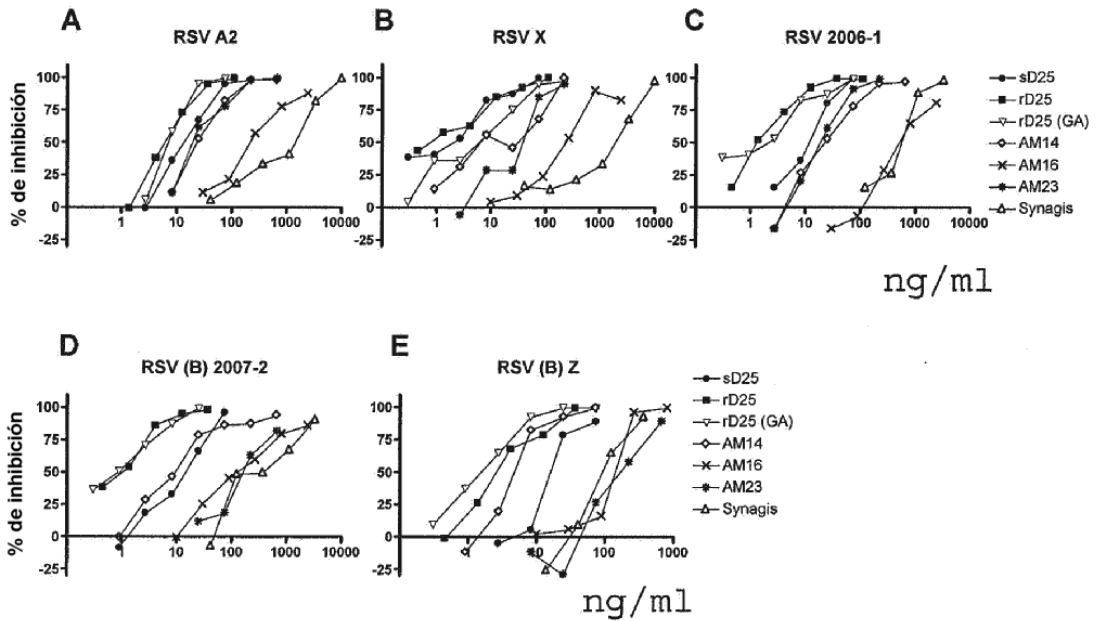


Figura 16

