

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 458**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2009 PCT/NL2009/050599**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2011 WO11043643**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2009 E 09788359 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2486053**

54 Título: **Molécula de unión específica al RSV**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.07.2017**

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)  
Milstein Building Granta Park  
Cambridge Cambridgeshire CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:

**BEAUMONT, TIM;  
BAKKER, ADRIANUS QUIRINUS y  
YASUDA, ETSUKO**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 621 458 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

Molécula de unión específica al RSV

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

5 El Virus Respiratorio Sincicial (RSV) es un virus de resfriado común que pertenece a la familia de paramixovirus. El RSV es virulento, fácilmente transmisible y la causa más común de padecimiento del tracto respiratorio inferior en niños de menos de 2 años de edad. En una sola temporada de RSV se infecta hasta el 98 % de los niños que acuden a guarderías. Entre el 0.5 % y 3.2 % de los niños con infección de RSV requieren hospitalización. En los Estados Unidos se reportan aproximadamente 90 000 admisiones hospitalarias y 4500 15 muertes por año. Los factores de mayor riesgo para hospitalización debidos al RSV son nacimiento prematuro, padecimiento pulmonar crónico, padecimiento cardiaco congénito, inmunidad comprometida, y edad menor de 6 semanas en niños por lo demás saludables. No está disponible ningún tratamiento efectivo de bronquiolitis positiva al RSV además de la asistencia complementaria en la forma de nutrición adecuada y terapia con oxígeno. Las terapias antivirales tales como la Ribavirina no han probado ser efectivas en la infección de RSV. Un anticuerpo monoclonal, el palivizumab (también llamado Synagis), está registrado para la profilaxis contra infección de RSV. El palivizumab es un anticuerpo monoclonal genéticamente modificado (humanizado) para la proteína de fusión (proteína F) del RSV. La proteína F del RSV es una proteína de membrana viral y es responsable de la fusión del virión con una célula hospedera después de la adhesión. Además, se promueve la infección de células cercanas a través de la formación de la sincitia mediante la proteína F y se cree que su función depende de la estructura oligomérica original de la proteína. Sin embargo, el palivizumab no siempre es efectivo. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de anticuerpos alternativos y/o suplementarios y terapias contra el RSV.

20 Es un objetivo de la invención proporcionar anticuerpos mejorados contra el RSV, o equivalentes funcionales de tales anticuerpos. Es un objetivo adicional proporcionar anticuerpos suplementarios contra el RSV, los cuales, en combinación con los anticuerpos específicos al RSV existentes, proporcionan un efecto sinérgico. Es un objetivo adicional de la invención proporcionar anticuerpos humanos o humanizados o equivalentes funcionales contra la proteína F del RSV, los cuales están dirigidos contra un epítipo que es diferente a los epítipos contra los que los anticuerpos específicos al RSV conocidos están dirigidos.

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional del mismo, el cual es capaz de enlazarse o unirse específicamente a la proteína F del Virus Respiratorio Sincicial y el cual comprende:

- una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia KLSIH,
- 30 - una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia GYEGEVDEIFYAQKFQH,
- una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia LGVTVTEAGLGIDDY,
- una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia RASQIVSRNHILA,
- una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia GASSRAT, y
- una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia LSSDSSI.

35 La presente invención proporciona un anticuerpo designado "AM22", el cual tiene secuencias de cadena pesada y cadena ligera, que se representa en la figura 2. Las secuencias CDR de AM22, las cuales en particular contribuyen a las propiedades de unión de antígenos de AM22, también se representan en la figura 2. El anticuerpo AM22 es completamente humano, es capaz de unirse específicamente al RSV (figura 3) y por lo tanto se prefiere para uso profiláctico y/o terapéutico para individuos humanos.

40 Como se menciona anteriormente el único anticuerpo anti-RSV clínicamente utilizado es el palivizumab. Este es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra un epítipo en el sitio antigénico de la proteína F del RSV. Los anticuerpos humanizados todavía contienen parte de un anticuerpo de ratón y aunque las propiedades inmunógenas se disminuyen en comparación con los anticuerpos completamente de ratón, los efectos secundarios de los anticuerpos humanizados pueden ocurrir cuando se aplican en humanos. Los presentes inventores, sin embargo, pudieron obtener y cultivar células B humanas que producen anticuerpos específicos al RSV, de modo que han provisto anticuerpos humanos específicos al RSV, que tienen actividad inmunógena fuertemente reducida - si acaso - como resultado de la secuencia completamente humana. Como se muestra en los ejemplos, los anticuerpos de acuerdo a la invención tienen características superiores en comparación con el palivizumab (figura 1 y tabla 1). Los presentes inventores han mostrado que las ratas Cotton (*Sigmodon hispidus*) dosificadas con anticuerpos de acuerdo a la invención mediante inyección intramuscular por medio de exposición o provocación intranasal con RSV-X, tienen un índice de Patología más bajo que las ratas Cotton dosificadas con palivizumab seguido por exposición o provocación con RSV-X (figura 4C y tabla 2). El índice de Patología utilizado en la presente es una suma de puntuaciones para clasificar tres marcadores individuales de lesión pulmonar. Estos tres marcadores son hipertrofia de bronquios y epitelio de bronquiolos, inflamación que rodea los bronquios y bronquiolos (peribronqu(iol)itis) e inflamación en los alveolos (alveolitis). Además, las ratas Cotton inyectadas intramuscularmente con anticuerpos de acuerdo a la invención y subsecuente exposición o provocación con RSV-X

tuvieron titulaciones de virus pulmonar más bajas que las ratas Cotton administradas con palivizumab seguido por exposición o provocación con RSV-X (figura 4B), que se determinó mediante ensayo TCID<sub>50</sub> (50 % de dosis infecciosa del cultivo de tejido). De ahí que, se prefiera el AM22 sobre el palivizumab.

5 Aparte del palivizumab, son conocidos algunos otros anticuerpos específicos al RSV. WO 2008/147196 describe secuencias de moléculas de unión al RSV, particularmente los anticuerpos D25, AM14, AM16 y AM23. Como se describe con detalle en el ejemplo 1 de la presente solicitud, se obtuvo el anticuerpo AM22 específico al RSV del mismo donador que los anticuerpos D25, AM14, AM16 y AM23. Sorprendentemente sin embargo, el AM22 reconoce al RSV más eficientemente que todos los otros anticuerpos obtenidos del mismo donador. El valor IC<sub>50</sub> de AM22, 1.15 ng ml<sup>-1</sup>, es más bajo que el del palivizumab, D25, AM14, AM16 o AM23. Por lo tanto, el uso de AM22 para el tratamiento y/o prevención de un padecimiento relacionado con el RSV tiene ventajas sobre el uso de los otros anticuerpos específicos al RSV. Es necesario menos anticuerpo AM22 para obtener un efecto similar en comparación con los otros anticuerpos. Por lo tanto, tiene que administrarse menos AM22 a un individuo para el tratamiento y/o prevención de un padecimiento relacionado con el RSV. Alternativamente, con una cantidad similar del AM22, en comparación con los otros anticuerpos, se logra un tratamiento y/o prevención más efectivos de un padecimiento relacionado con el RSV.

15 Además, un anticuerpo específico al RSV de acuerdo a la presente invención reconoce un diferente epítipo tal como las moléculas de unión al RSV previamente descritas. El AM22, similar a los anticuerpos previamente identificados (WO2008/147196), es capaz de unirse a la proteína F del RSV (figura 3A). Sin embargo, el AM22 no se une a una proteína F del RSV monomérica (figura 3B panel izquierdo y derecho). Contrario al AM22, los anticuerpos conocidos palivizumab y AM16 (descritos en WO 2008/147196 y figura 3B) son capaces de unirse a la forma monomérica de la proteína F. Notablemente, la línea de células B de AM22 que expresan el Receptor de Células B (BCR) específico de antígenos, no reconoce una forma recombinante de la proteína F (figura 3C). Por consiguiente, el AM22 se une a un epítipo diferente de la proteína F que el palivizumab, D25, AM23 y AM16. Cuando la proteína F recombinante se expresó en un vector que contiene una porción de trimerización de cremallera de isoleucina con ocho etiquetas HIS (ILZ-8xHIS), entonces el AM22 reconoce esta estructura trimérica, dependiente de la conformación (figura 3D). En contraste, el AM14 no reconoce ninguna de la forma monomérica de la proteína F o proteína F del ILZ-8xHIS. Por consiguiente el AM22 también se une a un epítipo diferente de la proteína F que el del AM14. Además se encontró que el AM22 no interfiere con el D25 o palivizumab que se une a las células Hep2 infectadas con RSV. Por consiguiente, el AM22 se une a un epítipo diferente de la proteína F en comparación con el D25, AM14, AM16, AM23 y palivizumab. Por lo tanto, los anticuerpos específicos al RSV o equivalentes funcionales de los mismos de acuerdo a la presente invención preferiblemente se combinan con anticuerpos específicos al RSV que ya son conocidos, tales como el palivizumab, D25, AM14, AM16, y AM23. Al combinar un anticuerpo de acuerdo a la invención con un anticuerpo específico al RSV, dos o más epítopos diferentes de RSV son reconocidos durante la misma terapia. De este modo, se obtiene una respuesta inmunógena más fuerte al RSV. Además se logra una especificidad de anticuerpo más alta contra el RSV combinando uno de los anticuerpos específicos al RSV, conocidos, con un anticuerpo AM22 de acuerdo a la invención. Con una respuesta inmunógena más fuerte al RSV y especificidad más alta contra este, tal combinación dará como resultado un tratamiento y/o prevención más efectivos de un padecimiento relacionado con el RSV. Finalmente, es necesaria una dosificación de anticuerpo total más baja debido a que el AM22 tiene una capacidad de unión más fuerte para la proteína F en comparación con el palivizumab, D25, AM14, AM16, y AM23, como se muestra por su valor IC<sub>50</sub> bajo, de aproximadamente 1.15 ng/ml.

40 Esta divulgación por lo tanto proporciona un anticuerpo o equivalente funcional el cual tiene un valor IC<sub>50</sub> menor a 1.25 ng/ml en un ensayo de neutralización in vitro en donde las células HEp-2 son infectadas con el virus RSV-A2. Dicho anticuerpo o equivalente funcional preferiblemente tiene un valor IC<sub>50</sub> de menos de 1.2 ng/ml, preferiblemente entre 0.5 ng/ml y 1.2 ng/ml. Adicionalmente, un anticuerpo o equivalente funcional de acuerdo a la divulgación preferiblemente tiene un valor IC<sub>50</sub> el cual es al menos 120 veces más bajo, más preferiblemente al menos 130 veces más bajo, que el valor IC<sub>50</sub> de palivizumab en un ensayo de neutralización in vitro en donde las células HEp-2 se infectan con el virus RSV-A2. Dicho anticuerpo o equivalente funcional preferiblemente tiene un valor IC<sub>50</sub> de aproximadamente 1.15 ng/ml. Por consiguiente con un anticuerpo específico al RSV o equivalente funcional del mismo de acuerdo a la presente divulgación en combinación con al menos un anticuerpo específico al RSV disponible se logra un tratamiento y/o prevención más efectivos de un padecimiento relacionado con el RSV.

Un equivalente funcional de un anticuerpo se define en la presente como una parte funcional de un anticuerpo.

50 Una parte funcional de un anticuerpo se define como una parte la cual tiene al menos una misma propiedad que dicho anticuerpo en especie, no necesariamente en cantidad. Tal parte funcional es capaz de unirse al mismo antígeno que dicho anticuerpo, aunque no necesariamente en la misma medida. Una parte funcional de un anticuerpo preferiblemente comprende un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo de cadena única, un fragmento variable de cadena única (scFv), un fragmento Fab o un fragmento F(ab')<sub>2</sub>.

55 Un derivado funcional de un anticuerpo se define como un anticuerpo el cual ha sido alterado de tal manera que al menos una propiedad - preferiblemente una propiedad de unión de antígenos - del compuesto resultante esencialmente sea igual en especie, no necesariamente en cantidad. En muchos sentidos se proporciona un derivado, por ejemplo a través de sustitución de aminoácidos conservativa, mediante la cual un residuo de aminoácidos es sustituido por otro residuo con propiedades generalmente similares (tamaño, hidrofobicidad, etc.), de tal manera que sea posible que el funcionamiento total no sea seriamente afectado.

Una persona experta en la técnica es capaz de generar compuestos análogos de un anticuerpo. Esto se hace por ejemplo utilizando una genoteca de péptidos o genoteca de exposición en fagos. Tal análogo esencialmente tiene por lo menos una misma propiedad que dicho anticuerpo en especie, no necesariamente en cantidad.

5 Un anticuerpo de acuerdo a la invención preferiblemente es un anticuerpo humano. El uso de anticuerpos humanos para profilaxis y terapia en humanos disminuye la probabilidad de efectos secundarios debidos a una reacción inmunológica en un individuo humano contra secuencias no humanas. En otra modalidad un anticuerpo, parte funcional, derivado o análogo de acuerdo a la invención es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados se hacen incorporando dominios hipervariables no humanos en anticuerpos humanos y por lo tanto las propiedades inmunógenas se disminuyen en comparación con anticuerpos completamente no humanos. En otra modalidad preferida un anticuerpo o parte funcional, 10 derivado o análogo de acuerdo a la invención es un anticuerpo quimérico. De este modo, las secuencias de interés, tales como por ejemplo un sitio de unión de interés, se pueden incluir en un anticuerpo o equivalente funcional de acuerdo a la invención.

15 Como es bien sabido por la persona experta, una cadena pesada de un anticuerpo es la más grande de los dos tipos de cadenas que componen una molécula de inmunoglobulina. Una cadena pesada comprende dominios constantes y un dominio variable, donde dicho dominio variable está involucrado en la unión de antígenos. Una cadena ligera de un anticuerpo es la más pequeña 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, junto con el dominio variable de la cadena pesada, está involucrado en la unión de antígenos.

20 Las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) son regiones hipervariables presentes en los dominios variables de cadena pesada y dominios variables de cadena ligera. Las CDRs de una cadena pesada y la cadena ligera conectada de un anticuerpo conjuntamente forman el sitio de unión de antígenos.

Ahora que la presente invención proporciona el entendimiento de que las secuencias CDR representadas en la figura 2 proporcionan características de unión deseadas, una persona experta es capaz de generar variantes que comprendan al menos una secuencia CDR alterada. Por ejemplo, se aplica una sustitución de aminoácidos conservativa. También es posible alterar al menos una secuencia CDR representada en la figura 2 a fin de generar un anticuerpo variante, o un equivalente funcional del mismo, con al menos una propiedad alterada en comparación con el AM22. Un anticuerpo o equivalente funcional puede comprender una secuencia CDR la cual es al menos 70 % idéntica a una secuencia CDR que se representa en la figura 2, de modo que las características de unión favorables del AM22 sean al menos en parte mantenidas o incluso mejoradas. Una secuencia CDR que se representa en la figura 2 se puede alterar de tal manera que el anticuerpo resultante o equivalente funcional comprenda al menos una propiedad mejorada, tal como por ejemplo una estabilidad mejorada y/o afinidad de unión, en comparación con el AM22. La especificidad de unión preferiblemente se mantiene (en especie, no necesariamente en cantidad). Los anticuerpos variantes o equivalentes funcionales de los mismos pueden comprender una secuencia de aminoácidos la cual es al menos 70 % idéntica a la secuencia CDR que se representa en la figura 2. Están disponibles varios métodos en la técnica para alterar una secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, se sintetiza artificialmente una secuencia de cadena pesada o cadena ligera con una secuencia CDR deseada. Preferiblemente, una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia CDR se muta, por ejemplo, utilizando mutagénesis aleatoria -o dirigida-.

30 La medición de la constante de afinidad y especificidad de unión entre el antígeno y el anticuerpo se prefiere para determinar la eficacia de métodos profilácticos, terapéuticos, de diagnóstico e investigación utilizando anticuerpos anti-RSV de la invención. La "afinidad de unión" generalmente se refiere a la concentración de la suma total de las interacciones no covalentes entre un sitio de unión único de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su asociado de unión (por ejemplo un antígeno). A menos que se indique de otra manera, cuando se utiliza en la presente, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca la cual refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad generalmente se puede representar por la constante de disociación ( $K_d$ ) de equilibrio, la cual se calcula como la proporción  $K_{off}/K_{on}$ . Ver, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, tales como por ejemplo un ensayo con resonancia de plasmones superficiales (SPR) tal como el instrumento BiaCore o IBIS-iSPR en IBIS Technologies BV (Hengelo, Países Bajos) o ensayos de fase de solución, tales como Kinexa.

40 De acuerdo a las modalidades preferidas, los presentes anticuerpos anti-RSV de la invención tienen afinidades de unión para un epitopo en la proteína F del RSV que incluyen una constante de disociación ( $K_d$ ) de menos de  $1 \times 10^{-2}M$ ,  $1 \times 10^{-3}M$ ,  $1 \times 10^{-4}M$ ,  $1 \times 10^{-5}M$ ,  $1 \times 10^{-6}M$ ,  $1 \times 10^{-7}M$ ,  $1 \times 10^{-8}M$ ,  $1 \times 10^{-9}M$ ,  $1 \times 10^{-10}M$ ,  $1 \times 10^{-11}M$ ,  $1 \times 10^{-12}M$ ,  $1 \times 10^{-13}M$ ,  $1 \times 10^{-14}M$  o menos de  $1 \times 10^{-15}M$ . En una modalidad, los anticuerpos anti-RSV tienen una  $K_d$  de menos de  $10^{-7}M$ , menos de  $5 \times 10^{-8}M$ , menos de  $10^{-8}M$ , menos de  $5 \times 10^{-9}M$ , menos de  $10^{-9}M$ , menos de  $5 \times 10^{-10}M$ , menos de  $10^{-10}M$ , menos de  $5 \times 10^{-11}M$ , menos de  $10^{-11}M$ , menos de  $5 \times 10^{-12}M$ , menos de  $10^{-12}M$ , menos de  $5 \times 10^{-13}M$ , menos de  $10^{-13}M$ , menos de  $5 \times 10^{-14}M$ , menos de  $10^{-14}M$ , 45 menos de  $5 \times 10^{-15}M$ , o menos de  $10^{-15}M$ .

En la presente se describe un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo, el cual comprende:

- una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia la cual tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con KLSIH, y/o

- una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia la cual tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia GYEGEVDEIFYAQKFQH, y/o

- una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia la cual tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia LGVTVTEAGLGIDDY, y/o

5 - una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia la cual es al menos 70 % idéntica a la secuencia RASQIVSRNHLA, y/o

- una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia la cual es al menos 70 % idéntica a la secuencia GASSRAT, y/o

10 - una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia la cual es al menos 70 % idéntica a la secuencia LSSDSSI.

Un anticuerpo o equivalente funcional puede comprender una secuencia CDR la cual es al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % idéntica al menos a una de las secuencias CDR representadas en la figura 2. Un anticuerpo o equivalente funcional de acuerdo a la divulgación puede comprender una secuencia CDR la cual es al menos 95 % idéntica al menos a una de las secuencias CDR representadas en la figura 2. El anticuerpo AM22 particularmente preferido, descrito anteriormente, comprende las secuencias CDR las cuales consisten en las secuencias CDR representadas en la figura 2. Una modalidad descrita en la presente proporciona un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o un equivalente funcional del mismo el cual es capaz de unirse específicamente al RSV y el cual comprende:

- una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia KLSIH, y/o

- una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia GYEGEVDEIFYAQKFQH, y/o

20 - una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia LGVTVTEAGLGIDDY, y/o

- una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia RASQIVSRNHLA, y/o

- una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia GASSRAT, y/o

- una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia LSSDSSI.

25 Un anticuerpo o equivalente funcional puede comprender las secuencias CDR1 y CDR2 de cadena pesada y las secuencias CDR1 y CDR2 de cadena ligera que se representan en la figura 2, o secuencias que son al menos 70 %, preferiblemente al menos 75 %, más preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 85 % idénticas a las mismas. Además se describe por lo tanto un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo el cual comprende una secuencia CDRI de cadena pesada que comprende una secuencia la cual es al menos 70 % idéntica a la secuencia KLSIH, y una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia la cual es al menos 70 % idéntica a la secuencia GYEGEVDEIFYAQKFQH, y una secuencia CDRI de cadena ligera que comprende una secuencia la cual es al menos 70 % idéntica a la secuencia RASQIVSRNHLA, y una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia la cual es al menos 70 % idéntica a la secuencia GASSRAT. Dicho anticuerpo o equivalente funcional preferiblemente comprende secuencias CDR las cuales son al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % idénticas a las secuencias CDR de cadena pesada y secuencias CDR de cadena ligera antes mencionadas. Dicho anticuerpo o equivalente funcional también puede comprender una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia la cual es al menos 70 % idéntica a la secuencia LGVTVTEAGLGIDDY, y/o una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia la cual es al menos 70 % idéntica a la secuencia LSSDSSI. También se proporciona un anticuerpo o equivalente funcional que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada antes mencionadas así como las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera antes mencionadas.

Se pueden optimizar secuencias CDR humanas, a fin de mejorar la eficacia de unión o estabilidad. Esto se hace, por ejemplo, mediante experimentos de mutagénesis donde después de la estabilidad y/o eficacia de unión de los compuestos resultantes preferiblemente se analizan y se selecciona un anticuerpo mejorado o equivalente funcional.

45 Aparte de optimizar las secuencias CDR, frecuentemente es ventajoso optimizar al menos una secuencia en al menos una de las regiones de estructura. Esto preferiblemente se hace a fin de mejorar la eficacia de unión o estabilidad. Las secuencias de estructura, por ejemplo, se optimizan mutando una molécula de ácido nucleico que codifica tal secuencia de estructura donde después las características del anticuerpo resultante - o parte funcional - preferiblemente se analizan. De este modo, es posible obtener anticuerpos o partes funcionales mejorados. Por lo tanto también se proporcionan anticuerpos aislados, sintéticos o recombinantes o partes funcionales, derivados y/o análogos de los mismos que comprenden una secuencia de aminoácidos de cadena pesada la cual tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de cadena pesada como se representa en la figura 2. Tal secuencia de cadena pesada proporciona propiedades de unión deseadas, como se evidencia por el anticuerpo AM22. Además, las secuencias de aminoácidos de cadena ligera las cuales tienen al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de cadena ligera que se representa en la figura 2 también proporcionan propiedades de unión deseadas, como se evidencia por el anticuerpo

AM22. Además se describe por lo tanto un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo de acuerdo a la divulgación, que tiene una secuencia de cadena pesada que comprende una secuencia la cual tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia QVQLVQSGAEVKKPGATVKVSKISGHTLIKLSIHVWRQAPGKGLEWMGG  
 5 YEGEVDEIFYAQKFQHRLTVIADTATDTVYMELGRLTSSDDTAVYFCGTLGV TVTEAGLGIDYWGQGLTVTVSS y/o tiene una secuencia de cadena ligera la cual tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQIVSRNHLAWYQQKPGQAPRLLIFGA  
 SSRATGIPVRFSGSGSDFTLTINGLAPEDFAVYYCLSSDSSIFTFGPGTKV DFK.

10 Un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo de acuerdo a la divulgación preferiblemente comprende una secuencia de cadena pesada y/o una secuencia de cadena ligera la cual es al menos 90% idéntica a la secuencia de cadena pesada y/o una secuencia de cadena ligera como se representa en la figura 2. Entre más alta sea la homología, más estrechamente dicho anticuerpo o equivalente funcional se asemeja al anticuerpo AM22. Un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo preferiblemente comprende una cadena pesada así como una cadena ligera la cual se asemeja a la cadena pesada y  
 15 ligera de AM22. Además se describe por lo tanto un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo que comprende una secuencia de cadena pesada y una secuencia de cadena ligera las cuales son al menos 70 %, más preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 85 %, más preferiblemente al menos 90 %, más preferiblemente al menos 95 % idéntica a la secuencia de cadena pesada y la secuencia de cadena ligera, respectivamente, como se representa en la figura 2. En una modalidad se proporciona un anticuerpo o equivalente  
 20 funcional el cual tiene una secuencia de cadena pesada que se representa en la figura 2 y una secuencia de cadena ligera que se representa en la figura 2.

Una modalidad proporciona un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo que comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en la secuencia de cadena pesada que se representa en la figura 2, y/o que comprende una secuencia de cadena ligera que consiste en la secuencia de cadena  
 25 ligera que se representa en la figura 2. Alternativamente, como es bien sabido por la persona experta, es posible generar una secuencia de cadena pesada o cadena ligera acortada mientras se mantiene una propiedad de unión de interés. Preferiblemente, se genera tal cadena pesada o cadena ligera acortada la cual tiene una región constante más corta, en comparación con la cadena pesada o ligera original. Preferiblemente se mantiene el dominio variable. Por ejemplo, se produce un fragmento Fab o fragmento  $f(ab')_2$  o un anticuerpo de dominio único o un anticuerpo de cadena única o un  
 30 nanocuerpo o un unicuerpo o un fragmento scFv en base a una secuencia de cadena pesada o secuencia de cadena ligera representada en la figura 2. Por lo tanto, también se proporciona una parte funcional de un anticuerpo que comprende al menos una parte funcional de una secuencia que se representa en la figura 2. Dicha parte funcional tiene una longitud de al menos 20 aminoácidos y comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia la cual es al menos 70 % idéntica a la secuencia CDR1 de cadena pesada representada en la figura 2, y  
 35 una secuencia la cual tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia CDR2 de cadena pesada representada en la figura 2, y una secuencia la cual tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia CDR3 de cadena pesada en la figura 2, y una secuencia la cual tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia CDR1 de cadena ligera representada en la figura 2, y una secuencia la cual tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia CDR2 de cadena ligera representada en la figura 2, y una secuencia la cual tiene al menos  
 40 70 % de identidad de secuencia con la secuencia CDR3 de cadena ligera representada en la figura 2.

Como se menciona anteriormente, los anticuerpos y equivalentes funcionales de acuerdo a la presente invención reconocen un epítipo único de un trímero de proteína F del RSV. De ahí que, se describan anticuerpos y equivalentes funcionales que específicamente reconocen este epítipo. Los anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos que específicamente reconocen dicho epítipo único preferiblemente se combinan con anticuerpos específicos al RSV que ya son conocidos, tales como palivizumab, D25, AM14, AM16 y AM23. Al combinar un anticuerpo o equivalente funcional de  
 45 acuerdo a la invención que específicamente reconoce dicho epítipo único con un anticuerpo específico al RSV conocido, dos o más epítipos diferentes de RSV son reconocidos durante la misma terapia. De este modo, se logra una respuesta inmunógena más fuerte al RSV y/o una mayor especificidad del anticuerpo contra el RSV, con una respuesta inmunógena más fuerte al RSV y mayor especificidad contra este, tal combinación dará como resultado un tratamiento y/o prevención más efectiva de un padecimiento relacionado con el RSV.  
 50

Por lo tanto, en la presente se describe un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo el cual es capaz de unirse específicamente a un epítipo que es reconocido por un anticuerpo el cual comprende:

- una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia KLSIH, y/o
- 55 - una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia GYEGEVDEIFYAQKFQH, y/o
- una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia LGVTVTEAGLGIDY, y/o
- una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia RASQIVSRNHLA, y/o
- una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia GASSRAT, y/o

- una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia LSSDSSI.

En la presente también se describe un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo el cual es capaz de unirse específicamente a un epítipo que es reconocido por un anticuerpo AM22 el cual comprende:

- 5 - una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia KLSIH, y
- una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia GYEGEVDEIFYAQKFQH, y
- una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia LGVTVTEAGLGIDDY, y
- una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia RASQIVSRNHLA, y
- una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia GASSRAT, y
- 10 - una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia LSSDSSI.

Ciertas modificaciones de la región constante (Fc) del anticuerpo pueden alterar las funciones realizadoras. Por ejemplo, se incrementa la vida media del suero de proteínas que comprende regiones Fc al incrementar la afinidad de unión de la región Fc para FcRn. El término "vida media del anticuerpo" que se utiliza en la presente significa una propiedad farmacocinética de un anticuerpo que es una medida del tiempo de supervivencia medio de las moléculas del anticuerpo después de su administración. La vida media del anticuerpo se puede expresar como el tiempo requerido para eliminar el 50 por ciento de una cantidad conocida de inmunoglobulina del cuerpo del paciente (u otro mamífero) o un compartimento específico del mismo, por ejemplo, que se mide en el suero, es decir, la vida media circulante, o en otros tejidos. La vida media puede variar de una inmunoglobulina o clase de inmunoglobulina a otra. En general, un incremento en la vida media del anticuerpo da como resultado un incremento en el tiempo de residencia medio (MRT) en circulación para el anticuerpo administrado. El incremento en la vida media permite la reducción en la cantidad del fármaco dado a un paciente así como la reducción de la frecuencia de administración. Para incrementar la vida media del suero de un anticuerpo de acuerdo a la invención, se puede incorporar un epítipo de unión del receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la Patente Norteamericana No. 5,739,277, por ejemplo. Cuando se utiliza en la presente, el término "epítipo de unión del receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) que es responsable de incrementar la vida media del suero in vivo de la molécula IgG. Alternativamente, los anticuerpos de la invención con vidas medias incrementadas pueden generarse modificando los residuos de aminoácidos identificados como involucrados en la interacción entre el Fc y un receptor FcRn (ver, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas Nos. 6,821,505 y 7,083,784). Además, la vida media de los anticuerpos de la invención puede incrementarse mediante la conjugación al PEG o Albúmina mediante técnicas ampliamente utilizadas en el arte. En algunas modalidades los anticuerpos que comprenden las regiones variantes Fc de la invención tienen una vida media incrementada de aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 100 %, aproximadamente 125 %, aproximadamente 150 % o más en comparación con un anticuerpo que comprende una región Fc natural. En algunas modalidades los anticuerpos que comprenden regiones de la variante Fc tienen una vida media incrementada aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 50 veces o más, o está entre 2 veces y 10 veces, o entre 5 veces y 25 veces, o entre 15 veces y 50 veces, en comparación con un anticuerpo que comprende una región Fc natural. La divulgación por lo tanto proporciona un anticuerpo o parte funcional de acuerdo a la invención, que comprende un epítipo de unión del receptor de rescate, y/o residuos aminoácidos modificados identificados como involucrados en la interacción entre el Fc y un receptor FcRN, y/o residuos de aminoácidos que no se presentan de manera natural. Otra modalidad preferida proporciona un anticuerpo o equivalente funcional de acuerdo a la invención el cual se conjuga al PEG o Albúmina.

45 En una modalidad, la presente divulgación proporciona variantes Fc de acuerdo a la invención, en donde la región Fc comprende una modificación (por ejemplo, sustitución de aminoácidos, inserción de aminoácidos, eliminación de aminoácidos) en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, y 443, tal como se numeran por el índice EU como se establece en Kabat et al (J Immunol. 1991; 147 (5):1709-19). Opcionalmente, la región Fc comprende un residuo de aminoácido no presente de manera natural en posiciones adicionales y/o alternativas conocidas para un experto en la técnica (ver, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas Nos. 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; 7,083,784; 7,317,091; 7,217,797; 7,276,585; 7,355,008; 2002/0147311; 2004/0002587; 2005/0215768; 2007/0135620; 2007/0224188; 2008/0089892; WO 94/29351; y WO 99/58572).

55 En una modalidad específica, la presente divulgación proporciona un anticuerpo de la variante Fc de acuerdo a la invención, en donde la región Fc comprende al menos un aminoácido no presente de manera natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 252, 254 y 256. En una modalidad, los aminoácidos no presentes de manera natural se seleccionan del grupo que consiste en 252Y, 254T y 256E.

La presente invención proporciona anticuerpos específicos al RSV y equivalentes funcionales de los mismos que tienen propiedades mejoradas en comparación con los anticuerpos de la técnica previa. Los inventores han podido generar anticuerpos específicos al RSV con el valor IC<sub>50</sub> más bajo actualmente conocido. Tales anticuerpos tienen una particular afinidad alta o fuerte al RSV y por lo tanto son particularmente adecuados para contrarrestar y/o, al menos en parte, prevenir una infección de RSV y/o efectos adversos de una infección de RSV. Una modalidad por lo tanto proporciona un anticuerpo el cual tiene un valor IC<sub>50</sub> de menos de 1.25 ng/ml, preferiblemente menos de 1.2 ng/ml, más preferiblemente menos de 1.19 ng/ml, más preferiblemente menos de 1.18 ng/ml, y más preferiblemente entre 1.1 ng/ml y 1.17 tal como se determina en el ensayo de neutralización in vitro descrito en los ejemplos (ver la figura 1).

En la presente se describe además una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante o un equivalente funcional de la misma con una longitud de al menos 15 nucleótidos, preferiblemente al menos 30 nucleótidos, más preferiblemente al menos 50 nucleótidos, más preferiblemente al menos 75 nucleótidos, que codifican al menos una parte de unión de antígenos de un anticuerpo o equivalente funcional de acuerdo a la invención. Tal ácido nucleico por ejemplo se aísla de una célula B la cual es capaz de producir un anticuerpo de acuerdo a la invención. Se describe una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia la cual tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con al menos 15 nucleótidos de una secuencia de ácido nucleico que se representa en la figura 2. Una secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia la cual tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % de identidad de secuencia con al menos 15 nucleótidos de una secuencia de ácido nucleico que se representa en la figura 2. Dicha secuencia de ácido nucleico que se representa en la figura 2 puede comprender al menos una secuencia que codifica la CDR.

En la presente se describe una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante con una longitud de al menos 15 nucleótidos, o un equivalente funcional de la misma, que codifica al menos una secuencia CDR de un anticuerpo o equivalente funcional de acuerdo a la invención. Dicha secuencia de ácido nucleico puede codificar al menos una secuencia CDR la cual tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con una región CDR del anticuerpo AM22. Las secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones CDR del AM22 se representan en la figura 2. Además se proporciona por lo tanto una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, o un equivalente funcional de la misma, que codifica el anticuerpo o parte funcional del mismo de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 7 u 8 o que comprende las secuencias aaattatccattcac, gggtatgagggtgaggtcgatgagattttctacgcacagaagtccagcac, ctagggtgacagtgactgaggctggactgggatcgatgactac, agggccagtcagattgttagcaggaaccactagcc, ggtgcgtccagtcgggcccact y ctgtcctctgattctcctata.

Una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional puede comprender una secuencia la cual tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de ácido nucleico antes mencionadas. Además se describe una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional de la misma que comprende una secuencia la cual tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con al menos parte de una secuencia de nucleótidos que se representa en la figura 2, dicha parte tiene al menos 15 nucleótidos y codifica al menos una región CDR que se representa en la figura 2.

Una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional de la misma puede codificar una región la cual tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con una región CDR del AM22, una cadena pesada del AM22 y/o una cadena ligera del AM22. En la presente se describe una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, o un equivalente funcional de la misma, que comprende una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos la cual tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia KLSIH, y/o al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia GYEGEVDEIFYAQKFQH, y/o al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia LGVTVTEAGLGIDDY, y/o al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia RASQIVSRNHLA, y/o al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia GASSRAT, y/o al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia LSSDSSI, y/o al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia QVQLVQSGAEVKKPGATVKVSKISGHTLIKLSIHVWRQAPGKLEWMGG YEGEVDEIFYAQKFQHRLTVIADTATDTVYMEGLRLTSDDTAVYFCGTLGV TVTEAGLGIDDYWGQGLTVTVSS, y/o al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQIVSRNHLAWYQQKPGQAPRLLIFGA SSRATGIPVRFSGSGSGTDFLTINGLAPEDFAVYYCLSSDSSIFTFGPGTKVDFK.

Como se menciona anteriormente, un anticuerpo o equivalente funcional de acuerdo a la invención es capaz de reconocer un epítipo único presente en las proteínas F del RSV triméricas. Una secuencia de ácido nucleico descrita en la presente puede codificar una secuencia CDR capaz de unirse específicamente a este epítipo único. También se describe por lo tanto una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante o un equivalente funcional de la misma, que codifica al menos una secuencia CDR capaz de unirse específicamente a un epítipo que es reconocido por un anticuerpo el cual comprende:

- una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia KLSIH, y/o
- una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia GYEGEVDEIFYAQKFQH, y/o
- una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia LGVTVTEAGLGIDDY, y/o
- una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia RASQIVSRNHLA, y/o

- una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia GASSRAT, y/o
- una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia LSSDSSI.

5 Dicha secuencia de ácido nucleico puede codificar un anticuerpo completo o equivalente funcional (por ejemplo que comprende una cadena pesada o cadena ligera) de acuerdo a la invención. Se describe además por lo tanto una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, o un equivalente funcional de la misma, que codifica un anticuerpo o equivalente funcional de la misma capaz de unirse específicamente a un epítipo que es reconocido por un anticuerpo el cual comprende:

- una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia KLSIH, y/o
- una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia GYEGEVDEIFYAQKFQH, y/o
- 10 - una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia LGVTVTEAGLGIDDY, y/o
- una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia RASQIVSRNHLA, y/o
- una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia GASSRAT, y/o
- una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia LSSDSSI.

15 Una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional puede codificar un anticuerpo o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo capaz de unirse específicamente a un epítipo que es reconocido por un anticuerpo AM22, el cual comprende una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia KLSIH, y una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia GYEGEVDEIFYAQKFQH, y una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia LGVTVTEAGLGIDDY, y una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia RASQIVSRNHLA, y una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia GASSRAT, y una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia LSSDSSI.

20 Una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional puede codificar un anticuerpo o equivalente funcional del mismo que tiene una constante de disociación ( $K_d$ ) de menos de  $1 \times 10^{-2}M$ ,  $1 \times 10^{-3}M$ ,  $1 \times 10^{-4}M$ ,  $1 \times 10^{-5}M$ ,  $1 \times 10^{-6}M$ ,  $1 \times 10^{-7}M$ ,  $1 \times 10^{-8}M$ ,  $1 \times 10^{-9}M$ ,  $1 \times 10^{-10}M$ ,  $1 \times 10^{-11}M$ ,  $1 \times 10^{-12}M$ ,  $1 \times 10^{-13}M$ ,  $1 \times 10^{-14}M$  o menos de  $1 \times 10^{-15}M$ .

25 Además se proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo a la invención. Tal vector es adecuado para una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, un vector de la invención que comprende una secuencia de ácido nucleico terapéuticamente benéfica es adecuada para aplicaciones profilácticas o terapéuticas. La administración de tal vector a un individuo en necesidad del mismo da como resultado la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico profiláctica o terapéutica in vivo. Dicho vector también se puede utilizar en aplicaciones que involucran expresión in vitro de una secuencia de ácido nucleico de interés, por ejemplo para producción (comercial) de anticuerpos o equivalentes funcionales de acuerdo a la invención. Los métodos para construir un vector con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo a la invención, son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitativos de vectores adecuados para generar un vector de la invención, son vectores retrovirales y lentivirales.

30 El término "% de identidad de secuencia" es definido en la presente como el porcentaje de residuos en una secuencia de aminoácidos candidata o secuencia de ácido nucleico candidata que es idéntica a los residuos en una secuencia de referencia después de alinear las dos secuencias e introduciendo espacios vacíos, si es necesario, para lograr la máxima identidad de porcentaje. Los métodos y programas informáticos para la alineación son bien conocidos en la técnica.

35 Cuando se utiliza en la presente, una molécula de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico de la invención preferiblemente comprende una cadena de nucleótidos, más preferiblemente ADN y/o ARN. En otras modalidades una molécula de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico de la invención comprende otros tipos de estructuras de ácido nucleico tal como por ejemplo una hélice de ADN/ARN, ácido nucleico de péptidos (PNA), ácido nucleico cerrado (LNA) y/o un ribozima. Tales otras estructuras de ácido nucleico se mencionan como equivalentes funcionales de una secuencia de ácido nucleico. El término "equivalente funcional de una secuencia de ácido nucleico" también abarca una cadena que comprende nucleótidos no naturales, nucleótidos modificados y/o bloques de construcción no de nucleótidos los cuales exhiben la misma función que los nucleótidos naturales.

40 Una secuencia de ácido nucleico o vector de acuerdo a la presente invención es particularmente útil para generar anticuerpos o equivalentes funcionales los cuales son específicos para el RSV. Esto se hace por ejemplo introduciendo tal secuencia de ácido nucleico o vector en una célula de modo que la maquinaria de traducción de ácido nucleico de la célula produzca el anticuerpo o equivalente funcional codificado. En una modalidad, una secuencia de ácido nucleico o vector que codifica una cadena pesada y/o ligera de acuerdo a la invención se expresa en las así llamadas células productoras, tales como por ejemplo las células de ovario de hámster chino (CHO), NSO (un mieloma de ratón) o línea de células 293 (T), algunas de las cuales se adaptan para la producción de anticuerpos comerciales. La proliferación de dichas células productoras da como resultado una línea de células productoras capaz de producir anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos de acuerdo a la presente invención. Preferiblemente, dicha línea de células productoras es adecuada para producir anticuerpos para usarse en humanos. De ahí que dicha línea de células

productoras preferiblemente esté libre de agentes patógenos tales como microorganismos patógenos. Más preferiblemente, se generan anticuerpos o equivalentes funcionales que consisten de secuencias humanas utilizando al menos una secuencia de ácido nucleico o vector de acuerdo a la invención.

5 Por lo tanto también se proporciona un anticuerpo aislado o recombinante que produce células capaces de producir un anticuerpo o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo de acuerdo a la invención, así como un método para producir un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o parte funcional, derivado y/o análogo de acuerdo a la invención, que comprende proporcionar una célula con una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional o vector de acuerdo a la invención y permitir trasladar dicha célula a dicha secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional o vector, produciendo así dicho anticuerpo o parte funcional, derivado y/o análogo del mismo.

10 Un anticuerpo que produce la célula se define en la presente como una célula la cual es capaz de producir y/o secretar un anticuerpo o un equivalente funcional del mismo, y/o el cual es capaz de desarrollarse en una célula la cual es capaz de producir y/o secretar un anticuerpo o un equivalente funcional del mismo. Un anticuerpo que produce la célula de acuerdo a la invención preferiblemente es una célula productora la cual se adapta a la producción de anticuerpos comerciales. Preferiblemente, dicha célula productora es adecuada para producir anticuerpos para usarse en humanos.

15 Un método de acuerdo a la invención preferiblemente comprende además una etapa para cosechar, purificar y/o aislar dicho anticuerpo o parte funcional, derivado y/o análogo del mismo de acuerdo a la invención. Los anticuerpos o equivalentes funcionales obtenidos de acuerdo a la invención preferiblemente se utilizan en terapia humana, opcionalmente después de las etapas adicionales de purificación, aislamiento o procesamiento.

20 Ahora que se han provisto por lo tanto anticuerpos o equivalentes funcionales mejorados específicos al Virus Respiratorio Sincicial de acuerdo a la invención y las secuencias de ácido nucleico y vectores de codificación, incluyendo los anticuerpos humanos o equivalentes funcionales, se han vuelto disponibles aplicaciones profilácticas y/o terapéuticas mejoradas. El RSV es contrarrestado por los anticuerpos o equivalentes funcionales de acuerdo a la invención. Un anticuerpo o equivalente funcional de acuerdo a la invención por lo tanto es particularmente adecuado para usarse como una medicina o agente profiláctico, opcionalmente en combinación con al menos otro anticuerpo específico al RSV conocido en la técnica. Preferiblemente, se utilizan anticuerpos o equivalentes funcionales los cuales consisten en secuencias humanas, o los cuales contienen como máximo un 5 % de secuencias no humanas, a fin de reducir la probabilidad de efectos secundarios adversos cuando se tratan individuos humanos. Un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo o una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional de la misma o un vector o una célula de acuerdo a la invención para usarse como un medicamento y/o agente profiláctico por lo tanto también se proporciona con el mismo. Cuando se administra un ácido nucleico o equivalente funcional o vector de acuerdo a la invención, se trasladará in situ en un anticuerpo o equivalente funcional de acuerdo a la invención. En una modalidad particularmente preferida dicho anticuerpo comprende el anticuerpo AM22, o un equivalente funcional del mismo. Dicho medicamento o agente profiláctico preferiblemente se utiliza para contrarrestar o al menos en parte prevenir una infección por RSV. Además se proporciona por lo tanto un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo o una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional de la misma o vector o célula de acuerdo a la invención para usarse como un medicamento y/o agente profiláctico para al menos en parte tratar y/o prevenir un padecimiento relacionado al RSV. Un medicamento que comprende AM22 en combinación con al menos otro agente específico al RSV, preferiblemente un anticuerpo, conocido en la técnica, es particularmente ventajoso debido a que con tal combinación se obtiene una respuesta inmunógena más fuerte al RSV y/o se alcanza una mayor especificidad del anticuerpo contra el RSV. Además se proporciona por lo tanto una combinación de un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo o una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional del mismo o vector o célula de acuerdo a la invención y otro agente específico al RSV diferente, preferiblemente un anticuerpo o equivalente funcional del mismo, para usarse como un medicamento y/o agente profiláctico. Una combinación de acuerdo a la invención preferiblemente comprende el AM22 y un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en palivizumab, D25, AM14, AM16 y AM23. Como se menciona anteriormente, tal combinación es particularmente adecuada para al menos en parte tratar o prevenir un padecimiento relacionado con el RSV. Además se proporciona por lo tanto un uso de una combinación de acuerdo a la invención para la preparación de un medicamento y/o agente profiláctico al menos en parte para tratar y/o prevenir un padecimiento relacionado al RSV. Por lo tanto también se proporciona un uso de un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo o una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional del mismo o vector o célula de acuerdo a la invención para la preparación de un medicamento y/o agente profiláctico para al menos en parte tratar y/o prevenir un padecimiento relacionado con el RSV, así como un método para al menos en parte tratar o prevenir un padecimiento relacionado con el RSV, el método comprende administrar a un individuo en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo de acuerdo a la invención. En una modalidad preferida, se utiliza una combinación con al menos otro agente específico al RSV, preferiblemente otro anticuerpo específico del RSV. Dicho individuo preferiblemente ha sido diagnosticado como infectado por RSV antes del tratamiento.

60 Dicho anticuerpo preferiblemente comprende el anticuerpo AM22, o una parte funcional del mismo. Dicho al menos otro anticuerpo específico al RSV preferiblemente es el palivizumab, D25, AM14, AM16 o AM23. Más preferiblemente se utiliza una combinación de AM22 y D25.

A fin de al menos en parte tratar o prevenir un padecimiento relacionado al Virus Respiratorio Sincicial, un anticuerpo o equivalente funcional de acuerdo a la invención preferiblemente se administra a un individuo antes de que haya tenido lugar una infección. Alternativamente, un anticuerpo o equivalente funcional de acuerdo a la invención se administra cuando un individuo ya está infectado. Dicho anticuerpo o equivalente funcional preferiblemente se administra a individuos con un riesgo incrementado de complicaciones, tales como por ejemplo individuos hospitalizados y/o individuos con inmunidad comprometida. También los ancianos tienen un riesgo incrementado de infección de RSV. Los anticuerpos o equivalentes funcionales de acuerdo a la invención preferiblemente se administran a través de una o más inyecciones. Los rangos de dosis de anticuerpos o equivalentes funcionales de acuerdo a la invención a utilizarse en las aplicaciones profilácticas o terapéuticas que se describieron en la presente anteriormente se diseñan en base a estudios de aumento de dosis en la clínica en ensayos clínicos para los cuales existen requerimientos de protocolo rigurosos. Las dosis típicas están entre 0.1 y 10 mg por kg de peso corporal. Para una aplicación profiláctica o terapéutica los anticuerpos o equivalentes funcionales de acuerdo a la invención típicamente se combinan con un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de portadores adecuados por ejemplo comprenden hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero (por ejemplo BSA o RSA) y ovoalbúmina. En una modalidad preferida dicho portador adecuado comprende una solución como por ejemplo solución salina.

En aún otra modalidad se utiliza un ácido nucleico o un vector que codifica un anticuerpo o equivalente funcional de acuerdo a la invención. Como ya se describió, tras la administración de tal ácido nucleico o vector, los anticuerpos o equivalentes funcionales se producen mediante la maquinaria del hospedero. Los anticuerpos producidos o equivalentes funcionales de los mismos son capaces de al menos en parte prevenir y/o contrarrestar la infección por Virus Respiratorio Sincicial y/o los efectos adversos de tal infección. Una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional o un vector de acuerdo a la invención para usarse como un medicamento y/o agente profiláctico por lo tanto también se proporciona con la misma. Además se proporciona un uso de una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional o vector de acuerdo a la invención para la preparación de un medicamento y/o agente profiláctico para al menos en parte tratar y/o prevenir un padecimiento relacionado con el RSV.

Además se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo o una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional de la misma o vector o célula de acuerdo a la invención y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica preferiblemente es adecuada para uso humano. En una modalidad preferida dicho anticuerpo es el AM22. En una modalidad preferida adicional dicho ácido nucleico codifica el AM22 o un equivalente funcional del mismo. En una modalidad dicha composición farmacéutica comprende además al menos otro anticuerpo específico al RSV, preferiblemente palivizumab, D25, AM14, AM16 y/o AM23.

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

#### Referencias

- Chen Y, Wiesmann C, Fuh G, Li B, Christinger HW, McKay P, de Vos AM, Lowman HB. Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J Mol Biol.* 1999; 293(4):865-81.
- Diehl SA, Schmidlin H, Nagasawa M, van Haren SD, Kwakkenbos MJ, Yasuda E, Beaumont T, Scheeren FA, Spits H. STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. *J Immunol.* 2008; 180(7):4805-15.
- Jaleco AC, Stegmann AP, Heemskerk MH, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Spits H. Genetic modification of human B-cell development: B-cell development is inhibited by the dominant negative helix loop helix factor Id3. *Blood.* 1999; 94(8):2637-46.
- Kabat EA, Wu TT. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol.* 1991; 147(5):1709-19.
- Kwakkenbos MJ, Diehl SA, Yasuda E, Bakker AQ, Van Geelen CMM, Lukens MV, Van Bleek GM, Widjoatmodjo MN, Rogers WMJM, Mei H, Radbruch A, Scheeren FA, Spits H and Beaumont T. Generation of stable monoclonal antibody-producing BCR+ human memory B cells by genetic programming. *Nat Med.* 2009 In press.
- Shvarts A, Brummelkamp TR, Scheeren F, Koh E, Daley GQ, Spits H, Bernards R. A senescence rescue screen identifies BCL6 as an inhibitor of anti-proliferative p19(ARF)-p53 signaling. *Genes Dev.* 2002; 16(6):681-6.
- Scheeren FA, Naspetti M, Diehl S, Schotte R, Nagasawa M, Wijnands E, Gimeno R, Vyth-Dreese FA, Blom B, Spits H. STAT3 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. *Nat Immunol.* 2005; 6(3):303-13.
- Ternette N, Tippler B, Uberla K, Grunwald T. Immunogenicity and efficacy of codon optimized DNA vaccines encoding the F-protein of respiratory syncytial virus. *Vaccine.* 2007; 25 (41):7271-9.

- US 5,624,821
- US 5,739,277
- US 6,277,375
- US 6,737,056
- 5 US 6,821,505
- US 7,083,784
- US 7,317,091
- US 7,217,797
- US 7,276,585
- 10 US 7,355,008
- US 2002/0147311
- US 2004/0002587
- US 2005/0215768
- US 2007/0135620
- 15 US 2007/0224188
- US 2008/0089892
- WO 94/29351
- WO 99/58572
- WO 2008/147196

20 **Leyendas de las figuras**

Figura 1. El AM22, un novedoso anticuerpo monoclonal completamente humano, neutraliza el virus RSV A2 muy eficientemente en células Hep2 en comparación con el palivizumab.

Figura 2. Secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera del AM22.

25 Figura 3. Los anticuerpos monoclonales anti-RSV humanos reconocen los epítomos conformacionales en la proteína de Fusión (F) del RSV como se determina por ELISA y tinción FACS. (A) muestra la unión de los anticuerpos a las células EL-4 infectadas con el Virus de Estomatitis Vesicular (VSV) el cual se clasificó en pseudotipos con la proteína del RSV F o RSV G. (B) muestra la unión de los anticuerpos anti-RSV F a placas de ELISA que se revistieron con un lisado de HEp2 infectadas con RSV (panel izquierdo) o con Placas Ni-NTA HisSorp (Qiagen) revestidas con proteína F etiquetada con HIS recombinante (panel derecho). La unión del anticuerpo a la proteína F se detecta con el anticuerpo de detección de IgG conjugada con HRP (diluciones 1:2500, Jackson). (C) muestra la unión de la cepa Larga del RSV F que contiene una etiqueta poli HIS a los clones de células B originales, la unión al BCR se detecta con un anticuerpo anti-pentaHIS. En (D) se muestra la unión intracelular de los anticuerpos anti-RSV humanos a las células T transfectadas con un constructo de RSV F recombinante que contiene un dominio de trimerización (dominio ILZ).

35 Figura 4. Exposición con RSV en ratas Cotton profilácticamente tratadas con inmunoglobulinas humanas. (A) muestra la recuperación de IgG1 humana de suero el día 1 y día 5 después de la administración intramuscular de las dosis indicadas de anticuerpos en ratas Cotton. (B) muestra la carga de RSV en los pulmones de ratas Cotton tratadas con los anticuerpos indicados 24 horas antes de la inyección con RSV-X. La carga de RSV se determinó 5 días después de la infección con el cultivo TCID<sub>50</sub>. Los experimentos se realizaron dos veces con cuatro a seis animales individuales por grupo de tratamiento. Se estudió la patología pulmonar en los mismos grupos de animales (C), se indica la patología pulmonar promedio del AM22 y palivizumab, ver también la tabla 2.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1.** Cultivo, inmortalización y selección de células B.

Métodos

Las células B se inmortalizaron y cultivaron como se describe anteriormente (Scheeren FA, et al. (2005) *Nat Immunol* 6: 303-313; Diehl SA, et al. (2008) *J Immunol* 180: 4805-4815 y Kwakkenbos MJ, et al. (2009) *Nat Med* en prensa). En breve, se aislaron las células B de la sangre periférica (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) mediante separación Ficoll, microperlas CD22 MACS (Miltenyi Biotech) y subsecuentemente con la clasificación celular de CD19<sup>+</sup>CD3-CD27<sup>+</sup>IgM-IgA<sup>-</sup> (células de memoria IgG) en un FACSAria (Becton Dickinson). El uso de estos tejidos fue aprobado por los comités éticos médicos de la institución y estuvo supeditado a consentimiento informado. Las células B transducidas retrovirales, se mantuvieron a  $2 \times 10^5$  células ml<sup>-1</sup> en IMDM suplementado con IL-21 de ratón recombinante (25 ng ml<sup>-1</sup>, R & D systems) y se co-cultivaron con fibroblastos de células L de ratón  $\Upsilon$ -irradiadas (50Gy) que expresan establemente CD40L (células CD40L-L,  $10^5$  células ml<sup>-1</sup>) durante 36 horas. Los constructos retrovirales BCL6 y Bcl-xL se describieron previamente (Shvarts A, et al. (2002) *Genes Dev* 16: 681-686 y Jaleco AC, et al. (1999) *Blood* 94: 2637- 2646) y se clonaron en el vector retroviral LZRS y se transfectaron en células de empaque Phoenix como se describe anteriormente y se agregaron a las células B estimuladas (Shvarts A, et al. (2002) *Genes Dev* 16: 681-686 y Scheeren FA, et al. (2005) *Nat Immunol* 6: 303- 313). Las células B transducidas se mantuvieron en IMDM, en la presencia de células CD40L-L recombinantes e IL-21 durante periodos de tiempo prolongados. Dadas las cantidades relativamente altas de anticuerpos secretados por las células B transducidas con BCL6+Bcl-xL se examinó si se podían seleccionar células B de antígenos específicos en base a la secreción del anticuerpo específico. Se sembraron células B de memoria transducidas con BCL6+Bcl-xL de un donador saludable a 100 células/pozo y se expandieron con células CD40L-L e IL-21. Después de 2 semanas de cultivo, los sobrenadantes se cosecharon y se seleccionaron por la presencia de anticuerpos neutralizantes de RSV en un experimento de micro-neutralización. De 384 cultivos (100 células/pozo), 31 previnieron la infección con RSV A2 de las células HEp2. A pesar de los micro-cultivos de los cuales D25, AM14, AM16, y AM23 se sub-clonaron limitando la dilución, enseguida se obtuvo el AM22. El AM22 tuvo concentraciones inhibitoras (IC<sub>50</sub>) máximas de la vida media contra el virus RSV-A2 de 1.15 ng ml<sup>-1</sup> (Fig. 1).

Para obtener la secuencia de la cadena pesada y ligera del locus de inmunoglobulina del AM22, se aisló el ARN total con el mini kit RNeasy® (Qiagen), se generó ADNc, se realizó la PCR y se clonaron las regiones variables de cadena pesada y ligera en el vector de clonación pCR2.1 TA (Invitrogen). Para descartar la transcriptasa inversa o mutaciones inducidas con polimerasa de ADN, se realizaron varios experimentos de clonación independientes. Para producir el mAAb de AM22 se clonaron regiones variables pesadas y ligeras de AM22 en el marco con IgG1 humana y regiones constantes Kappa en un vector a base de pcDNA3.1 (Invitrogen) y células 293T temporalmente transfectadas. Se purificó el AM22 recombinante del sobrenadante de cultivo con la Proteína A.

## 30 Resultados

Previamente se desarrollaron cuatro potentes anticuerpos anti-RSV dependientes de la conformación, denominados AM14, AM16, AM23 y D25. Estos anticuerpos han sido descritos en WO 2008/147196 y por Kwakkenbos MJ et al. (2009) *Nat Med* en prensa. A partir del mismo donador también se descubrió el AM22, el cual reconoció el virus RSV aún más eficientemente en comparación con los otros anticuerpos como es evidente a partir de una IC<sub>50</sub> de 1.15 ng ml<sup>-1</sup> contra el virus RSV A2 (tabla 1 y figura 1). La secuencia de aminoácidos de la cadena VH y VL de AM22 reveló que este anticuerpo es diferente a los otros anticuerpos (figura 2).

### Ejemplo 2. Experimentos de unión in vitro.

Para determinar adicionalmente la especificidad del antígeno del anticuerpo AM22 se realizaron experimentos de unión in vitro para revelar si la proteína reconoció la proteína F o G del RSV y en qué tipo de conformación.

## 40 Métodos (1)

Tinción FACS de la proteína G o F del RSV

El stock del virus de tipo natural y Virus de Estomatitis Vesicular (VSV) recombinante que expresan la proteína RSV-G (VSV-G) o proteína RSV-F (VSV-F) (los experimentos se realizaron por M. Lukens en WKZ, Utrecht y los virus VSV se proporcionaron amablemente por J.S. Kahn y J.K Rose, Escuela de Medicina de la Universidad Yale), se prepararon en células BHK que crecen en DMEM que contiene FCS al 5 %, penicilina/estreptomicina y 50  $\mu$ M de 2-mercapto-etanol. La infección con VSV se realizó en células EL-4 que se cultivaron en medio Dulbecco Modificado de Iscove (IMDM, Gibco, Invitrogen) suplementado con FCS al 5 %, penicilina/estreptomicina y 50  $\mu$ M de 2-mercapto-etanol. Las células EL-4 infectadas con las variantes del virus VSV se incubaron con anticuerpo recombinante y subsecuentemente se tiñeron con PE anti-humano de ratón (figura 3A).

## 50 (2) ELISA del RSV

Las placas se revistieron con lisado de células HEp-2 infectadas con RSV en PBS durante 1 hora a 37°C o o/n a 4°C y se lavaron en amortiguador de lavado de ELISA (PBS, Tween-20 al 0.5 %). Las placas se bloquearon por medio de incubación con leche al 4 % en PBS, antes de que se agregaran los anticuerpos anti-RSV o anti-RSV de cabra policlonal (Biodesign) en combinación con anticuerpos anti-IgG conjugados con enzima (diluciones 1:2500 para anti-IgG conjugado con HRP (Jackson). Se utilizó el sustrato TMB/solución de detención (Biosource) para el desarrollo de los ELISAs (figura 3B panel izquierdo). Además del lisado de células HEp-2 infectadas con RSV-A2, se utilizó la proteína F etiquetada con HIS de la cepa Larga de RSV (amablemente proporcionada por Frank Coenjaerts, UMCU, Utrecht en base a Ternette N, et al, (2007) *Vaccine* 25: 7271- 7279) para revestir las Placas Ni-NTA HisSorp (Qiagen) (figura 3B panel derecho). La

unión de los anticuerpos RSV F se detectó con el anticuerpo de detección de IgG conjugada con HRP (diluciones 1:2500, Jackson). En otro esquema los clones de células B originales se utilizaron para análisis FACS (figura 3C). Las células B se incubaron con la proteína F etiquetada con HIS recombinante y se detectó la unión al BCR con un anticuerpo anti-penta HIS etiquetado ALEXA flúor 647 (Qiagen).

### 5 (3) Trímeros RSV

Además de la proteína F derivada de la cepa larga de RSV recombinante se crearon trímeros F del RSV A2 insertando el marco de lectura abierto de F en un constructo el cual se fusiona a un dominio de cremallera de isoleucina seguido por 8 repeticiones HIS (ILZ-8xHIS). Los constructos de proteína se expresaron temporalmente en células 293T y se detectaron utilizando un protocolo de tinción intracelular utilizando el kit Fix Perm de BD (figura 3D).

### 10 Resultados

Todos los anticuerpos reconocieron la proteína RSV-F cuando se expresó mediante el VSV recombinante (figura 3A). Además, excepto por AM16, el reconocimiento dependió de la presencia de epítomos conformacionales en la proteína RSV-F puesto que los mismos no reconocieron un lisado de células HEP-2 infectadas con RSV (figura 3B panel izquierdo). Tampoco la proteína de la cepa larga de RSV-F recombinante etiquetada con HIS, purificada, fue reconocida por D25, AM14, AM22 y AM23 cuando se analizó en un ELISA directo (Figura 3B panel derecho). Sin embargo cuando las líneas de células B que expresan BCR se incubaron con este sobrenadante de cultivo no purificado de la proteína RSV-F etiquetada con HIS no se observó la unión a los clones de células B AM16, AM23 y fue menos fuerte en D25 (figura 3C). La proteína en este sobrenadante de cultivo no purificado posiblemente contiene una fracción de trímeros de RSV F que no se unen al BCR aunque solamente sean capturados como monómeros 15 en las Placas HisSorp. Sin embargo a pesar de que no se observó la captura de la proteína RSV-F en los BCRs del AM14 y las líneas de células B del AM22 (figura 3C). Por consiguiente el AM14 y AM22 se unen a diferentes epítomos. Posiblemente un bajo porcentaje de homotrímeros o dímeros de la proteína F estuvo presente en el sobrenadante de cultivo no tratado de la línea de células que producen la proteína F. Estas conformaciones F naturales pueden expresar los epítomos reconocidos por AM23 y D25, los cuales se perdieron en las condiciones de desnaturalización de los procedimientos ELISA. De un modo interesante, cuando se realizó una tinción intracelular en células 293T transfectadas con el constructo de trimerización RSV que contiene la secuencia ILZ-8xHIS se encontró que el AM22 reconoce el RSV F (figura 3D), sin embargo, AM14 aún no reconoce esta estructura de proteína. Por consiguiente el AM22 es único puesto que reconoce una conformación de la proteína RSV-F que no está presente en condiciones de desnaturalización y por consiguiente no está presente en la forma monomérica de la proteína. Solamente cuando se forzó a las proteínas RSV F a permanecer juntas y formar trímeros entonces se detectó la unión F mediante el anticuerpo AM22, una conformación que está presente en partículas de virus y por consiguiente se explica la alta potencia de neutralización del AM22.

### Ejemplo 3. Experimentos de potencia in vivo.

Para estudiar la potencia in vivo del anticuerpo monoclonal AM22 se realizaron experimentos en ratas Cotton.

#### Métodos

35 Se anestesiaron ratas Cotton de 7-9 semanas de edad, libres de patógenos (*Sigmodon hispidus*, Harlan Laboratories, Países Bajos) con isoflurano y se les dio 0.1 ml de anticuerpo purificado mediante inyección intramuscular (i.m.) a dosis de 2.0 o 0.4 mg kg<sup>-1</sup> para el anticuerpo de control, palivizumab, AM22, AM23 y D25, al mismo tiempo que se les administró AM14 a 0.4 y 0.1 mg kg<sup>-1</sup>. Veinticuatro horas después, los animales se anestesiaron, se desangraron para la determinación de hlgG en suero y se expusieron por instilación intranasal de 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> RSV-X (100 µl). Cinco días después los animales se sacrificaron y sus pulmones se cosecharon. Las titulaciones de virus pulmonares se determinaron y el límite de detección más bajo fue de 2.1 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> g<sup>-1</sup>. El Comité de Experimentos en Animales del Instituto de Vacunas de los Países Bajos aprobó todos los procedimientos que involucraban ratas Cotton.

#### Resultados

45 El panel del anticuerpo anti-RSV, excepto el AM16, se analizó en ratas Cotton. Los animales se trataron profilácticamente con 2.0 o 0.4 mg kg<sup>-1</sup> de anticuerpos monoclonales antes del RSV-X, se les administró intranasalmente un aislado de RSV A primario. Debido a la producción de anticuerpos relativamente baja, el anticuerpo AM14 se administró a 0.4 y 0.1 mg kg<sup>-1</sup>. El nivel de IgG humana recuperada del suero de ratas Cotton el día 1 (día de inoculación del virus) y día 5 (día del sacrificio), estuvo en el mismo rango de todos los anticuerpos y el descenso de anticuerpos con el tiempo fue comparable (figura 4A).

50 La recuperación del virus RSV de los pulmones de los animales sacrificados se redujo fuertemente en todos los grupos de animales tratados con 2.0 mg/kg de inmunoglobulina en comparación con el grupo de control (figura 4B). Los animales tratados con 0.4 mg kg<sup>-1</sup> de palivizumab y AM23 mostraron una replicación de virus significativa, mientras que en los grupos de AM14 y D25 uno de los 6 animales mostró replicación de virus detectable. No se pudo recuperar ningún virus de los animales tratados con AM22. Estos resultados demuestran que el AM22, que específicamente reconoce los epítomos conformacionales en la proteína RSV F, alberga fuertes capacidades de neutralización in vivo.

Análisis de patología pulmonar de ratas Cotton expuestas a RSV

Se retiró el pulmón izquierdo de cada rata Cotton el día 5 después de la infección con RSV i.n. y se acondicionó con formalina. La lesión pulmonar se clasificó entre 0-5 para tres marcadores individuales: 1) hipertrofia de bronquios y epitelio de bronquiolos, 2) inflamación que rodea los bronquios y bronquiolos (peribronquiolitis) y 3) inflamación en los alveolos (alveolitis). La suma promedio de las puntuaciones de todos los animales en un grupo creó el índice de patología (puntuación máxima 15) (figura 4c, tabla 2). La patología pulmonar después de la infección con RSV se redujo significativamente en los grupos de animales tratados con dosis altas de inmunoglobulina (2 mg kg<sup>-1</sup>) (tabla 3). Sin embargo solamente en los grupos AM14, AM22 y AM23 la patología se redujo significativamente a concentraciones más bajas (0.4 mg kg<sup>-1</sup>). Aunque se observó una ausencia completa de patología en 3 de los 5 animales tratados con AM22 y AM23 a 2 mg kg<sup>-1</sup>, en 0.4 mg kg<sup>-1</sup> se detectó la protección completa en 2 o 1 de los 6 animales en los grupos AM14 y AM22 respectivamente (tabla 3).

Al combinar los resultados de los ejemplos 1, 2 y 3 se concluye que el AM22 tiene ciertas ventajas. AM22 demuestra que el valor IC<sub>50</sub> más bajo, significa que con una cantidad más baja de AM22 se logran efectos profilácticos o terapéuticos similares en comparación con otros anticuerpos. El AM22 reconoce un epítipo diferente de la proteína F del RSV que los otros anticuerpos y por lo tanto se puede utilizar en combinación con uno de los otros anticuerpos para lograr una respuesta inmunógena más fuerte al RSV y mayor especificidad del anticuerpo contra el RSV. Finalmente, el tratamiento de ratas Cotton con AM22 dio como resultado una inhibición casi completa de la replicación del virus con ausencia completa potencial de la patología en estas ratas Cotton.

**Ejemplo 4: Afinidad de AM22 con la proteína F del RSV**

Al determinar la constante de afinidad y especificidad de unión entre la proteína F del RSV y el AM22 se prefiere establecer el valor profiláctico, terapéutico y de diagnóstico del anticuerpo. Este es un aspecto de exposición puesto que la afinidad del anticuerpo tiene que determinarse para una estructura de proteína oligomérica. Usualmente las constantes de afinidad se determinan contra agentes inmovilizados que se capturan en un fragmento. Sin embargo la proteína F capturada en un fragmento podría no ser reconocida por los anticuerpos AM14, AM22, AM23 y D25.

**Método**

"Afinidad de unión" generalmente se refiere a la concentración de la suma total de las interacciones no covalentes entre un sitio de unión único de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su asociado de unión (por ejemplo, un antígeno). La afinidad de una molécula X a su asociado Y generalmente se puede representar por la constante de disociación (K<sub>d</sub>) de equilibrio, la cual se calcula como la proporción K<sub>offi</sub>/K<sub>on</sub>. La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, tales como un ensayo con resonancia de plasmones superficiales (SPR). Las afinidades (KD), frecuencia activas (ka) y frecuencia inactivas (kd) se medirán por medio del análisis SPR con el instrumento IBIS-iSPR en IBIS Technologies BV (Hengelo, Países Bajos). Brevemente, los anticuerpos anti-RSV se inmovilizaron y purificaron, la proteína F del RSV (que contiene penta-HIS) se diluye y las constantes de frecuencia y afinidad se miden mediante la inyección de al menos tres diluciones en serie de la proteína.

Otra configuración en la maquina IMIS-iSPR es para inmovilizar 1) un anticuerpo anti-penta HIS en el cual la proteína F-penta HIS se acopla o 2) la proteína F-penta HIS se inmoviliza directamente en el fragmento y luego las muestras en el fragmento se incuban con los anticuerpos AIMM para determinar las constantes de afinidad.

Tabla 1. Actividad neutralizante del RSV de IgGs purificadas.

	RSV A2 <sup>a</sup>
palivizumab	152
D25	1.28
AM14	2.09
AM16	78.7
AM22	1.15
AM23	4.18

Los valores IC<sub>50</sub> (ng/ml) de las IgGs anti-RSV seleccionadas se determinaron con ensayo de cultivo TCID<sub>50</sub> estándar en células HEp2 con el virus RSV A2.

Tabla 2. Puntuación de patología acumulativa en ratas Cotton.

anticuerpo	mg/kg	Puntuación de patología (SEM)	Valores P
Palivizumab	2.0	3.20 (0.4)	0.0005
Palivizumab	0.4	5.40 (0.8)	<0.05
D25	2.0	3.40 (0.4)	0.0005
D25	0.4	5.83(1.0)	0.05
AM14	0.4	4.20 (0.8)	0.05
AM14	0.1	3.67(1.2)	0.05
AM22	2.0	2.75 (0.8)	0.0005
AM22	0.4	4.00 (0.9)	<0.05

AM23	2.0	2.40 (0.2)	0.0005
AM23	0.4	3.50 (0.9)	<0.05
Ctrl IgG1	2.0	8.80(1.1)	N.A.
MOCK	N.A.	1.80 (0.4)	0.0005

5 Puntuación de patología acumulativa de los pulmones de ratas Cotton, tratadas 24 horas antes de la infección de RSV con los anticuerpos indicados. Los especímenes de pulmón obtenidos 5 días después de la infección fueron evaluados por un patólogo al azar. La patología pulmonar se clasificó con puntuaciones entre 0-5 para tres marcadores individuales: 1) hipertrofia de bronquios y epitelio de bronquiolos, 2) peribronquiolitis y 3) alveolitis. La puntuación de la patología promedio (puntuación máxima 15) con error estándar de la media (SEM) y diferencias estadísticas en relación al grupo Ctrl IgG1 se calculó con la prueba Wilcoxon parcial. Los experimentos se realizaron dos veces con cuatro a seis animales individuales por grupo de tratamiento. N.A. no aplicable.

Tabla 3. Prevención de la patología en ratas Cotton.

anticuerpo	mg/kg	Reducción significativa en la patología	Sin patología
Palivizumab	2	5/5	1/5
Palivizumab	0.4	3/5	0/6
D25	2	5/5	0/5
D25	0.4	2/6	0/6
AM14	0.4	5/6	2/6
AM14	0.1	4/5	0/5
AM22	2	5/5	3/5
AM22	0.4	5/6	1/6
AM23	2	5/5	3/5
AM23	0.4	5/6	0/6

10 El número de animales con reducción significativa en/o ausencia de patología pulmonar en el día 5 durante la infección con RSV-X. Los experimentos se realizaron dos veces con cuatro a seis animales individuales por grupo de tratamiento.

**REIVINDICACIONES**

1.- Un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o una parte funcional del mismo, caracterizado porque es capaz de enlazar o unirse específicamente a la proteína F del Virus Respiratorio Sincicial (RSV) y el cual comprende:

- 5 - una secuencia de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de cadena pesada que comprende la secuencia KLSIH,
- una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia GYEGEVDEIFYAQKFQH,
- una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia LGVTVTEAGLGIDDY,
- una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia RASQIVSRNHLA,
- una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia GASSRAT, y
- 10 - una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia LSSDSSI.

2. El anticuerpo o parte funcional del mismo de conformidad con la reivindicación 1, donde (a) la secuencia de cadena pesada comprende una secuencia la cual es al menos 90% idéntica a la secuencia

QVQLVQSGAEVKKPGATVKVSKISGHTLIKLSIHWVRQAPGKGLEWMGG  
 YEGEVDEIFYAQKFQHRLTVIADTATDTVYMELGRLTSDDTAVYFCGTLGV  
 TVTEAGLGIDDYWGQGLTVTVSS (Figura 2);

(b) la secuencia de cadena ligera comprende una secuencia la cual es al menos 90% idéntica a la secuencia

15 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQIVSRNHLAWYQQKPGQAPRLLIFGA  
 SSRATGIPVRFSGSGSDFTLTINGLAPEDFAVYYCLSSDSSIFTFGPGTKV  
 DFK (Figura 2);

(c) la secuencia de cadena pesada comprende la secuencia

QVQLVQSGAEVKKPGATVKVSKISGHTLIKLSIHWVRQAPGKGLEWMGG  
 YEGEVDEIFYAQKFQHRLTVIADTATDTVYMELGRLTSDDTAVYFCGTLGV  
 TVTEAGLGIDDYWGQGLTVTVSS (Figura 2);

(d) la secuencia de cadena ligera comprende la secuencia

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQIVSRNHLAWYQQKPGQAPRLLIFGA  
 SSRATGIPVRFSGSGSDFTLTINGLAPEDFAVYYCLSSDSSIFTFGPGTKVDFK  
 (Figura 2);

20 (e) la secuencia de cadena pesada comprende una secuencia la cual es al menos 90% idéntica a la secuencia

QVQLVQSGAEVKKPGATVKVSKISGHTLIKLSIHWVRQAPGKGLEWMGG  
 YEGEVDEIFYAQKFQHRLTVIADTATDTVYMELGRLTSDDTAVYFCGTLGV TVTEAGLGIDDYWGQGLTVTVSS (Figura 2)  
 y la secuencia de cadena ligera comprende una secuencia la cual es al menos 90% idéntica a la secuencia  
 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQIVSRNHLAWYQQKPGQAPRLLIFGA  
 SSRATGIPVRFSGSGSDFTLTINGLAPEDFAVYYCLSSDSSIFTFGPGTKVDFK  
 (Figura 2);

25 (f) una secuencia de cadena pesada comprende una secuencia la cual es al menos 90% idéntica a la secuencia  
 QVQLVQSGAEVKKPGATVKVSKISGHTLIKLSIHWVRQAPGKGLEWMGG  
 YEGEVDEIFYAQKFQHRLTVIADTATDTVYMELGRLTSDDTAVYFCGTLGV TVTEAGLGIDDYWGQGLTVTVSS (Figura 2)  
 y la secuencia de cadena ligera comprende la secuencia

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQIVSRNHLAWYQQKPGQAPRLLIFGA  
 SSRATGIPVRFSGSGSDFTLTINGLAPEDFAVYYCLSSDSSIFTFGPGTKVDFK  
 (Figura 2);

30 (g) la secuencia de cadena pesada comprende la secuencia

QVQLVQSGAEVKKPGATVKVSKISGHTLIKLSIHWVRQAPGKGLEWMGG  
 YEGEVDEIFYAQKFQHLRHLTVIADTATDTVYMELGRLTSSDDTAVYFCGTLGV TVTEAGLGIDDYWGQGLTLTVSS (Figura 2)  
 y la secuencia de cadena ligera comprende una secuencia la cual es al menos 90% idéntica a la secuencia

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQIVSRNHLAWYQQKPGQAPRLLIFGA  
 SSRATGIPVRFSGSGSGTDFLTINGLAPEDFAVYYCLSSDSSIFTFGPGTKVD  
 FK (Figura 2); o

5 (h) la secuencia de cadena pesada comprende la secuencia

QVQLVQSGAEVKKPGATVKVSKISGHTLIKLSIHWVRQAPGKGLEWMGG  
 YEGEVDEIFYAQKFQHLRHLTVIADTATDTVYMELGRLTSSDDTAVYFCGTLGV TVTEAGLGIDDYWGQGLTLTVSS (Figura 2)  
 y la secuencia de cadena ligera comprende la secuencia

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQIVSRNHLAWYQQKPGQAPRLLIFGA  
 SSRATGIPVRFSGSGSGTDFLTINGLAPEDFAVYYCLSSDSSIFTFGPGTKVDFK  
 (Figura 2).

10 3. - El anticuerpo o parte funcional del mismo de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque se conjuga al PEG o Albúmina, y/o el cual comprende:

- un epítipo de unión del receptor de rescate, y/o;
- residuos de aminoácidos modificados identificados como involucrados en la interacción entre un Fc y un receptor FcRN, y/o

15 - residuos de aminoácidos no presentes de manera natural.

4. - El anticuerpo o parte funcional del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 caracterizado porque comprende una región Fc la cual comprende una modificación en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, y 443, tal como se numeran por el índice EU como se establece en Kabat et al., dicha modificación comprende una sustitución de aminoácidos, y/o una inserción de aminoácidos, y/o una eliminación de aminoácidos.

20 5. El anticuerpo o parte funcional del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho anticuerpo o parte funcional del mismo tiene una constante de disociación ( $K_d$ ) de menos de  $1 \times 10^{-2}M$ ,  $1 \times 10^{-3}M$ ,  $1 \times 10^{-4}M$ ,  $1 \times 10^{-5}M$ ,  $1 \times 10^{-6}M$ ,  $1 \times 10^{-7}M$ ,  $1 \times 10^{-8}M$ ,  $1 \times 10^{-9}M$ ,  $1 \times 10^{-10}M$ ,  $1 \times 10^{-11}M$ ,  $1 \times 10^{-12}M$ ,  $1 \times 10^{-13}M$ ,  $1 \times 10^{-14}M$  o menos de  $1 \times 10^{-15}M$ .

25 6. El anticuerpo o parte funcional del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el cual es un anticuerpo humano.

7. El anticuerpo o parte funcional del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la parte funcional del mismo es un anticuerpo de cadena única, un fragmento variable de cadena única (sFv), un fragmento Fab o un fragmento F(ab')<sub>2</sub>.

30 8. Una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, o un equivalente funcional de la misma, que codifica el anticuerpo o parte funcional del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 6 o 7.

9. La secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional de la misma de conformidad con la reivindicación 8, la cual comprende las secuencias

aaattatccattcac,  
 ggttatgagggtgaggctgatgagatttctacgcacagaagttccagcac,  
 ctagggtgacagtgactgaggctggactgggatcgatgactac,  
 agggccagtcagattgtagcaggaaccacttagcc, ggtgctccagtcgggccact y  
 ctgcctctgattcctcata.

35 10. La secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional de la misma de conformidad con la reivindicación 8, la cual comprende la secuencia de nucleótidos de las secuencias de cadena pesada y/o cadena ligera de la figura 2.

11. - Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.

12. - Una célula aislada o recombinante que comprende o se modifica para expresar la secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, y/o el vector de conformidad con la reivindicación 11.

13. Una combinación que comprende:

5 (a) el anticuerpo o parte funcional del mismo, o secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional, o vector, o célula de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y

(b) un agente específico al RSV diferente, preferiblemente un anticuerpo, donde el anticuerpo es preferiblemente Palivizumab y/o AM14 y/o AM16 y/o AM23 y/o D25.

14. Una composición farmacéutica que comprende:

10 (a) el anticuerpo o parte funcional del mismo, o una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional de la misma, o vector, o célula o combinación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y

(b) un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 15. El anticuerpo o parte funcional del mismo, o una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional, o vector, o célula, o combinación o composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso como un medicamento y/o agente profiláctico para al menos en parte tratar y/o prevenir un padecimiento relacionado con el RSV.

20 16. - Un método para producir un anticuerpo o parte funcional, del mismo, de conformidad con las reivindicaciones 1 a 7, que comprende proporcionar una célula con una secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional de la misma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 o un vector de conformidad con la reivindicación 11 y permitir trasladar dicha célula a dicha secuencia de ácido nucleico o equivalente funcional de la misma o dicho vector, para producir así dicho anticuerpo o parte funcional del mismo.

17.- El método de conformidad con la reivindicación 16, que comprende además cosechar, purificar y/o aislar dicho anticuerpo o parte funcional del mismo.

Figura 1

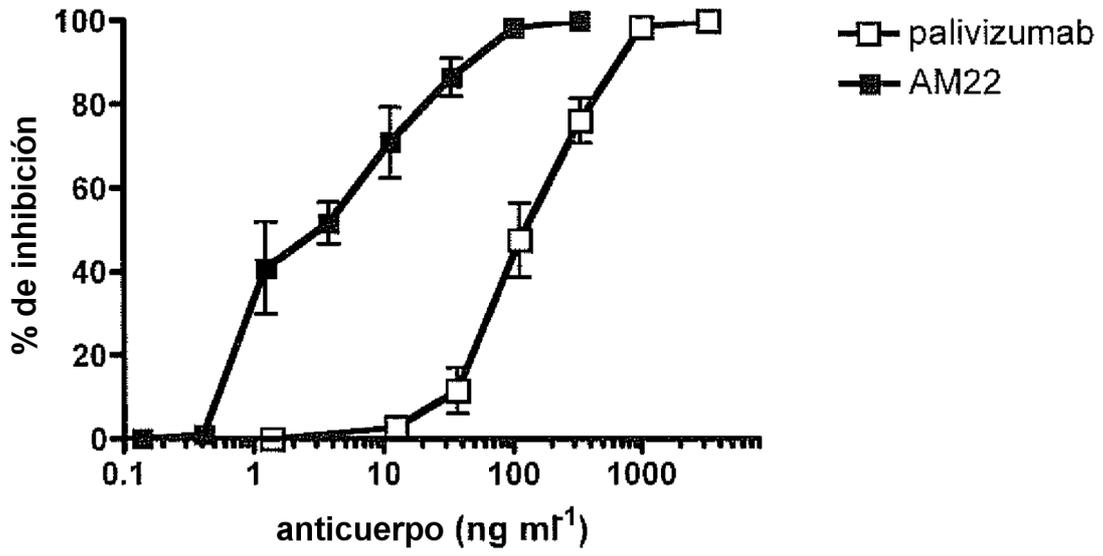


Figura 2

Clon de nAb AM222 contra RSV

NB: Numeración CDR según Kabat et al (1991)

Cadena pesada

**Recombinado de segmentos génicos:**

IGHV1-24\*01

IGHD6-19\*01

IGHJ4\*02

**AMINOÁCIDO:**

Fw1 QVQLVQSGAEVKKPGATVKVSKISGHTLI

CDR1 KLSIH

Fw2 WVRQAPGKGLEWMS

CDR2 GYEGEVDEIFYAQKFSH

Fw3 RLTVIADTATDTVYMEIGRLTSDDTAVYFCGT

CDR3 LGVTVTEAGLGIDY

Fw4 WGQGLVTVSS

**NUCLEÓTIDO:**

Fw1 cag gtc cag ctg gta cag tct ggg gct gag gtg aag aag ccc ggg gcc aca gtg aaa  
gtc tcc tgc aag att tcc gga cac acc ctc att

CDR1 aaa tta tcc att cac

Fw2 tgg gtg cga cag gct cct gga aag ggg ctt gag tgg atg gga

CDR2 ggt tat gag ggt gag gtc gat gag att ttc tac gca cag aag ttc cag cac

Fw3 aga ctc acc gtg atc gcc gac aca gcg aca gac aca gtc tac atg gaa ctg ggc agg  
ctc acc tct gac gac acg gcc gtc tat ttc tgt gga aca

CDR3 cta ggt gtg aca gtg act gag gct gga ctg ggg atc gat gac tac

Fw4 tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

Cadena ligera

**Recombinado de segmentos génicos:**

IGKV3-20\*02

IGKJ3\*01

**AMINOÁCIDO:**

Fw1 EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC

CDR1 RASQIVSRNHIA

Fw2 WYQQKPGQAPRLIF

**Figura 2, continuación**

CDR2 GASSRAT

Fw3 GIPVRFSGSGSGTDFLTINGLAPEDEFAVYYC

CDR3 LSSDSSI

Fw4 FTFGPGTKVDFK

**NUCLEÓTIDO:**

Fw1 gaa att gtg ttg aca cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca gga gaa aga gcc  
acc ctc tcc tgc

CDR1 agg gcc agt cag att gtt agc agg aac cac tta gcc

Fw2 tgg tac cag caa aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc ttt

CDR2 ggt gcg tcc agt cgg gcc act

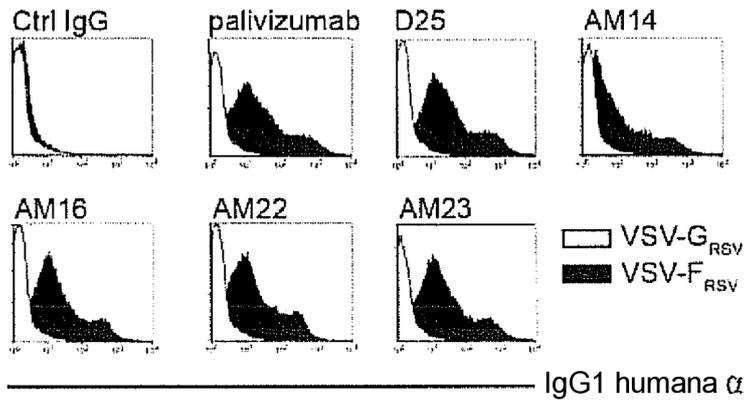
Fw3 ggc atc cca gtc cgg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc  
aac gga ctg gcg cct gaa gat ttt gca gtt tac tac tgt

CDR3 ctg tcc tct gat tcc tcc ata

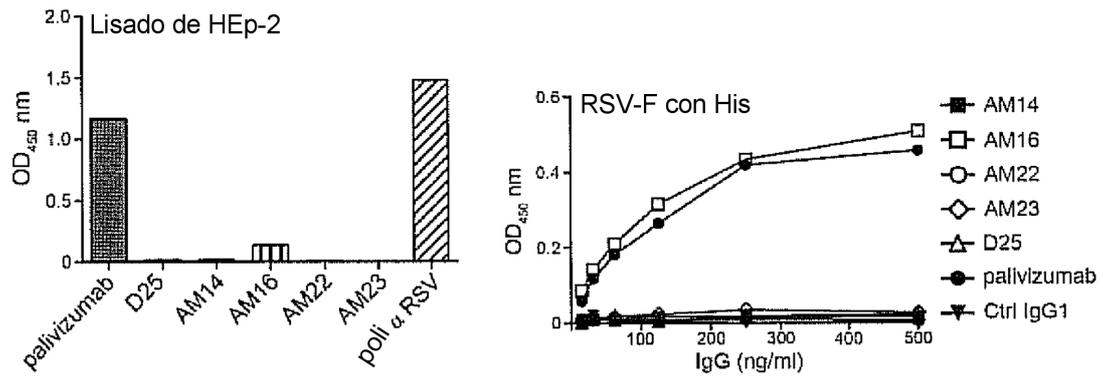
Fw4 ttc aca ttc ggc cct ggg acc aag gtg gat ttc aaa

Figura 3

A



B



C

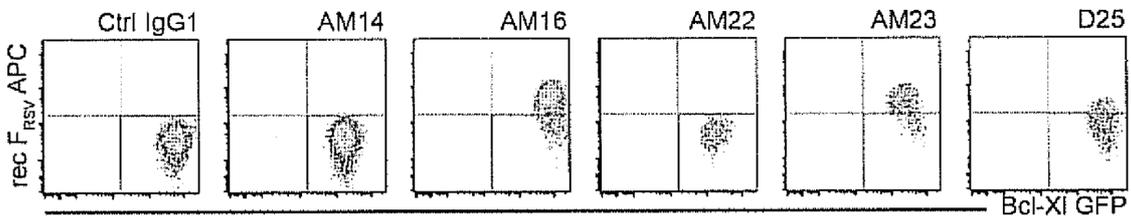


Figura 3, continuación

D

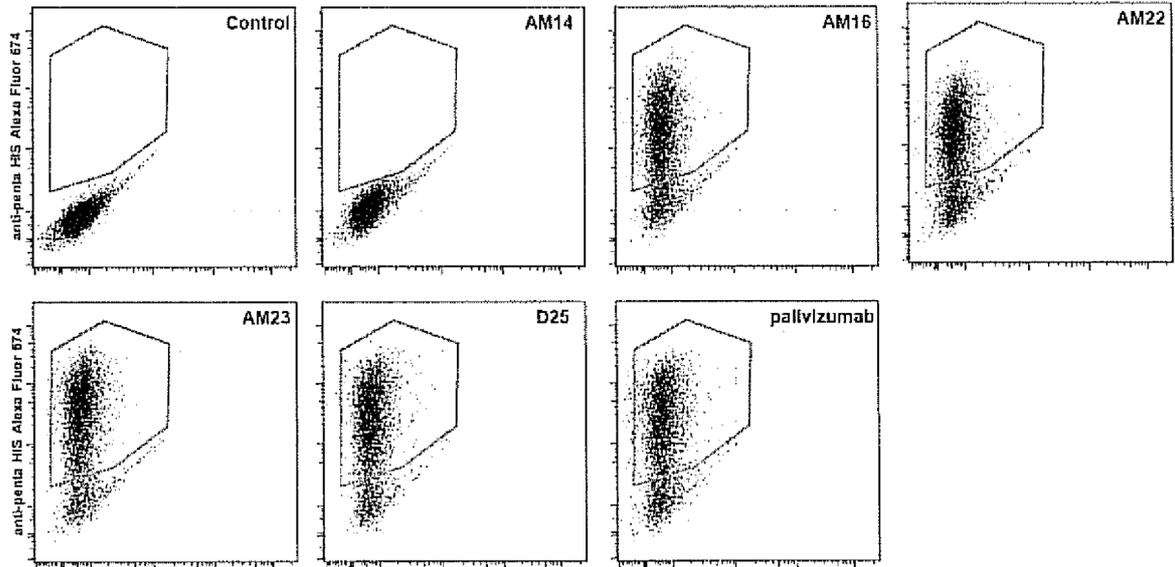
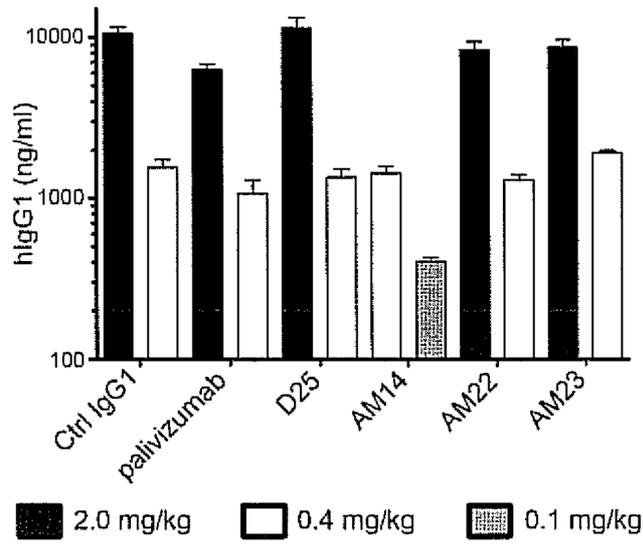


Figura 4

A



B

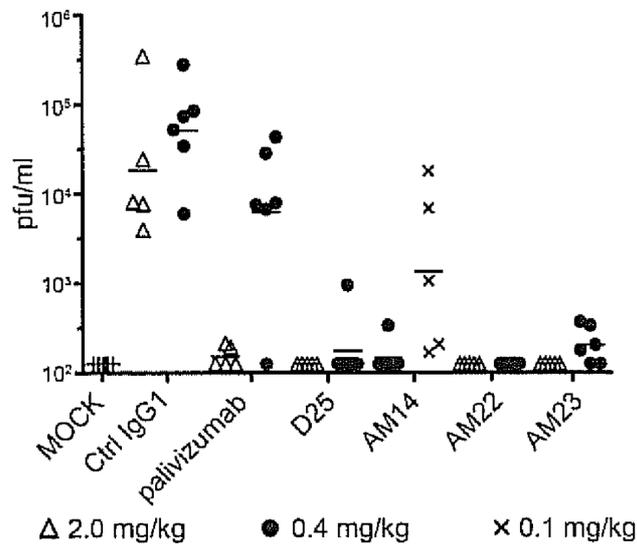


Figura 4, continuación

C

