

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 236**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10	(2006.01)
A61P 31/14	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01)
A61K 39/42	(2006.01)
C12P 21/08	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2011 PCT/SG2011/000436**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12082073**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2011 E 11848839 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2651975**

54 Título: **Anticuerpo humano monoclonal con especificidad para el virus Dengue serotipo 1 E proteína y usos de la misma**

30 Prioridad:

14.12.2010 US 423085 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2017

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE (50.0%)
21 Lower Kent Ridge Road
Singapore 119077, SG y
DSO NATIONAL LABORATORIES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MACARY, PAUL ANTHONY;
TEOH, EE PING EVELYN;
HANSON, BRENDON JOHN;
TEO, EN WEI;
LIM, ANGELINE PEI CHIEW;
NG, MAH LEE MARY;
LOK, SHEE MEI y
KUKKARO, PETRA EVELIINA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 644 236 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).

Anticuerpo humano monoclonal con especificidad para el virus Dengue serotipo 1 E proteína y usos de la misma**Descripción****CAMPO**

La invención se refiere a anticuerpos humanos monoclonales neutralizantes para el virus del Dengue, en particular, el serotipo 1. La invención se refiere además a composiciones y métodos para el tratamiento o la prevención de la infección por virus del Dengue en un sujeto vertebrado. Se proporcionan métodos para administrar anticuerpos al sujeto vertebrado en una cantidad eficaz para reducir, eliminar o prevenir la recaída de la infección.

FONDO

El Dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos más significativa que afecta a seres humanos. En la actualidad, cerca de 2.500 millones de personas que viven en más de 100 países endémicos del Dengue en el cinturón tropical/subtropical se consideran en riesgo de infección por Dengue. Las especies de mosquitos residen en zonas urbanas, *Aedes aegypti* es el principal transmisor del virus a los seres humanos. La infección con el virus del Dengue puede dar lugar a un espectro de manifestaciones clínicas que van desde la infección asintomática a través de la fiebre del Dengue (DF), una enfermedad febril aguda, a la fiebre hemorrágica del Dengue y el síndrome de shock del Dengue que son complicaciones graves para la vida, tipificadas por fuga vascular. El tratamiento actual se limita al uso de analgésicos para aliviar los síntomas y no hay vacunas disponibles. Las enfermedades del Dengue afectan a 50 millones de personas anualmente, con epidemias frecuentes y recurrentes. La década de 1990 vio un regreso de las enfermedades del Dengue en diversas áreas del mundo a pesar de los estrictos controles de mosquitos, culminando con el brote más grande jamás en 2005 en Singapur. Más del 80% de los casos reportados fueron adultos jóvenes con un impacto asociado en su capacidad para trabajar, más costos de atención médica significativos para su tratamiento. Por lo tanto, se necesitan urgentemente alternativas a las vacunas contra el Dengue, como las terapias con anticuerpos pasivos y/o antivirales para ayudar a controlar las enfermedades asociadas al Dengue en el plazo inmediato. Estas terapias propuestas tienen el potencial de ayudar a un gran número de individuos infectados, aunque sólo se aplique a individuos con riesgo de desarrollar formas graves de enfermedad (alrededor del 10% del total). Con el aumento de la prevalencia del Dengue en los países desarrollados, como el sur de los Estados Unidos, más Australia, y la ausencia de una vacuna, un anticuerpo podría proporcionar una medicación útil. La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales completamente humanos para satisfacer estas y otras necesidades.

RESUMEN

Se describen aquí composiciones y métodos para el tratamiento o prevención de la infección por virus del Dengue en un sujeto vertebrado.

En particular, se describe aquí un ejemplo de la generación de anticuerpos neutralizantes monoclonales completamente humanos de pacientes recién recuperados de la infección con el serotipo de Dengue 1. El anticuerpo exhibe actividad tanto profiláctica como terapéutica en el bloqueo de la infección de serotipo de Dengue 1 *in vitro* e *in vivo* y puede formar la base de un nuevo medicamento. La invención utiliza un método para preparar células B de memoria inmortalizadas de pacientes convalecientes purificando sus células CD22 positivas de una muestra de sangre tomada 60 días después de que el paciente se ha recuperado de la infección. Las células B purificadas se immortalizan después, empleando la infección por el virus Epstein Barr (EBV). Este método genera un panel de líneas de células B de memoria inmortalizadas capaces de producir anticuerpos totalmente humanos que pueden ser examinados en cuanto a especificidad para el virus de Dengue. Estas líneas de células B a continuación, se pueden utilizar como una fuente enriquecida de plantillas de inmunoglobulina para la identificación y clonación de anticuerpos monoclonales recombinantes con actividad neutralizante para el virus de Dengue *in vitro* e *in vivo*. Como se describe en este documento, se describe el aislamiento, la detección, la clonación y caracterización *in vitro/in vivo* del primer anticuerpo monoclonal totalmente humano específico para serotipo de Virus de Dengue 1.

La invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une específicamente a una proteína de envoltura (E) de serotipo de virus de Dengue 1 o fragmento de la misma, en la que el anticuerpo es un anticuerpo humano con la actividad neutralizante que se une a través de dos proteínas E en un virus, en el que la unión a través de dos proteínas E comprende la unión a DI y la bisagra entre DI y II sobre una proteína E y DIII de una proteína E vecina.

En diversas realizaciones de este aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo puede ser (a) una molécula de inmunoglobulina entera; (b) un scFv; (c) un fragmento Fab; (d) un F(ab')₂; o (e) un Fv unido a disulfuro.

En otras realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender una cadena pesada de inmunoglobulina de dominio constante seleccionada del grupo que consiste en: (a) un dominio constante de IgM humana; (b) un dominio constante de IgG1 humana; (c) un dominio constante de IgG2 humana; (d) un dominio

constante de IgG3 humana; (e) un dominio constante de IgG4 humana; o (f) un dominio constante de IgA1/2 humana.

5 En otras realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender un dominio constante de inmunoglobulina de cadena ligera que puede ser: (a) un dominio constante de Ig kappa humana; o (b) un dominio constante de Ig lambda humana.

10 En realizaciones adicionales, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDR seleccionada del grupo de secuencias de CDR se muestra en la Figura 4 (B).

En realizaciones adicionales, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una cadena ligera que comprende al menos una CDR seleccionada del grupo de secuencias CDR mostradas en la Figura 4 (B).

15 En otras realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una cadena pesada que comprende tres secuencias de CDR como se muestra en la Figura 4 (B).

En otras realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una cadena ligera que comprende tres secuencias CDR como se muestra en la Figura 4 (B).

20 En realizaciones adicionales, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un marco de cadena pesada de IGHV1-2 * 02 y al menos una de las secuencias de CDR, como se muestra en la Figura 4 (B).

25 En otras realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un marco de cadena ligera de IGKV3-20 * 01 y al menos una de las secuencias de CDR, como se muestra en la Figura 4 (B).

En una realización, el anticuerpo comprende la secuencia de cadena pesada mostrada en la Figura 4 (B).

En otra realización, el anticuerpo comprende la secuencia de cadena ligera mostrada en la Figura 4 (B).

30 En aún otra realización, el anticuerpo es 14c10, clon 8.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo se une a un antígeno con una constante de afinidad (K_D) de menos de 1×10^{-8} M.

35 En otras realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo se une a un antígeno con una constante de afinidad (K_D) de menos de 1×10^{-9} M.

En realizaciones adicionales, el anticuerpo o fragmento del mismo se deriva de una célula B de un paciente que se ha recuperado de la infección por virus de Dengue.

40 En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un virus de Dengue que tiene la especificidad de unión de 14c10, clon 8.

45 En una realización adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones relevantes anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable eficaz para reducir o prevenir la infección por virus de Dengue en un sujeto. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender además un segundo agente, por ejemplo, un fármaco antiviral o un fármaco analgésico.

50 En una realización adicional, la invención proporciona el uso del anticuerpo en un método de inmunización pasiva que comprende la administración a un sujeto de una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones relevantes anteriores.

55 En una realización adicional, la invención proporciona el uso del anticuerpo en un método de tratamiento de la infección por virus de Dengue que comprende la administración a un sujeto en necesidad del mismo de una cantidad de anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones relevantes anteriores, eficaz para reducir o prevenir la enfermedad.

60 En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra por vía intravenosa (IV), subcutánea (SC), intramuscular (IM), transdérmica, o por vía oral.

En otras realizaciones, el anticuerpo se administra en una cantidad en el intervalo de 1 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal del sujeto.

65 Tal administración puede comprender además la administración de un segundo agente, que puede, por ejemplo, ser un fármaco antiviral o un fármaco analgésico.

En otras realizaciones, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de los aspectos y formas de realización pertinentes anteriores. Dichos ácidos nucleicos aislados pueden estar contenidos en un vector de expresión. Tales vectores de expresión pueden estar contenidos dentro de una célula huésped, tal como una célula bacteriana, eucariótica o de mamífero.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Diagrama de flujo del proceso de examen, expresión y cromatografía de anticuerpos. Se aislaron células B CD22+ de pacientes infectados con Dengue ingresados en el Hospital Universitario Nacional (NUH). Estas células B se immortalizan con EBV en presencia de un activador de células B policlonales (2,5 µg/ml de secuencias CpG, IL2 e IL4) que se añadieron para mejorar la eficiencia de la immortalización. Las células B se colocaron en placas a 30 células/pocillo en 96 pocillos de pocillos de fondo redondo con 1x10⁵ alogénico, PBMCs irradiadas obtenidas a partir de capas leucocitarias. Después de dos semanas, los sobrenadantes de estos clones se rastrearán mediante ELISA, PRNT y CPE para la actividad de unión/neutralización. ARNm de las líneas de células B positivas se extrajeron y las secuencias de cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo clonado en un vector pCMV en casa y transfectadas en células Freestyle® 293F para producir altas concentraciones de anticuerpos recombinantes. Se identificaron y caracterizaron los anticuerpos recombinantes con la especificidad deseada.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 2: Selección de sobrenadantes de líneas de células B inmortalizadas con CPE y PRNT para la actividad de neutralización del Dengue. Células BHK-21 (A) fueron desafiadas con DV en presencia de sobrenadantes derivados de líneas de células B inmortalizadas por EBV. (2000 líneas celulares por paciente se seleccionaron utilizando este enfoque). El efecto citopático se evaluó mediante tinción de las células restantes intactas con elución de violeta cristal con ácido acético y determinación de la absorbancia a 595 nm. El punto final del ensayo se definió como un efecto citopático de 50% y se optimizó la concentración viral. Los sobrenadantes de la prueba se rastrearán inicialmente a una dilución de 1 en 4. El 10% superior de los clones se volvió a probar por PRNT. (B) Generación de línea celular de linfocitos B humana que secretan anticuerpos neutralizantes humanos contra el Dengue. Las células BHK al 80% de confluencia fueron infectadas con el virus de Dengue durante 3 días. Las placas virales se visualizaron utilizando tinte violeta cristal (Sigma-Aldrich, Singapur) que se une a células viables. Los sobrenadantes de clones de células B (derivados de un individuo infectado con Dengue 1 convaleciente) se ensayaron en cuanto a la actividad neutralizante. Dengue 1 (50 pfu) se incubó con sobrenadantes de cultivo celular (diluido 1/4) durante 1 hora antes de la adición a células BHK. Se encontró que la línea celular 14c10 secretaba anticuerpos que reducen significativamente el número de placas.

Figura 3: Plantillas de anticuerpos expresadas por la línea de células B 14c10 y las secuencias de aminoácidos CDR asociadas. (A) La mapa de plásmido que demuestra sitios de enzimas de restricción y la clonación de insertos de cadenas pesada y ligera para la generación de un anticuerpo humano IgG1 recombinante utilizando plantillas identificadas a partir de 14c10. (B) Todas las secuencias identificadas y clonadas de cadena pesada y ligera de 14c10 con sus regiones CDR (CDR 1, CDR 2 y CDR 3 respectivamente) más 12 permutaciones de combinaciones de cadena pesada y ligera para hacer diferentes anticuerpos recombinantes.

Figura 4: El modelo del Anticuerpo 14c10.8 codifica un anticuerpo recombinante con la actividad de unión para el serotipo del Dengue 1. (A) ELISA intercalado empleado para ensayar todos los anticuerpos expresados de manera recombinante derivados de la línea celular B 14c10 expresada y purificada a partir de sobrenadantes de 293F. El modelo número 8 claramente da una señal positiva para el serotipo del virus de Dengue 1. (B) Nucleótidos completos y la secuencia de aminoácidos de 14c10.8 cadenas pesada y ligera con regiones CDR resaltados.

Figura 5: La especificidad del serotipo del anticuerpo 14c10.8 recombinante con PRNT y ELISA. (A) ELISA intercalado que muestra la especificidad del anticuerpo IgG1 recombinante 14c10 contra serotipo de virus de Dengue 1 entero vivo. Ninguna actividad de unión observable para serotipos de Dengues 2,3 ó 4. (B) Datos de PRNT que muestran especificidad de anticuerpo recombinante 14c10.8 contra Westpac 74 serotipos de virus de Dengue 1. No se detectó actividad neutralizante significativa para serotipo de Dengue 2,3 ó 4. (C) Datos crudos de PRNT que muestran especificidad de serotipo de 14c10.8 para el serotipo de virus de Dengue 1.

Figura 6: 14c10.8 exhibe mejora dependiente de anticuerpo homotípico (ADE), pero no mejora dependiente de anticuerpos heterotípicos para la infección por Dengue in vitro. Se incubó el anticuerpo 14c10.8 diluido en serie con un volumen igual de virus (MOI de 1) durante 1 h a 37°C y luego se transfirió a la línea celular mielomonocítica humana K562 (la línea celular usualmente empleada para los ensayos de ADE) y se incubó a 37°C durante 4 días. Los sobrenadantes se recogieron después de las células K562 infectadas y el título viral resultante se evaluó mediante PRNT. La ADE se define como el aumento de los títulos víricos en comparación con los controles en los que no se añade anticuerpo (línea azul punteada). Los datos demostraron la presencia de ADE en el serotipo de virus de Dengue 1, pero no en los serotipos 2, 3 y 4. Esta observación sugiere que 14c10.8 debe ser un anticuerpo seguro para dar a los pacientes infectados con Dengue 1 siempre que se administre a concentraciones neutralizantes en lugar de aumentarlas. **Figura 7: Conversión de 14c10.8 a diferentes subclases de IgG humanas tiene un impacto en su actividad de mejora homotípica.** Convertimos 14c10 de una IgG1 humana a una IgG3 humana y IgG4 humana usando las construcciones esbozadas. Éstas se expresaron como anticuerpos recombinantes en células 293F y después se purificaron en columnas de sefarsa de Proteína-A para ensayos adicionales. Hacemos la prueba de mejora homotípica utilizando las líneas celulares K562 como se describe en la FIG. 6. IgG3 exhibe máxima actividad potenciadora,

mientras que IgG1 es intermedia y IgG4 tiene los niveles más bajos de la actividad de aumento.

Figura 8: 14c10.8 es específico para la proteína E del virus de Dengue. (i) Las células se infectaron con DV durante dos días. Después, las células se lisaron y se añadió metionina S³² a la mezcla del virus para incorporar el compuesto radiactivo. Se añadió anticuerpo a la mezcla seguido de la adición de perlas de proteína A-agarosa y se incubaron durante 1 hora a 4°C. Después del lavado, las proteínas se eluyeron con tampón de carga no reductor y se aplicaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 15% seguido de tinción con plata de acuerdo con el protocolo de fabricación (kit de tinción SilverQuest, Invitrogen). Una banda de 56 Kd corresponde a la proteína E del virus Dengue. (ii) Virus de Dengue purificado entero (desnaturalizado y no desnaturalizado) se cargó en gel no desnaturalizante y se transfirió a una membrana que se borró con anticuerpo 14C10. Los resultados mostraron que 14C10 tiene unión débil a un epítipo lineal sobre la proteína E de Dengue.

Figura 9: Actividad de neutralización del anticuerpo 14c10 recombinante contra varios genotipos del serotipo 1 del Dengue. Se añadieron concentraciones crecientes de anticuerpo a 50 unidades formadoras de placas (pfu) de varios genotipos de serotipo de virus de Dengue 1 (el nombre del genotipo viral se proporciona entre paréntesis) y se incubaron a 37°C durante 1 h. 100 µl de mezcla se añadió a una monocapa de células BHK-21 en una placa de 24 pocillos y se incubó durante 1 hora a 37°C. Se separó el sobrenadante y se colocó una capa de 1 ml de carboximetilcelulosa al 2% (p/v) en RPMI más FBS al 2% sobre las células infectadas. Después de una incubación adicional a 37°C durante 4 días, los pocillos se tiñeron con violeta cristal al 0,5% (p/v) disuelto en formaldehído al 25% (v/v) para visualizar las placas.

Figura 10: 14c10 exhibe la actividad tanto profiláctica como terapéutica *in vivo*: (A) La actividad profiláctica de 14c10.8 se observó mediante la inyección de ratones de GA129 (n = 6) con diversas concentraciones de anticuerpo 24 horas antes de la infección con el serotipo del Dengue 1. Una única dosis terapéutica de 250 µg/ratón de anticuerpo fue administrada a una sola cohorte (n = 6) 24 horas después de la infección del virus de Dengue. La viremia resultante se cuantificó en el suero sanguíneo de ratones infectados por PRNT 4 días después de la infección. (B) 14c10.8 exhibe actividad profiláctica a concentraciones de 1-5 µg/ratón. A concentraciones más bajas de anticuerpo hay alguna evidencia de infección mejorada.

Figura 11: HM14c10 es un anticuerpo humano específico para DENV1. (A) HM14c10 exhibe actividad de neutralización específica para DENV1 con 50% y 90% de los valores PRNT de 0.328 µg/ml y 1,313 µg/ml, respectivamente. (B) HM14c10 induce ADE homotípica para DENV1 a concentraciones sub-neutralizantes pero no ADE heterotípicos para DENV2, DENV3 o DENV4. HM4G2 induce la actividad de ADE para los 4 serotipos (C) (a) El fragmento Fab o mutación (N297Q) de la región Fc de IgG1 de HM14c10 redujeron significativamente ADE homotípica. (b) Las diferentes subclases de IgG humana (HM14c10) median niveles diferenciales de ADE homotípica. (D) HM14c10 es altamente neutralizante para múltiples genotipos DENV1 en comparación con HM4G2. Los genotipos se indican entre paréntesis al lado de la designación del virus. Las barras de error representan desviaciones estándar de muestras triplicadas y todos los experimentos se realizaron al menos tres veces.

Figura 12: HM14c10 se une a un epítipo dependiente de estructura cuaternaria de virus. (A) Mapa cryoEM de complejo Fab 14c10:DENV1 que muestra unión de 120 Fab (azul) a proteínas 180 E en la superficie del virus (cian). El triángulo negro representa una unidad asimétrica. (B) Vista de densidades de conexión de Fab HM14c10 (I) a epítipo de proteína E (esferas de color púrpura). Proteína E, E-DI, DII-E y E-DIII son de color rojo, amarillo y azul, respectivamente. (C) Las densidades de moléculas Fab en cadenas C α de proteína E en dos unidades asimétricas. Fab HM14c10(I) y HM14c10(II) son las dos moléculas independientes en una unidad asimétrica. (D) Los epítipos de Fab HM14c10 (I) (esferas de color púrpura) y HM14c10 (II) (esferas cian) en las tres proteínas E (sombreadas en gris) en una unidad asimétrica.

Figura 13: HM14c10 bloquea la fijación de DENV1 a células BHK y exhibe actividad protectora potente *in vivo*. (A) Microscopía confocal de tiempo de lapso que demuestra la infección de DENV1 de células huésped BHK en presencia de (a) mAb de control de isotipo, (b) HM4G2 y (c) HM14c10 mAb. Paneles izquierdos: DENV1 y Mabs se marcaron con Alexafluor-647 (rojo) y Alexafluor-488 (verde), respectivamente. Paneles derechos que muestran los límites celulares (líneas punteadas blancas) y la distribución de DENV1 en las células. (B) Primer plano de eventos de infección *in vivo*. DENV1 se observan dentro de células BHK de 18 min en el isotipo de los controles y de 28 min con HM4G2. HM14c10: Complejos DENV1 no pueden unirse a las células BHK. (C) Intensidad de fluorescencia roja interna de 120 células seleccionadas al azar cuantificadas como una medida de internalización de virus durante 1 h. ANOVA unidireccional utilizado para la comparación de 3 grupos. ** p<0,0001. (D) HM14c10 se ensaya para su uso como profilaxis y agente terapéutico; el anticuerpo se administra a ratones AG129 infectados con DENV1 el día 0 y el día 2 después de la infección, respectivamente. HM14c10 mostró respuesta protectora ya sea cuando el virus se inyecta (a) por vía subcutánea o (b) por vía intraperitoneal. El nivel de viremia sanguínea se analiza al día 3 ó 4 respectivamente después de la infección mediante el ensayo de placa. N = 5 en ambos modelos y prueba T empleada para la comparación de conjuntos de muestras, ** p < 0,0001, * p < 0,05 en comparación con los controles de PBS.

Figura 14: Identificación y expresión recombinante de un anticuerpo completamente humano con actividad neutralizante para el virus de Dengue. (A) (a) Dos mil líneas de células B EBV se generaron a partir de un paciente infectado DENV1 y sobrenadantes examinados por ELISA para la actividad de unión a DENV1 pero no DENV2, 3 o 4. Se identificaron siete líneas celulares EBV BCL positivas. (b) una prueba de neutralización de reducción de placas (PRNT) se llevó a cabo para ensayar para neutralizar la actividad. Los datos se expresan como un PRNT100 (es decir, neutralización completa) en el factor de dilución más alto y es el valor medio de 3 experimentos. (B) (a) Esquema de vector pTT5 utilizado para expresar modelos de cadena pesada y ligera de anticuerpo derivados de EBV-BCL en células HEK293. (b) Doce IgG1 mAbs humanas

recombinantes se clonaron y se expresaron a partir de la línea celular EBV 14c10-BCL y se ensayaron para la actividad de unión a DENV1 por ELISA. Se empleó un anticuerpo monoclonal 4G2 humanizado de ratón (HM4G2) como control positivo. El modelo de anticuerpo recombinante número 8 (denominado HM14c10) mostró actividad de unión para DENV1. **(C) (a)** Actividad PRNT de HM14c10 en DENV1, 2, 3 y 4. **(b)** HM14c10 se ensayó para determinar la actividad de unión a DENV1, 2, 3 y 4 por ELISA. Estos datos representan la media de 3 experimentos y las barras de error iguales a la desviación estándar de la media de conjuntos de muestras triplicados.

Figura 15: HM14c10 exhibe la actividad de unión para múltiples aislados clínicos de DENV1. La actividad de unión de HM14c10 para varios aislados de DENV1 se comparó con un anticuerpo monoclonal humanizado HM4G2 de ratón en varias concentraciones usando un protocolo ELISA establecido. Se emplearon todos los aislados DENV1 en 1×10^6 pfu/ml y se revistieron durante la noche a 4°C con HB112 utilizado como un reactivo de captura. El anticuerpo de HM14c10 o HM4G2 se añadieron a $5 \mu\text{g/ml}$ y se utilizaron conjugados de IgG HRP anti-humanos para la detección de actividad de unión.

Figura 16: Ajuste de estructura cristalina post fusión de las proteínas DENV1 E en el mapa cryoEM de Fab HM14c10 complejo con virus de Dengue 1. **(A)** Vista superior de las proteínas E de Dengue 1. El mapa cryoEM se visualiza en un nivel de contorno alto de $5,5\sigma$ de manera que se puede observar esquema claro de densidades de proteínas E. A este nivel de contorno, desaparecieron las densidades de Fab, lo que indica que no todos los epítomos de proteína E disponibles están ocupados por la molécula Fab en la superficie del virus. Las densidades de electrones de la superficie del virus fueron interpretadas por ajuste en la estructura cristalina de la estructura después de la fusión de la proteína DENV1 E (18). Dado que la estructura cristalina de la proteína E de DENV1 después de la fusión no encaja bien en el mapa cryoEM como un cuerpo rígido, los tres dominios de la proteína E tenían que ajustarse por separado. Los dominios I, II y III de la proteína E se colorean en rojo, amarillo y azul, respectivamente. Proteínas E de dos unidades asimétricas se muestran aquí con una unidad asimétrica indicada con un triángulo. **(B)** La vista lateral de las proteínas E colocadas en la superficie de DENV1. Se pueden observar densidades de las moléculas Fab, ectodominio de la proteína E y hélices de transmembrana (Tm). Las densidades correspondientes a glicanos en la posición Asn159 en dos proteínas E adyacentes están marcadas con puntas de flecha y se indica la posición del foliolo externo e interno de la bicapa lipídica. El mapa cryoEM se muestra en el nivel de contorno de $2,5 \sigma$.

Figura 17: Esquema estereoscópico de la interfaz de unión de Fab HM14c10 y proteína E. La densidad de Fab HM14c10 (II) muestra conexiones claras con proteínas E en la superficie del virus. Residuos de contacto se indican con las esferas. La densidad de cryoEM se muestra en nivel de contorno de $2,5 \sigma$.

Figura 18: Superposición de las regiones variables de modelo de homología de HM14c10 (verde) con anticuerpo de referencia humano monoclonal (PDB código 2GHW) (azul). La Figura muestra el lado **(A)** y vista superior **(B)** de las regiones variables de anticuerpos.

Figura 19: Adaptación del modelo de homología de la región variable HM14c10 en mapa de densidad HM14c10:DENV1 cryoEM. **(A)** Las densidades correspondientes a las cadenas individuales (a y b) de la región variable de anticuerpo tienen un círculo desde el mapa cryoEM. Los residuos de contacto de la proteína E ajustada se indican con esferas cian. E-DI, E-DII y E-DIII se colorean en rojo, amarillo y azul, respectivamente. **(B)** Las cadenas ligeras y pesadas de modelo de homología se colocaron separadamente en la región variable de las densidades de Fab cryoEM. ^aPara la designación de la posición de Fab véase la FIG. 12. ^bPara la designación de densidad de Fab véase (A). ^cLos ajustes del modelo de homología en el mapa HM14c10:DENV1 cryoEM (establecido a un nivel de contorno de 3σ) se optimizaron usando la función de ajuste en mapa en Chimera (35). **(C)** El modelo de homología de región variable HM14c10 (verde) que muestra las CDR en magenta. El ajuste mostrado tiene una cadena ligera en la densidad de Fab a, y la cadena pesada en la densidad de Fab b.

Figura 20: Epítomo HM14c10 en el serotipo de Dengue 1 (genotipo PVP159) y comparación del epítomo con (A) otros genotipos DENV1 y (B) serotipos de Dengue y virus del Nilo Occidental (VNO). Los restos de aminoácidos comunes entre los epítomos reconocidos por Fab HM14c10 (I) y Fab HM14c10 (II) en una unidad asimétrica se colorean en verde. Los residuos que son reconocidos de forma única por Fab HM14c10 (I) o Fab HM14c10 (II) se colorean en púrpura y cian, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los epítomos reconocidos por Fab HM14c10 se conservan dentro de los genotipos DENV1, pero no a través de serotipos de Dengue o virus del Nilo Occidental. Esto es consistente con la observación de que Fab HM14c10 se une a la mayoría de los genotipos de Dengue 1, pero no reaccionan de forma cruzada con otros serotipos de Dengue o flavivirus con huellas de anticuerpos sombreadas **(a)** en la posición X1 y II o **(b)** la posición X2 y I.

Figura 21: Infectividad y eficacia *in vivo* de DENV1 etiquetado. **(A)** Etiquetado DENV vivo se llevó a cabo como se describió previamente (22). La infectividad y viabilidad del virus marcado se ensayó mediante ensayo en placa mediante titulación en células BHK. **(B)** Eficacia *in vivo* de HM14c10 se ensayó en dos modelos *in vivo* empleando diferentes cepas/concentraciones de virus DENV1 más diferentes modos de administración viral. Se muestra un esquema de ambos modelos. **(a)** En el modelo 1, 1×10^6 pfu de la cepa EHID1 se inyecta por vía subcutánea (SC) y la viremia sérica monitoreada por ensayo de placa 4 días más tarde. Los profilaxis se administran 24 horas antes de la infección con DENV1 y las aplicaciones terapéuticas al día más 2 post infección. **(b)** También se empleó un segundo modelo de infección DENV1 más agresivo. Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con $1,25 \times 10^7$ pfu de la cepa Westpac de DENV1. La infección vírica más los tratamientos profilácticos y terapéuticos se administraron vía inyección intraperitoneal (I.P.) en los mismos puntos de tiempo que en el modelo 1. En este modelo, la viremia plasmática alcanza picos al día 3 después de la infección y aquí es donde se miden los efectos del anticuerpo administrado en el suero viremia. Los controles en

ambos grupos recibieron un volumen igual de solución salina estéril.

Figura 22: Comparación del epítipo unido por un anticuerpo CR4354 del virus del Nilo Occidental y HM14c10 específico del Dengue 1. (A) Colocación de HM CR4354 y HM 14c10 a proteínas E en WNV (izquierda) (25) y DENV (derecha), respectivamente. La densidad de cryoEM se visualiza en 2,8 σ (CR4354:WNV) o 2,5 σ (nivel de contorno HM14c10:DENV1) **(B)** Una unidad asimétrica de WNV (izquierda) y DENV1 (derecha) con huellas de anticuerpo de CR4354 o HM14c10 mostradas en esferas de epítipos en los dos sitios de unión independientes en una unidad asimétrica se colorean en púrpura y cian. Las tres proteínas E en una unidad asimétrica están sombreadas en gris. Una asimétrica se muestra como triángulo negro. **(C)** La comparación de los residuos en los dos epítipos independientes **(a y b)** entre CR4354 (en WNV) y HM 14c10 (en DENV). Los residuos en los dos epítipos independientes son de color como en **(B)**.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere en general a composiciones y métodos para la prevención o tratamiento de la infección por virus de Dengue en un sujeto vertebrado. En particular, hemos aislado CD22 + células B de pacientes infectados por Dengue admitidos a la División de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Nacional (NUH). Estas células B se inmortalizaron como líneas celulares policlonales con EBV *in vitro*. Se añadió el activador de células B policlonales (secuencias CpG) para aumentar la eficacia de la inmortalización de células B junto con los factores de crecimiento de células B humanas, interleuquina 2 e interleuquina 4 (1000 U/ml de cada uno). Se hicieron líneas de células B humanas en pocillos de fondo redondo de 96 pocillos. Después de dos semanas, los sobrenadantes de estos clones se examinaron mediante ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), ensayo de neutralización de reducción de placa (PRNT) y ensayo de efecto citopático (CPE) para analizar la actividad de unión/neutralización para el virus de Dengue. Las líneas de células B que producen anticuerpos positivos se usaron como una fuente de ARNm para la amplificación de genes de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos. Las secuencias de cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo se clonaron en un vector pCMV en casa y se transfectaron en células de Freestyle® 293F para producir altas concentraciones de anticuerpo recombinante. Utilizando esta metodología, hemos clonado y expresado un anticuerpo recombinante que es exquisitamente serotipo de Dengue 1 específico y tiene amplia especificidad para varios genotipos de serotipo de Dengue 1. Este anticuerpo no se une a otros virus en el género Flavivirus y, como tal, exhibe poca o ninguna mejora de la infección de los macrófagos a otros flavivirus más allá de los que se espera para el serotipo del Dengue 1. Los experimentos *in vivo* han demostrado una notable eficacia profiláctica y terapéutica en un modelo de ratón de la infección por Dengue. Como tal, este anticuerpo representa el mejor candidato disponible terapéutico para la infección del Dengue 1 en existencia.

DEFINICIONES

Se ha de entender que esta invención no se limita a métodos particulares, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos, que pueden, por supuesto, variar. También se debe entender que la terminología usada en la presente memoria se dirige al propósito de describir únicamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitativa. Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen referencias plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

El término "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, se entiende que abarca variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, aún más preferiblemente $\pm 1\%$, y aún más preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para llevar a cabo los métodos descritos.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque en la práctica se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para ensayar la presente invención, se describen los materiales y procedimientos preferidos.

"Vertebrado," "mamífero," "sujeto," "sujeto mamífero," o "paciente" se usan indistintamente y se refieren a mamíferos tales como pacientes humanos y primates no humanos, así como animales experimentales tales como conejos, ratas y ratones, vacas, caballos, cabras y otros animales. Los animales incluyen todos los vertebrados, por ejemplo., Mamíferos y no mamíferos, tales como ratones, ovejas, perros, vacas, especies aviares, patos, gansos, cerdos, pollos, anfibios, y reptiles.

"Tratar" o "tratamiento" se refiere generalmente a cualquiera de (i) la prevención de infección o reinfección, por ejemplo, profilaxis, o (ii) la reducción o eliminación de los síntomas de una enfermedad de interés, por ejemplo, la terapia. El tratamiento de un sujeto con las composiciones de la invención puede prevenir o reducir el riesgo de infección por el virus Dengue, particularmente el serotipo 1. El tratamiento puede ser profiláctico (para prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad o para prevenir la manifestación de síntomas subclínicas de la misma) o supresión terapéutica o mitigación de síntomas tras la manifestación de la enfermedad.

"Prevenir" o "prevención" se refiere a la administración profiláctica con composiciones de la invención.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" o "una cantidad eficaz para reducir o eliminar la infección" o "una cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una composición de anticuerpo que es suficiente para prevenir la infección viral de Dengue o para aliviar (por ejemplo, mitigar, disminuir, reducir) por lo menos uno de los síntomas asociados con una infección de este tipo. No es necesario que la administración de la composición de eliminar los síntomas de la infección por Dengue, siempre que los beneficios de la administración de la composición sean mayores que los perjuicios. Del mismo modo, los términos "tratar" y "tratamiento", en referencia a la infección por Dengue, como se usa en este documento, no se pretende en el sentido de que el sujeto está necesariamente curado de la infección o que todos los signos clínicos de la misma se eliminan, solo que cierto alivio o mejora en la condición del sujeto se realiza por administración de la composición.

"Inmunidad pasiva" se refiere generalmente a la transferencia de inmunidad humoral activa en la forma de anticuerpos pre-hechos de un individuo a otro. Por lo tanto, la inmunidad pasiva es una forma de inmunización a corto plazo que se puede lograr por la transferencia de anticuerpos, que se puede administrar en varias formas posibles, por ejemplo, como plasma sanguíneo o suero humano o animal, como inmunoglobulina animal o humana agrupada para uso intravenoso (IVIG) o intramuscular (IG), como animales de título alto o IVIG humana o IG de sujetos inmunizados o de donantes que se recuperan de una enfermedad, y como anticuerpos monoclonales. La transferencia pasiva se puede utilizar profilácticamente para la prevención de la aparición de la enfermedad, así como, en el tratamiento de varios tipos de infección aguda. Por lo general, la inmunidad derivada de la inmunización pasiva dura sólo por un corto período de tiempo, y proporciona una protección inmediata, pero el cuerpo no desarrolla la memoria, por lo que el paciente está en riesgo de ser infectado por el mismo patógeno más tarde.

ANTICUERPOS

Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier molécula de inmunoglobulina o intacta así como a fragmentos de los mismos que se unen a un epítipo específico. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, de cadena sencilla, fragmentos Fab, Fab', F(ab') y/o porciones de F(v) de todo el anticuerpo y variantes de los mismos. Todos los isotipos están abarcados por este término, incluyendo IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM.

Tal como se utiliza aquí, el término "fragmento de anticuerpo" se refiere específicamente a una parte incompleta o aislada de la secuencia completa del anticuerpo que retiene la función de unión al antígeno del anticuerpo parental. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos de Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Un "anticuerpo" intacto comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por disulfuro cautiverio. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, CH₁, CH₂ y CH₃. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, C_L. Las regiones de V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están denominadas regiones marco más conservadas (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal al extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos del huésped o factores, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. El término anticuerpo incluye partes de unión a antígeno de un anticuerpo intacto que conservan la capacidad de unirse. Ejemplos de unión incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en V_L, V_H, C_L y los dominios CH₁; (ii) un F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos de Fab unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y CH₁; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al, Nature, 341: 544-546 (1989)), que consiste en un dominio V_H; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR).

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos de cadena sencilla" o "Fv de cadena sencilla (scFv)" se refiere a una molécula de fusión de anticuerpo de los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H. Aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite hacerse como una sola cadena proteica en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al, Science, 242: 423-426 (1988); y Huston et al, Proc Natl Acad Sci. EE.UU., 85: 5879-5883 (1988)). Tales anticuerpos de cadena sencilla están incluidos mediante referencia al término fragmentos "de anticuerpo" y se pueden preparar mediante técnicas recombinantes o escisión enzimática o química de

anticuerpos intactos.

Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo de secuencia humana" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes (si están presentes) derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos de secuencia humana de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas de línea germinal de inmunoglobulina (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Tales anticuerpos pueden generarse en animales transgénicos no humanos, por ejemplo, como se describe en el documento Sol. de Pub. de PCT Nos. WO 01/14424 y WO 00/37504. Sin embargo, el término "anticuerpo de secuencia humana", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como un ratón, se han injertado en las secuencias de marco humanas (por ejemplo, anticuerpos humanizados).

Además, las inmunoglobulinas recombinantes se pueden producir. Véase, Cabilly, patente de EE.UU. nº 4.816.567; y Queen et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 86: 10029-10033 (1989).

Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una sola especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una sola especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes (si están presentes) derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En un aspecto, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

Tal como se utiliza aquí, el término "antígeno" se refiere a una sustancia que induce la generación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmune. Se puede utilizar de forma intercambiable en la presente descripción con el término "inmunógeno". En el sentido estricto, los inmunógenos son aquellas sustancias que provocan una respuesta del sistema inmune, mientras que los antígenos se definen como sustancias que se unen a anticuerpos específicos. Un antígeno o fragmento del mismo puede ser una molécula (*es decir*, un epítipo) que entra en contacto con un anticuerpo particular. Cuando se usa una proteína o un fragmento de una proteína para inmunizar un animal huésped, numerosas regiones de la proteína pueden inducir la producción de anticuerpos (*es decir*, provocar la respuesta inmunitaria), que se unen específicamente al antígeno (regiones dadas o estructuras tridimensionales en la proteína).

Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a al menos una molécula de anticuerpo en la que la secuencia de aminoácidos en las regiones de unión no-antígenas y/o las regiones de unión a antígenos se ha alterado de modo que el anticuerpo se parece mucho más a un anticuerpo humano, y todavía conserva su capacidad de unión original.

Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison, et al, Proc Natl Acad Sci., 81: 6851-6855 (1984)) por corte y empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Por ejemplo, los genes de una molécula de anticuerpo de ratón específica para un autoinductor pueden empalmarse junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana.

Además, se han desarrollado técnicas para la producción de anticuerpos humanizados (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 5.585.089 y la Patente de Estados Unidos Nº 5.225.539). Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina se compone de una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, denominadas como regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Brevemente, los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más CDR de las especies no humanas y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana.

Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla contra un conjugado inmunogénico de la presente descripción. Los anticuerpos monocatenarios se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente aminoácido, resultando en un polipéptido de cadena sencilla. Porciones de Fab y F(ab')₂ de moléculas de anticuerpo se pueden preparar mediante la reacción proteolítica de papaína y pepsina, respectivamente, sobre moléculas de anticuerpo sustancialmente intactas mediante métodos que son bien conocidos. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 4.342.566. Porciones de molécula de anticuerpo Fab' son también bien conocidas y se producen a partir de porciones F(ab')₂ seguido de la reducción de los enlaces de disulfuro que unen las dos porciones de cadena pesada como con mercaptoetanol, y seguido de alquilación del mercaptano de proteína resultante con un reactivo tal como yodoacetamida.

ENSAYOS DE ANTICUERPOS

Un número de ensayos de selección son conocidos en la técnica para el ensayo de anticuerpos de interés para confirmar su especificidad y afinidad y para determinar si estos anticuerpos reaccionan en forma cruzada con otras proteínas.

Los términos "unión específica" o "se unen específicamente" se refieren a la interacción entre el antígeno y sus anticuerpos correspondientes. La interacción depende de la presencia de una estructura particular de la proteína reconocida por la molécula de unión (*es decir*, el antígeno o epítipo). Para que la unión sea específica, se debe involucrar la unión de anticuerpos del epítipo de interés y no antígenos de fondo.

Una vez que se producen anticuerpos, que se ensayan para confirmar que son específicos para el antígeno de interés y para determinar si presentan reactividad cruzada con otros antígenos. Un método de llevar a cabo tales ensayos es un ensayo de pantalla de sueros como se describe en la Sol. de Pub. de EE.UU. N° 2004/0126829. Sin embargo, otros métodos de ensayo para el control de calidad están dentro de la habilidad de una persona de experiencia ordinaria en la técnica y por lo tanto están también dentro del alcance de la presente descripción.

Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la presente descripción también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un antígeno. La afinidad de un anticuerpo para un antígeno se puede determinar experimentalmente usando cualquier método adecuado. (Véase, por ejemplo, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions," In *Fundamental Immunology*, Paul, W.E., Ed, Raven Press: Nueva York, N.Y. (1984); Kuby, Janis *Immunology*, W.H. Freeman and Company: Nueva York, NY (1992); y métodos descritos en este documento). La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en diferentes condiciones (por ejemplo, concentración de sales, pH). Por lo tanto, mediciones de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno (por ejemplo, K_D , K_a , K_D) se realizan preferiblemente con soluciones normalizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado.

La constante de unión de afinidad (K_{aff}) se puede determinar usando la siguiente fórmula:

$$K_{aff} = \frac{(n-1)}{2(n[mAb']_t - [mAb]_t)}$$

en el cual:

$$n = \frac{[mAg]_t}{[mAg']_t}$$

$[mAb]$ es la concentración de sitios de antígeno libre, y $[mAg]$ es la concentración de sitios de unión como se determina en dos concentraciones de antígeno diferentes monoclonal libre (*es decir*, $[mAg]_t$ y $[mAg']_t$) (Beatty et al., *J Imm Meth*, 100: 173-179 (1987)).

El término "alta afinidad" para un anticuerpo se refiere a una asociación constante de equilibrio (K_{aff}) de al menos aproximadamente 1×10^7 litros/mol, o al menos aproximadamente 1×10^8 litros/mol, o al menos aproximadamente 1×10^9 litros/mol, o al menos aproximadamente 1×10^{10} litros/mol, o al menos aproximadamente 1×10^{11} litros/mol, o al menos aproximadamente 1×10^{12} litros/mol, o al menos aproximadamente 1×10^{13} litros/mol, o al menos aproximadamente 1×10^{14} litros/mol o mayor. "La alta afinidad" de unión puede variar para los isotipos de anticuerpos. K_D , la constante de disociación en equilibrio, es un término que también se utiliza para describir la afinidad del anticuerpo y es la inversa de K_{aff} .

K_D , la constante de disociación en equilibrio, es un término que se utiliza también para describir la afinidad del anticuerpo y es la inversa de K_{aff} . Si K_D se utiliza, el término "alta afinidad" para un anticuerpo se refiere a una constante de equilibrio de disociación (K_D) de menos de aproximadamente 1×10^{-7} moles/litros, o menos de aproximadamente 1×10^{-8} moles/litros, o menos de aproximadamente 1×10^{-9} moles/litros, o menos de aproximadamente 1×10^{-10} moles/litros, o menos de aproximadamente 1×10^{-11} moles/litros, o menos de aproximadamente 1×10^{-12} moles/litros, o menos de aproximadamente 1×10^{-13} moles/litros, o menos de aproximadamente 1×10^{-14} moles/litros o más bajas.

La producción de anticuerpos de acuerdo con la presente descripción proporciona anticuerpos con las características de los producidos en el curso de una respuesta inmune humana fisiológica, es decir, especificidades de anticuerpos que sólo pueden ser seleccionados por el sistema inmunitario humano. En el presente caso, esto incluye una respuesta al patógeno humano de virus de Dengue, serotipo 1. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente descripción poseen las características de los producidos en el curso de una respuesta a

la infección por el virus de Dengue. Estos anticuerpos se pueden utilizar como agentes profilácticos o terapéuticos de la formulación apropiada.

En relación a un patógeno particular, un "anticuerpo neutralizante", "anticuerpo ampliamente neutralizante", o "anticuerpo neutralizante monoclonal", todos los cuales se usan de forma intercambiable en el presente documento, es uno que puede neutralizar la capacidad de ese patógeno para iniciar y/o perpetuar una infección en un huésped. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales producidos de acuerdo con la presente descripción tienen actividad neutralizante, en donde el anticuerpo puede neutralizar a una concentración de 10^{-9} M o inferior (por ejemplo 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M o menor).

Las moléculas de inmunoglobulina de la presente invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno (por ejemplo, humanos) e incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpo de cadena única, Fvs unida a disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio de V_L o V_H. Fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos de cadena única, pueden comprender la región variable sola o en combinación con la totalidad o una porción de los siguientes: región de bisagra, dominios CH1, CH2, y CH3. También se incluyen en la presente descripción fragmentos de unión a antígeno que comprenden cualquier combinación de región variable con una región bisagra, dominios de CH1, CH2 y CH3.

AISLAMIENTO DE CÉLULAS B

Como se usa en el presente documento, los términos "célula B", "células de memoria B", "linfocitos B", "linfocitos B de memoria", "células de memoria", "células B de memoria", y variantes de los mismos se utilizan de manera intercambiable y se refieren a las células B de la respuesta inmune humoral. Tal como se entiende en la técnica, las células B son linfocitos que juegan un papel en la respuesta inmune humoral (en oposición a la respuesta inmune mediada por células, que se rige por las células T). Al menos una función de las células B consiste en hacer anticuerpos contra antígenos, desempeñar el papel de células presentadoras de antígeno (APCs) y, finalmente, convertirse en células B de memoria después de la activación por la interacción de antígeno. Las células B son un componente del sistema inmune adaptativo.

La frase "célula B primaria" puede referirse en algunas realizaciones a una célula B tomada directamente de un organismo vivo (por ejemplo, un humano). En algunas realizaciones, una célula B primaria puede ser cultivada en un cultivo celular primario. Una célula B primaria se puede derivar, obtener o recoger de un sujeto de cualquier manera conocida por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, una célula B primaria se obtiene de un sujeto infectado con o que posee un antígeno de interés.

Los métodos de la presente divulgación se pueden aplicar para la identificación de anticuerpos monoclonales expresados por células B humanas seleccionadas de los donantes, tales como los pacientes expuestos a un agente infeccioso, por ejemplo, virus de Dengue. Así, el donante puede ser ingenuo, vacunado, afectado por una o más enfermedades o infecciones, ya expuesto y/o resistente a los tratamientos terapéuticos específicos, presentando un índice clínico específico o el estado, inadvertidamente expuesto a un patógeno, etc.

Sueros de donantes se pueden utilizar como tales para una determinación inicial de su seropositividad a un antígeno, ya que la especificidad y mantenimiento a largo plazo de las respuestas inmunitarias adaptativas (incluso años después de la última exposición a este antígeno) puede permitir una determinación cualitativa que es suficiente para la selección de los donantes. La naturaleza y la sensibilidad del ensayo de detección utilizada es crítica en la identificación del donante más adecuado y, preferiblemente, el ensayo utilizado para examinar el suero del donante debe ser el mismo que el utilizado para examinar los sobrenadantes a partir de células B inmortalizadas que secretan anticuerpo y diseñadas para detectar un anticuerpo con la actividad funcional deseada (es decir, la actividad de neutralización).

La elección del tejido o el órgano del que se purifican las células puede ser dictada por la disponibilidad de células apropiadas en cantidad suficiente. Las células pueden ser obtenidas a partir de muestras frescas o congeladas y/o a partir de muestras obtenidas a partir de un número de individuos que han sido agrupados para proporcionar material de partida suficiente.

Un examen preliminar se puede realizar en un panel de donantes de candidatos, utilizando muestras que contienen células secretoras de anticuerpos (tales como sangre periférica total o suero). En particular, las células mononucleares se pueden aislar de sangre u otros tejidos linfáticos usando técnicas estándar de separación para aislar las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), tales como centrifugación en gradiente. Después de y/o antes de esta etapa de separación, las muestras de suero (o plasma), los sobrenadantes de cultivo de células, o las células (obtenidas a partir de diferentes pacientes, de diferentes tejidos, y/o en diferentes puntos de tiempo) pueden ser pre-seleccionados utilizando tecnologías estándar para detectar la presencia de anticuerpos y células secretoras de anticuerpos (por ejemplo ELISA, BIACORE, Western blot, FACS, SERPA, matrices de antígeno, la neutralización de la infección viral en un sistema de cultivo de células, o ensayos ELISPOT).

Ejemplos en la técnica incluyen, por ejemplo, el uso de ELISPOT para la caracterización de la respuesta inmune en los donantes vacunados (Crotty S et al., 2004), el uso de micromatrices de antígeno como herramientas de diagnóstico para los pacientes recientemente infectados (Mezzasoma L et al., 2002), y otras tecnologías para la medición de las respuestas inmunes específicas de antígeno (Kern F et al., 2005).

Este análisis cualitativo preliminar de respuesta de anticuerpos a la diana terapéutica debería permitir la identificación de donantes que tienen células B que expresan mayores títulos de anticuerpos dirigidos contra el antígeno purificado deseado (por ejemplo, una proteína viral recombinante específica), una mezcla de antígenos relacionados (por ejemplo obtenida a partir de la preparación viral parcialmente purificada), o un bioensayo (por ejemplo, la neutralización de la infectividad viral).

Una vez que se seleccionan uno o más donantes, la fuente de las células B puede ser el bazo, sangre, ganglios linfáticos, médula ósea, linfocitos infiltrantes de tumor, los linfocitos de los sitios de infección/inflamación crónica. Sin embargo, la sangre periférica es generalmente más fácil de obtener de los donantes, de almacenar, y para monitorear la respuesta serológica frente a un antígeno durante un periodo de tiempo definido.

Por ejemplo, a partir de 5-50 ml de sangre periférica, aproximadamente 10-100 millones de los PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) se pueden purificar, un número de células que permitiría que una población suficientemente grande de células secretoras de anticuerpo se examinara después de haber sido inmortalizada usando los métodos descritos en este documento.

Después del aislamiento de PBMCs a partir de muestras biológicas, una selección específica de células que secretan anticuerpo se puede realizar, usando procedimientos conocidos en la técnica, sobre la base de la expresión de marcadores de superficie celular en su superficie y, si procede, de otras proteínas, así como la actividad de proliferación, el metabolismo y/o el estado morfológico de las células.

En particular, varias tecnologías para la purificación de células secretoras de anticuerpos a partir de muestras humanas utilizan diferentes medios y condiciones para la selección positiva o negativa. Estas células se pueden seleccionar de manera eficiente por la separación física de las que expresan marcadores de superficie celular específica para células que expresan y secretan anticuerpos (por ejemplo células B humanas). Los protocolos específicos se pueden encontrar en la técnica (véase, por ejemplo, Callard R y Kotowicz K "Human B-cell responses to cytokines" en *Cytokine Cell Biology: A Practical Approach*. Balkwill F. (ed) Oxford University Press, 2000, pg. 17-31).

La selección se puede realizar utilizando anticuerpos que se unen específicamente a una de estas proteínas de la superficie celular y que puede vincularse a soportes sólidos (por ejemplo, microperlas o placas de plástico) o marcados con un fluorocromo que se puede detectar usando clasificadores de células activadas por fluorescencia (FACS). Por ejemplo, las células B humanas se han seleccionado sobre la base de su afinidad por soportes (tales como microperlas) unión CD 19, CD27, y/o microperlas CD22, o por la falta de afinidad de unión para anticuerpos específicos para determinados isotipos antes de inmortalización de EBV (Li H et al, 1995, Bemasconi N et al, 2003; Traggiai E et al, 2004).

Como se muestra en el presente documento, CD22, que es una proteína de membrana restringida de células B que controla vías de transducción de señal relacionada con reconocimiento de antígeno y la activación de las células B (Nitschke L, 2005), se puede utilizar para la selección inicial de células B. Dado que la población positiva CD22 contiene células que expresan anticuerpos que tienen diferentes isotipos y especificidades, otros marcadores de superficie celular también se pueden usar para la selección de las células.

Alternativamente o adicionalmente, un enriquecimiento específico de células secretoras de anticuerpos se pueden obtener mediante la aplicación de una selección basada en CD27 además de la selección basada en CD22. CD27 se sabe que es un marcador de células B humanas que han mutado somáticamente genes de región variable (Borst J et al., 2005). Marcadores adicionales tales como CD5, CD24, CD25, CD86, CD38, CD45, CD70, o CD69 se podrían utilizar para agotar o enriquecer para la población deseada de células. Por lo tanto, dependiendo de la historia del donante de la exposición al antígeno (por ejemplo, viral, bacteriano, parásito), el título de anticuerpos, células B totales, células B enriquecidas CD22, o subpoblaciones de células B enriquecidas adicionalmente tales como las células B positivas CD27 pueden utilizarse.

TRANSFORMACIÓN EBV DE CÉLULAS B

La población seleccionada y estimulada de células que expresan anticuerpos que tienen isotipos específicos se pueden immortalizar utilizando un agente de inmortalización viral. Diferentes agentes de inmortalización se pueden utilizar en las células secretoras de anticuerpos para obtener células inmortalizadas que secretan anticuerpo.

Entre los agentes de inmortalización viral, un virus que infecta y inmortaliza las células secretoras de anticuerpos se pueden utilizar preferiblemente en la práctica de la invención. Virus comúnmente usados son virus

linfotrópico de células, agrupadas en la clase gamma del herpesvirus. Los miembros de esta familia de virus infectan los linfocitos de una manera específica de la especie, y están asociados con trastornos linfoproliferativos y el desarrollo de varios tumores malignos (Nicholas J, 2000; Rickinson A, 2001).

5 EBV (virus Epstein-Barr, también conocido como herpesvirus 4), y HHV-8 (herpesvirus humano 8, también conocido como HVSK, Herpesvirus asociado con Sarcoma de Kaposi) infectan e inmortalizan linfocitos humanos. MHV-68 (herpesvirus murino 68), HVS (herpesvirus Samiri), RRV (Rhesus Rhadinovirus), LCV (linfocriptovirus de primate), EHV-2 (herpesvirus equino 2) HVA (herpesvirus de ateles), y AHV-1 (herpesvirus de alcelafina 1) son otros herpesvirus oncogénicos, linfotrópicos teniendo características genéticas comunes conservadas entre ellos y efectos patógenos similares en diferentes células huésped de mamíferos. Estos virus se pueden utilizar en la práctica de la presente invención.

15 Además de la utilización de virus intactos, los constructos de ADN recombinante que contienen proteínas virales específicas se han utilizado con éxito para inmortalizar células B (Damania B 2004; Kilger E et al, 1998). Los vectores que contienen genes virales pueden ser transducidos en las células, a veces haciendo uso de sistemas retrovirales o líneas celulares de empaquetamiento que proporcionan todos los factores necesarios para la formación de tales partículas similares a virus, también se pueden utilizar en los métodos descritos en el presente documento.

20 Inmortalización mediada por EBV es un proceso complejo que implica la inmortalización de células B debido a las proteínas que se expresan por EBV, y está regulada por la interacción entre las proteínas EBV y células huésped (Sugimoto M et al, 2004; Bishop G E, y Busch L K, 2002). Si se desea, el proceso de inmortalización puede ser seguido por la medición de la expresión de proteínas de EBV específicos y las transcripciones tales como EBNA2, EBNA1, LMP2, LMP1, o EBERs (Thorley-Lawson DA, 2001). Estas proteínas pueden ser detectadas por PCR, inmunofluorescencia, transferencia Western, u otros métodos que permiten la detección de ADN de EBV y las proteínas en las células infectadas (Schlee M et al, 2004; Parque CH et al, 2004; Humme S et al., 2003; Konishi K et al, 2001; Haan K et al, 2001).

30 **EXAMEN Y AISLAMIENTO DE CÉLULAS B TRANSFORMADAS**

En algunas realizaciones, células B transformadas y/o activadas se pueden examinar para las que tienen la especificidad de antígeno deseada, y clones de células B individuales pueden producirse a partir de las células positivas. La etapa de detección puede llevarse a cabo mediante ELISA, por tinción de tejidos o células (incluyendo células transfectadas), un ensayo de neutralización, y/o uno de un número de otros métodos conocidos en la técnica para identificar la especificidad de antígeno deseada. El ensayo se puede seleccionar sobre la base de simple reconocimiento del antígeno, o puede seleccionarse sobre la base adicional de una función deseada, por ejemplo, anticuerpos neutralizantes en lugar de anticuerpos de unión al antígeno.

40 En algunas realizaciones, una etapa de clonación para la separación de clones individuales a partir de la mezcla de células positivas se puede llevar a cabo usando dilución limitante, micromanipulación, la deposición de una sola célula por clasificación de células, y/o por cualquier otro método conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la clonación se lleva a cabo usando dilución limitante. En algunas realizaciones, las células B clonadas se derivan de las células B que han sido inmortalizadas usando transformación de EBV junto con la inhibición de la respuesta del huésped innata a las señales proliferativas mediadas por activador.

45 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona la producción de células B inmortalizadas que producen anticuerpos que tienen una especificidad de antígeno deseada. Tales células B se pueden utilizar de diversas maneras, por ejemplo como una fuente de anticuerpos monoclonales, como fuente de ácido nucleico (ADN o ARNm) que codifica un anticuerpo monoclonal de interés, para la administración a los sujetos para la terapia celular, como un agente terapéutico o farmacéutico.

50 En algunas realizaciones, el sobrenadante de las células B activadas en cultivo se pueden examinar para anticuerpos de interés usando métodos conocidos en la técnica. El examen se realiza para identificar uno o más anticuerpos monoclonales capaces de unirse a un antígeno de interés. Dicho examen se puede realizar en sobrenadante de cultivo y/o anticuerpos purificados. Alternativamente, la detección puede llevarse a cabo utilizando el sobrenadante de cultivo y/o anticuerpos purificados a partir de células B activadas y/o inmortalizadas. Además, cuando los anticuerpos de reacción cruzada son de interés, la capacidad de los anticuerpos monoclonales frente a una reacción cruzada con dos o más antígenos diferentes se pueden determinar. Por otra parte, en algunas realizaciones, puede ser deseable para la detección de anticuerpos con ciertas características funcionales (por ejemplo, actividad de neutralización).

55 La especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por la presente divulgación pueden, por ejemplo, ser determinada en un inmunoensayo, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación u otro ensayo de unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

60 Clases generales representativas de métodos de examen que se pueden emplear incluyen, pero no se

limitan a, (a) ensayos de captura de anticuerpo; (b) ensayos de captura de antígeno; y (c) exámenes funcionales.

En ensayos de captura de anticuerpos, el antígeno se puede unir a una fase sólida, se permite que los anticuerpos monoclonales a ensayarse se unan al antígeno, los anticuerpos no unidos se eliminan mediante lavado, y entonces se detectan los anticuerpos unidos, por ejemplo mediante un reactivo secundario tal como un anticuerpo marcado que reconoce específicamente el anticuerpo.

Para un ensayo de captura de antígeno, el antígeno se puede marcar directamente. En una realización, los anticuerpos monoclonales a ensayar se pueden unir a una fase sólida y después se hicieron reaccionar con el antígeno opcionalmente marcado. Alternativamente, el complejo anticuerpo-antígeno se puede permitir que se forme mediante inmunoprecipitación antes de la unión del anticuerpo monoclonal a ensayar a una fase sólida. Una vez que los complejos anticuerpo-antígeno se unen a la fase sólida, el antígeno no unido se puede eliminar por lavado y positivos pueden ser identificados mediante la detección del antígeno.

Diversos exámenes funcionales existen para identificar anticuerpos monoclonales con actividades deseadas. En la presente descripción, uno de tales exámenes, como se describe en los Ejemplos, es un ensayo de neutralización.

EXPRESIÓN RECOMBINANTE

Los métodos de la presente divulgación también permiten la obtención y/o secuenciación de un ácido nucleico para el anticuerpo a partir del clon de células B seleccionado; y utilizar el ácido nucleico para generar una célula huésped que puede expresar el anticuerpo de interés.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo deseado se puede secuenciar y después emplear un sistema de expresión heterólogo, por ejemplo, 293 células o células CHO. En algunas realizaciones, un anticuerpo se puede expresar de forma recombinante mediante la obtención de uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, genes de cadena pesada y/o ligera) a partir del clon de una célula B que codifica el anticuerpo de interés e insertar el ácido nucleico en una célula huésped con el fin de permitir la expresión del anticuerpo de interés en esa huésped.

Se describe la producción de anticuerpos utilizando métodos de ADN recombinante, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N° 4.816.567. Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para la expresión. ADN que codifica un anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencian utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Los vectores que pueden unirse incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. Ejemplos de tales componentes del sistema de expresión se describen en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N° 5.739.277. Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores del presente documento son las células procariontas, de levadura, o eucariotas superiores (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.739.277).

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

El presente objeto divulgado proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos producidos de acuerdo con la presente descripción. En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden células B transformadas y/o activadas. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica puede comprender uno o más anticuerpos monoclonales producidos en el uso de los métodos descritos en este documento. En algunas realizaciones, ambos anticuerpos monoclonales, así como las células B transformadas y/o activadas del presente objeto divulgado se pueden incluir en una composición farmacéutica. En algunas realizaciones, un panel de anticuerpos monoclonales producidos de acuerdo con la presente descripción puede incluirse en una composición farmacéutica. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales y/o células B producida de acuerdo con la presente descripción pueden ser incluidas con uno o más agentes adicionales, por ejemplo, fármacos antivirales o analgésicos.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica puede también contener un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable para la administración del anticuerpo. En algunas realizaciones, el portador es farmacéuticamente aceptable para uso en humanos. El vehículo o adyuvante no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden utilizar, por ejemplo sales de ácido mineral, tales como

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

Los vehículos farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH, pueden estar presentes en tales composiciones. Tales vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas y suspensiones, para ingestión por el paciente.

Las composiciones del presente objeto divulgado pueden comprender además un vehículo para facilitar la preparación de la composición y la administración. Cualquier vehículo de suministro o vehículo adecuado se pueden utilizar, incluyendo pero no limitado a una microcápsula, por ejemplo una microesfera o una nanoesfera (Manome et al (1994) Cancer Res. 54: 5.408-5.413; Saltzman & Fung (1997) Adv Drug Deliv Rev 26: 209 a 230), un glicosaminoglicano (patente de Estados Unidos N° 6,106,866), un ácido graso (patente de Estados Unidos No. 5.994.392), una emulsión grasa (patente de Estados Unidos N° 5.651.991), un lípido o derivado de lípido (Pat. No. 5,786,387), colágeno (Pat. No. 5,922,356), un polisacárido o derivado del mismo (patente de Estados Unidos N° 5.688.931), una nanosuspensión (patente de Estados Unidos N° 5.858.410), una micela polimérica o conjugado (Goldman et al (1997) Cancer Res. 57: 1447-1451 y en la patente de Estados Unidos números 4.551.482, 5.714.166, 5.510.103, 5.490.840, y 5.855.900), y un polisoma (patente de Estados Unidos No. 5.922.545).

Secuencias de anticuerpos se pueden acoplar a agentes activos o portadores usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitado a conjugación de carbodiimida, esterificación, oxidación con peryodato sódico, seguido por alquilación reductora, y la reticulación de glutaraldehído (Goldman et al. (1997) Cáncer Res. 57: 1447-1451; Cheng (1996) Hum. Gene Ther. 7: 275-282; Neri et al (1997) Nat Biotechnol 15: 1271-1275; Nabel (1997) Vectors for Gene Therapy. In Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, Nueva York, Park et al (1997) Adv Pharmacol 40: 399-435; Pasqualini et al (1997) Nat Biotechnol 15: 542-546; y Bauminger Wilchek (1980) Meth Enzymol 70: 151-159; Patente de Estados Unidos N° 6.071.890; y la Patente Europea N° 0 439 095).

Una composición terapéutica de la presente invención comprende, en algunas realizaciones, una composición farmacéutica que incluye un portador farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones adecuadas incluyen soluciones acuosas y no acuosas estériles de inyección que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, bactericidas antibióticas y solutos que hacen la formulación isotónica con los fluidos corporales del receptor previsto; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis única o recipientes de dosis múltiples, por ejemplo ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en un estado congelado o liofilizado que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Algunos ingredientes ejemplares son SDS en el intervalo de algunas realizaciones de 0,1 a 10 mg/ml, en algunas realizaciones aproximadamente 2,0 mg/ml; y/o manitol u otro azúcar en el intervalo en algunas realizaciones de 10 a 100 mg/ml, en algunas realizaciones aproximadamente 30 mg/ml; y/o solución salina tamponada con fosfato (PBS). Cualesquiera otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión pueden ser utilizados. En algunas realizaciones, el portador es farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el portador es farmacéuticamente aceptable para uso en humanos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden tener un pH entre 5,5 y 8,5, preferiblemente entre 6 y 8, y más preferiblemente aproximadamente 7. El pH se puede mantener mediante el uso de un tampón. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. La composición puede ser isotónica con respecto a los seres humanos. Las composiciones farmacéuticas del presente objeto divulgado se pueden suministrar en recipientes herméticamente cerrados.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos como se describe aquí. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica puede comprender una cantidad que es suficiente para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o condición deseada, o para mostrar un efecto terapéutico detectable. Los efectos terapéuticos también incluyen reducción en los síntomas físicos. La cantidad eficaz precisa para cualquier sujeto particular dependerá de su tamaño y de la salud, la naturaleza y extensión de la condición, y la terapéutica o combinación de agentes terapéuticos seleccionados para la administración. La cantidad eficaz para una situación dada se determina por experimentación de rutina tal como se practica por uno de habilidad normal en la técnica.

REGÍMENES DE TRATAMIENTO: FARMACOCINÉTICA

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse en una variedad de formas de dosificación unitaria dependiendo del método de administración. Las dosis para composiciones farmacéuticas típicas de anticuerpos son bien conocidas para los expertos en la técnica. Tales dosificaciones son típicamente de tipo orientativo y se ajustan dependiendo del contexto terapéutico particular o la tolerancia del paciente. La cantidad de anticuerpo adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". El programa de

dosificación y las cantidades eficaces para este uso, es *decir*, el "régimen de dosificación" dependerá de una variedad de factores, incluyendo la etapa de la enfermedad o afección, la gravedad de la enfermedad o afección, el estado general de salud del paciente, el estado físico del paciente, la edad, la formulación farmacéutica y la concentración de agente activo, y similares. En el cálculo del régimen de dosificación para un paciente, el modo de administración también se tiene en consideración. El régimen de dosificación también debe tomar en consideración la farmacocinética, es *decir*, tasa de absorción, biodisponibilidad, metabolismo, el aclaramiento, y similares de la composición farmacéutica. Véase, por ejemplo, el último Remington; Egleton, Peptides 18: 1431-1439, 1997; Langer, Science 249: 1527-1533, 1990.

Para los propósitos de la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un anticuerpo, contiene aproximadamente 0,05 a 1 500 µg de proteína, preferiblemente de aproximadamente 10 a 1000 µg de proteína, más preferiblemente de aproximadamente 30 a 500 µg y más preferiblemente de aproximadamente 40 a 300 µg, o cualquier número entero entre estos valores. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención se pueden administrar a un sujeto a una dosis de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 200 mg, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 5 µg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 10 µg, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 25 µg, de aproximadamente 25 µg a aproximadamente 50 µg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 100 µg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 500 µg, de aproximadamente 500 µg de aproximadamente 1 mg, desde aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2 mg, con dosis de refuerzo opcionales indicados en, por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, dos meses, tres meses, 6 meses y/o un año después. Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular depende de una variedad de factores incluyendo la actividad del anticuerpo específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de administración, y velocidad de excreción, combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad sometida a terapia particular.

Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a administración oral, tópica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intradérmica, transdérmica y subdérmica. Dependiendo de la vía de administración, el volumen por dosis es preferiblemente de aproximadamente 0,001 a 10 ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 5 ml, y más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 3 ml. Las composiciones se pueden administrar en un tratamiento de dosis única o en múltiples tratamientos de dosis en un horario y durante un periodo de tiempo apropiado para la edad, peso y estado del sujeto, la formulación de anticuerpo particular usada, y la vía de administración.

KITS

Se pueden prever kits siempre que comprendan anticuerpos producidos de acuerdo con la presente descripción que se pueden utilizar, por ejemplo, para aplicaciones terapéuticas descritas anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo tubos, botellas, viales, y de prueba. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que incluye un agente activo que es eficaz para aplicaciones terapéuticas, como se describe anteriormente. El agente activo en la composición puede comprender el anticuerpo. La etiqueta en el recipiente indica que la composición se usa para una terapia particular o aplicación no terapéutica, y también puede indicar instrucciones para uso *in vivo* o *in vitro*, tales como los descritos anteriormente.

Los siguientes ejemplos de aspectos específicos para llevar a cabo la presente invención se ofrecen con propósitos ilustrativos solamente, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención tal como se establece en las reivindicaciones de ninguna manera.

EJEMPLOS

Métodos y materiales

Declaración de Ética

Se obtuvo el consentimiento informado y todos los procedimientos llevados a cabo bajo un protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad Nacional (número NUS-IRB es 06-196).

Células y virus

Células C6/36 y células BHK-21 se cultivaron como se ha descrito previamente (28). Todas las cepas de Dengue excepto cepas EHI y PVP 159 se obtuvieron del Instituto de Novartis de Enfermedades Tropicales, Singapur (NITD). La cepa EHI se obtuvo del Instituto de Salud Ambiental, Singapur (EHI) y PVP 159 (DENV1/SG/07K3640DK1/2008) de la cohorte de pacientes EDEN (29).

Clonación de las células B

El aislamiento y la inmortalización de células B se llevó a cabo como se describió previamente (10). Después de 15 días de cultivo, los sobrenadantes se rastrearon para los anticuerpos específicos a DENV por ELISA y PRNT.

5 Ensayos de unión ELISA

Placas de fondo plano de 96 pocillos (placas Maxisorp, Nunc) se recubrieron con anticuerpo de ratón 4G2 durante la noche a 5 µg/ml durante la noche. Las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween-20 0,01%. Se añadieron diferentes manchas DENV en 1×10^5 pfu en 50 µl por pocillo y se incubaron adicionalmente durante 2 h. Las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween-20 0,01%. HM14C10 se añadió a las placas y se incubaron durante 1 h. Las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween-20 0,01%. Se añadió anti-IgG humana conjugada con HRP (Pierce, Singapur) y se incubó durante 1 h. Se añadió sustrato TMB (GE Healthcare, Singapur) y 0,1 M de ácido sulfúrico utilizado para detener la reacción.

15 Producción de HM14c10 recombinante

ARN a partir de células B se extrajo usando un kit de extracción de ARN (Qiagen). La clonación y expresión de anticuerpos recombinantes se llevó a cabo como se describió previamente (30).

20 Ensayo de mejora dependiente de anticuerpos

El virus de Dengue (5×10^2 pfu/ml) se pre-incubó con los medios, los anticuerpos individuales monoclonales (HM4G2, HM14c10 o HM14c10 N297Q) o subclases de anticuerpos monoclonales de HM14c10 (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) y después se añadió a 10^5 de las células K562. Después de una hora, las células se lavaron extensamente con PBS para eliminar el virus no unido y el anticuerpo monoclonal. Después de un período adicional de 48 h, los sobrenadantes se recogieron y se determinaron los títulos virales mediante ensayo de placas en células BHK-21.

Experimentos con ratones *in vivo*

Ratones GA129 son deficientes en receptores de IFN- α/β y γ (31). Los ratones fueron tratados de acuerdo con las recomendaciones del Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional (protocolo de IACUC N°: 018/11). Un diagrama esquemático que detalla las aplicaciones profilácticas y terapéuticas de HM14c10 frente a controles tratados con PBS se proporciona en la Figura 21. Los ratones se sacrificaron y la viremia se cuantificó por un ensayo de placa establecida (32).

35 Imágenes de células vivas confocal de lapso de tiempo

Toda la microscopia de células vivas de lapso de tiempo se realizó en un microscopio confocal de A1Rsi invertido (Nikon, Japón) usando lente de apertura numérica de Plan-Apochromat 100X 1.4 (NA). Imágenes de células vivas se realizaron con las células BHK vivas no fijadas cultivadas en cubreobjetos de vidrio de 25 mm (Marienfeld GmbH, Alemania) montados sobre soporte de la cámara (Nikon, Japón). Las células se sembraron a una densidad de 4×10^4 /pocillo 1 día antes del experimento y se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 10% de FCS. Para la detección simultánea de anticuerpos marcados de Alexa Fluor-488 y virus DEN1 marcados con Alexa Fluor-647, la línea de 488 nm de un láser de iones de argón, y la luz de un láser de helio neón 633-nm se dirigieron a través de un divisor de haz de HFT UV/488/633, y la fluorescencia se detectó usando un divisor de haz NFT 545 en combinación con un filtro de paso de banda de 505-530 para Alexa Fluor-488 de detección y un filtro de paso largo 650 para detección de Alexa Fluor-647. Las imágenes fueron capturadas a intervalos de 30 segundos a 1 cuadro por seg (fps) durante 30 a 60 min. Todos los experimentos de formación de imágenes de células vivas se realizaron con células incubadas a 37°C en 5% de sistema incubador de jaula de microscopio de CO₂ (OkoLab, Italia). Las imágenes fueron analizadas y procesadas por elementos de Nikon Imaging Software (NIS) de software C (64 bits, versión 3, SP7/constructor 547) [Nikon, Japón].

Cuantificación de fluorescencia intracelular

El efecto del anticuerpo en la endocitosis de DENV1 se evaluó midiendo el nivel relativo de fluorescencia dentro de las células vivas. Después del tratamiento con el anticuerpo respectivo, imágenes de al menos 100 células fueron adquiridas al azar usando microscopio confocal de A1Rsi de tres experimentos independientes. La región intracelular de las células fueron entonces demarcadas individualmente de forma manual utilizando la función de "región de interés" [ROI] de software de Elementos NIS (Nikon, Japón) y el nivel de fluorescencia relativa de Alexa Fluor-488 dentro de cada célula se midió utilizando la función de estadísticas de ROI del software. La desviación media estándar, y prueba t de student se calcularon para cada población de células usando Microsoft Excel. La fluorescencia de poblaciones de células no tratadas infectadas con DEN1 se normalizaron a 100% y se utilizaron como una comparación con células infectadas tratadas con anticuerpo.

65 CryoEM

El virus de Dengue (cepa PVP 159) se preparó como se ha descrito previamente (3). El virus se mezcló con Fab HM14c10 en una relación molar de 1: 1, se incubó a 37°C durante 30 min, y luego 4°C durante 2 h. El complejo entonces se congeló rápidamente en etano líquido en rejillas de carbono de encaje, que se recubrieron con una capa delgada de carbono continuo. Las partículas de virus se obtuvieron imágenes con un 300 kV FEI Titan Krios en las condiciones siguientes: dosis de electrones de 16 e⁻/Å², magnificación de 47.000, rango de desenfoque de 1 µm a 3 µm. Las imágenes se registraron en un 4K por la cámara 4K Gatan CCD que resulta en un tamaño de píxel de 1,9 Å por píxel. El total de 5.566 partículas se encajonaron y los parámetros de la función de transferencia de contraste se determinaron utilizando el encajador de programas y cfit, respectivamente, en la suite de programas EMAN (33). La orientación de las partículas se determinó mediante el uso de protocolo de recocido simulado (MPSA) multi-trayectoria (34). El virus del Nilo Occidental fue utilizado como un modelo inicial (26). El mapa tridimensional se genera mediante el programa hecho en EMAN. Se encontró que el mapa final de resolución 7 Å tal como se determinó por el corte de coeficiente de cáscara de Fourier de 0.5. La estructura cristalina de proteína E post-fusión de DENV1 (18) no encaja bien en el mapa de densidad de cryoEM como un cuerpo rígido, los dominios en la proteína E se rompieron y luego se montaron conjuntamente. El ajuste de las moléculas en el mapa cryoEM (establecido a nivel de contorno 4σ) luego se optimiza mediante el uso de la función de "mapa de ajuste" de la quimera (35). Para crear un modelo de homología de la región de variable HM14c10, fue elegida una estructura con el mejor ajuste de secuenciadores (PDB código 2GHW) y el modelo de homología se creó utilizando el modelador (19). La cadena pesada y ligera del modelo de homología se colocaron por separado en el mapa de cryoEM (fijado en el nivel de contorno 3σ) en las dos orientaciones posibles del Fab (Fig. 19).

Ejemplo 1: Aislamiento de un anticuerpo específico DENV1 14c10 fuertemente neutralizante de un paciente infectado con DENV1 convaleciente.

Se identificó, se sub-clonó y se expandió un grupo de líneas celulares de linfocitos B que secretan anticuerpos con actividad de unión y neutralización específica de serotipo para DENV1. Una de estas líneas celulares, BCL-14c10, produjo IgG con unión y actividad de neutralización significativamente más fuerte que otros (FIG. 14A). Esta línea celular se utilizó como una fuente de plantillas de genes de inmunoglobulina para la amplificación por PCR y la expresión de IgG1 humanas recombinantes (FIG. 14B (a)). Un anticuerpo humano recombinante (HM) 14c10 tenía actividad de unión comparable para DENV1 con el BCL-14c10 parental (FIG. 14B (b)). HM14c10 neutralizado y unido a DENV1 pero no DENV2, 3 o 4 (FIG. 14C), y exhibió una fuerte actividad neutralizante con una PRNT₅₀ de 0,328 µg/ml *in vitro* (FIG. 11A).

La actividad de ADE relacionada con el desarrollo de DHF y DSS se ha propuesto que se produzca cuando las concentraciones de anticuerpos y complejos de forma DENV que se unen a células que llevan el receptor Fc sub-neutralizante. Esto conduce a un aumento en la absorción de virus y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y quimiocinas (11). Se comparó la actividad de ADE de HM14c10 con un anticuerpo monoclonal HM4G2 de anti-Flavivirus humanizado utilizando un sistema establecido *in vitro* de ensayo empleando la línea celular K562 mielomonocítica que expresa FcγR (12). HM4G2 tiene actividad de unión cruzada de serotipo y se dirige a un bucle de fusión conservado de E-DII en la DENV1-4 (13). Hemos observado que HM14c10 exhibe alguna mejora homotípica de la infección DENV1 en concentraciones sub-neutralizantes pero no actividad potenciadora para DENV2, 3 o 4, a la que no se une. En contraste, HM4G2 media la mejora de los cuatro serotipos a concentraciones sub-neutralizantes (FIG. 11B). Para investigar la contribución de FcγRs de K562 a la actividad de ADE homotípica observada de HM14c10, expresamos el anticuerpo como un fragmento Fab o unión de FcγR reducida mediante la eliminación del sitio de glicosilación en IgG1 humana mediante sustitución con el residuo de asparagina (N) en la posición 297 por glutamina (Q) (14). Tanto el mutante HM14c10Fab como N297Q exhibió una reducción en su actividad de ADE homotípica frente a los controles de IgG1 enteras (FIG. 11C (a)). A continuación se comparó la influencia de sub-clase IgG sobre la actividad de ADE y observamos una correlación parcial con las actividades de unión reportadas para FcγRIIA en K562 (15). La actividad de ADE puede ser clasificada del siguiente modo: IgG3> IgG1> IgG2> IgG4 siendo IgG3 la más alta y Ig G4 la más baja (Fig 11C (b)). Así, la actividad de ADE de este anticuerpo anti-DENV neutralizante aparece dependiente de unión FcγR aunque cabe señalar que la influencia de FcγR1 de alta afinidad y componentes del complemento en la neutralización del virus no se abarcó en estos experimentos (16).

Una complejidad adicional en DENV es la presencia de múltiples genotipos dentro de un único serotipo. Genotipos de DENV 1 pueden variar hasta un 3% en su composición de aminoácidos y los informes anteriores de los anticuerpos anti-DENV de ratón han sugerido que la actividad protectora puede variar entre genotipos (17). Se comparó la actividad de unión de HM14c10 para un número de aislados clínicos de DENV1 que representan dos genotipos de DENV1 dispares (I y IV) con HM4G2. Tanto HM14c10 como HM4G2 exhiben actividad de unión para los genotipos ensayados, con HM4G2 presentan mejores características de unión en todos los casos (FIG. 15). En contraste, HM14c10 exhibió actividad de neutralización superior en comparación con HM4G2 para todos los aislamientos/genotipos ensayados (FIG. 11D).

Ejemplo 2: HM14c10 se une a un epítipo dependiente de la estructura cuaternaria.

La naturaleza exacta de la interacción entre un anticuerpo dado y el DENV debe tener la clave para explicar la neutralización. Para determinar esto, una estructura de microscopía crió-electrónica (cryoEM) de complejo Fab

HM14c10:DENV1 se resolvió a resolución de 7 Å (Fig 12A). En plena ocupación, 120 copias de Fab HM14c10 se unen a todas las 180 copias disponibles de las proteínas E en la superficie del virus. Para identificar la huella de HM14c10 en la proteína E, la estructura cristalina de la proteína E DENV1 (18) se monta en el mapa de densidad de cryoEM (FIG. 16 y en la Tabla 1). El mapa de cryoEM de resolución 7 Å mostró conexiones de densidad claras entre los Fab HM14c10 y las proteínas E, lo que permite la identificación de los residuos de proteína E en la interfaz de interacción (FIG. 12B y FIG. 17). El epítipo reconocido por HM14c10 es dependiente de la estructura cuaternaria del virus. Dos Fab de HM14c10 se unen a tres proteínas E en la unidad asimétrica de virus (FIG. 12C y D). Cada anticuerpo se une a través de dos proteínas E adyacentes con la mitad del epítipo en E-DIII y la otra mitad en la bisagra de E-DI y E-DI-E-DII de una proteína E vecina.

Para comprender la interacción Fab con la proteína E, se ha creado un modelo de homología de la región variable de HM14c10 (FIG. 18), basado en una estructura de anticuerpo humano de referencia (PDB código 2GHW) utilizando el modelador (19). La región variable de la cadena ligera y pesada del modelo de homología fue entonces bloqueada en las densidades de cryoEM. Aunque las estructuras de ambas cadenas son similares, hay un ajuste distintivo que da una mejor correlación con la densidad (FIG. 19A y B). El análisis de la interfaz de proteína Fab-E sugiere que todas las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas pesadas y ligeras están involucradas en la interacción (FIG. S6C).

Tabla 1: Montaje de dominios de proteína DENV 1 E en densidad de cryoEM HM14c10:DENV1.

Proteína E en unidad asimétrica ^a	Dominio de proteína E	Número de átomos colocados	Valor de mapa medio en posiciones de átomo antes ^b /tras ajuste ^c	Nº de átomos fuera de contorno antes ^b /tras ajuste ^c	Cambio de posición previa (Å)	Rotación de posición previa (°)
A	I	889	3,790/4,291	447/362	2,63	16,1
	II	1.260	4,635/5,212	533/424	2,16	3,02
	III	1.522	3,592/4,141	816/695	2,98	6,07
B	I	889	4,126/4,368	403/368	1,37	12,7
	II	1.260	4,715/5,359	539/409	2,30	4,51
	III	1.522	4,185/4,380	685/648	1,48	4,75
C	I	889	4,033/4,261	407/379	1,93	10,2
	II	1.260	4,744/5,098	499/428	1,06	7,37
	III	1.522	4,100/4,345	739/668	1,64	6,03

^a Para la designación de la posición de proteína E véase la FIG. 12.
^b Dominios de proteína E Dengue 1 se superpusieron en primer lugar sobre las posiciones de proteína E de la estructura de cryoEM de virus de Dengue 2 maduro (27).
^c Ajuste de dominios de proteína E Dengue 1 en mapa cryoEM HM14c10:DENV1 (establecido a un nivel de contorno de 4σ) se optimiza mediante el uso de la función de ajuste-in-mapa en Chimera (35).

Las huellas de unión de los dos Fab HM14c10 en una unidad asimétrica no son idénticas (FIG. 12D), con doce aminoácidos comunes a ambas interfaces, pero cuatro que son únicos (Tabla 2). La comparación de secuencias de los residuos de epítipo entre diferentes aislados de DENV1 indica que la mayoría de los residuos se conservan (FIG. 20A), conforme a la actividad neutralizante observada de HM14c10. En contraste, estos residuos no se conservan en otros serotipos DENV o virus del Nilo Occidental (WNV) (FIG. 20B).

Tabla 2. Epítipo Fab HM14c10 en proteínas E de DENV 1.

Fab	Molécula de proteína E en la unidad asimétrica	Dominio de proteína E	Residuos de proteína E*
HM14c10 (I)	A	I	T51, L135, K136, G159, T160, T165, P166, Q167, E172, I173, T275 N52, G274
	A	II	N52, G274
	B	III	K310, E384, K385
HM14c10 (II)	B	I	T51, Q131, Y132, G159, T160, T165, P166, Q167, E172, I173, L175, T275 N52, G274
	B	II	N52, G274
	C	III	L308, K310

*Residuos comunes en ambos epítipos ligados por Fab HM14c10 (I) y HM14c10 (II) se indican en negrita.

Ejemplo 3: Microscopía confocal a intervalos de tiempo que revela el mecanismo de neutralización de HM14c10.

Los anticuerpos pueden neutralizar infecciones virales por diversos mecanismos que incluyen la inhibición de la fijación del virus o la fusión a membranas endosomales, o mediante el bloqueo de los cambios conformacionales inducidos por virus de las glicoproteínas de la superficie (20, 21). Para entender el mecanismo de neutralización HM14c10 de DENV1, se empleó microscopía confocal a intervalos de tiempo para realizar un seguimiento de la infección de las células por vivo, marcado con fluorescencia DENV (22) (FIG. 13 y 21A). Cuando se incubaron células BHK con DENV1 y control de isotipo Mabs (unión no DENV), el virus se unió en múltiples compartimentos, predominantemente perinucleares, intra-celulares (FIG. 14A (a)). Concentraciones neutralizantes de HM4G2 indujeron la formación de agregados virales en el espacio extracelular pero también se internalizaron con éxito, lo que confirma que HM4G2 no inhibe virus de fijación/internalización (FIG. 13A (b)). En contraste, HM14c10 indujo la formación de agregados más pequeños, pero adjunto bloqueado eficazmente, manteniéndose la mayoría de las pequeñas partículas virales en el espacio extracelular después de una hora (FIG. 13A (c)). HM4G2 retrasa la acumulación de virus intracelulares en comparación con el control de isotipo (FIG. 13B, paneles superior e intermedio). Complejos HM14c10:DENV1 no entraron en las células pero se podían ver desviar de su superficie (Fig. 13B, panel inferior). El grado de DENV1 fluorescente internalizado en todas las tres condiciones se cuantificó (FIG. 13C). Estos datos sugieren que el modo primario de la inhibición de DENV1 por HM14c10 se realiza a través de un bloqueo de la fijación del virus a las células huésped.

Ejemplo 4: HM14c10 exhibe gran actividad profiláctica y terapéutica *in vivo*.

DENV no es un patógeno natural en roedores inmunocompetentes, es posible inducir una viremia dependiente de la dosis en ratones GA129 deficientes en receptores de IFN de tipo I/II. Hemos inyectado estos ratones con DENV1 no modificada subcutáneamente (modelo I, FIG. 21B (a)) o intraperitonealmente (modelo II, FIG. 21B (b)), luego cuantificó viremia 3-4 días más tarde, respectivamente (20). Dos aislados clínicos DENV1, que representan genotipos dispares (genotipo EHI-D1 I contra Westpac genotipo IV), se utilizaron para determinar la eficacia *in vivo* de HM14c10. En ambos modelos, HM14c10 previno la enfermedad cuando se administra a los ratones 24 horas antes de la infección DENV1, o cuando se administra 48 h después de la infección (FIG. 13D). La menor concentración de HM14c10 donde se observó una reducción significativa en la viremia es de 0,6 µg por ratón (o 160 pM), lo que representa una potencia *in vivo* que no ha sido igualada por cualquier otra formulación terapéutica anti-DENV informada.

Discusión

Los informes recientes sobre las respuestas humorales engendradas por la infección DENV (23, 24) sugieren que hay un predominio de anticuerpos que son en su mayoría serotipo DENV de reacción cruzada con las actividades de neutralización débiles. Aunque escaso en el repertorio de suero humano, se sugieren los anticuerpos E-DIII para proteger contra la infección por DENV (23, 24) y esto es consistente con los estudios sobre la respuesta de anticuerpos murinos para DENV (7). Los anticuerpos humanos caracterizados han sido principalmente específicos para DI y DII de la proteína del virus E. Se observó un pequeño número de anticuerpos caracterizados que se unen a todo el virus, pero no a la proteína E recombinante que sugiere especificidad para epítomos dependientes de estructura cuaternaria (23). En este estudio, hemos aislado y caracterizado a fondo un anticuerpo neutralizante potente contra el serotipo DENV 1. Este anticuerpo es altamente neutralizante en sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*. Ya que se une sólo a DENV1, no causa una infección mejorada de las células mielomonocíticas por otros serotipos DENV.

La estructura cryoEM de resolución 7 Å de Fab HM14c10 complejo con DENV1, mostraron detalles de la unión entre Fab y la proteína E. Este nivel de detalle no se ha observado en las estructuras cryoEM anteriores de complejos de Flavivirus en anticuerpos. La huella del HM14c10 se extiende a través de E-DIII y E-DI:E-DII de una proteína E vecina (Figura 12D.). Un informe sobre un anticuerpo humano CR4354 específico para WNV también ha implicado a esta región como un objetivo para la inmunidad (25). Aunque la estructura cryoEM de WNV complejo con Fab CR4354 se resuelve a una resolución más baja (resolución 14Å) (FIG. 22A), el accesorio de la estructura cristalina Fab CR4354 genera una estructura de resolución pseudo-atómica. Esto permitió la identificación de residuos que interactúan. Comparación de epítomo CR4354 en WNV y epítomo HM14c10 en DENV1 (FIG. 22B) mostraron que CR4354 tiene una proporción más grande de la huella en E-DIII mientras que HM14c10 tiene la mayoría de los residuos que interactúan en E-DI. La comparación de secuencias de los epítomos mostró que sólo aproximadamente 20% de la CR4354 se solapa con epítomos HM14c10, y los residuos se solapan en su mayoría no conservada (FIG. 22C).

Aunque epítomos CR4354 y HM14c10 no son idénticos, la unión de estos anticuerpos deben mantener las proteínas E vecinas juntas bloqueando de este modo la estructura del virus y previniendo los cambios de conformación esenciales para una infección productiva es decir, la fijación del virus a la sede de receptores y de fusión dentro de la vía endocítica de las células huésped. Microscopía confocal de imágenes viva de intervalo de tiempo muestra que HM14c10 inhibe la unión de DENV a las células huésped. En contraste CR4354 ha demostrado inhibir preferencialmente fusión WNV lo que sugiere la orientación de esta región por los resultados de anticuerpos

en más de un mecanismo de inhibición.

Se ha sugerido que las proteínas de superficie de DENV se someten a cambios constantes en la condición fisiológica - denominada "respiración" (21). Es posible que la respiración pueda desempeñar un papel en la 5 facilitación de la unión del virus a las células. Ya que HM14c10 interconecta las proteínas E superficiales, puede entonces inhibir la unión mediante la prevención de las proteínas de superficie de someterse a la respiración. Alternativamente, E-DIII ha demostrado ser importante para la unión de la célula huésped, la unión de HM14c10 a E-DIII puede así estéricamente obstaculizar este proceso. HMAb CR4354, aunque se une a la región similar como HM14c10, no inhibe la fijación de WNV. Esto implica que la WNV que causa encefalitis y DENV que causa 10 enfermedad febril no comparten determinantes de unión a receptores idénticos.

Se demostró que HMAb CR4354 prevenía la fusión del virus a la membrana endosomal a pH bajo (25). Ya que HM14c10 también se une a través de las proteínas E vecinas, no se puede descartar la posibilidad de que HM14c10 pueda inhibir la reordenación de estructuras diméricas E a triméricas durante la fusión. El potencial para 15 inhibir tanto la unión al receptor como la fusión puede explicar la eficacia excepcional *in la* de HM14c10.

La mayoría de los flavivirus de proteínas E tienen estructura cuaternaria similar basada en un alto grado de similitud entre las estructuras cryoEM de WNV (26) y DENV (27). Por lo tanto, todas las proteínas E superficiales de flavivirus pueden sufrir reordenamientos estructurales similares durante su ciclo de infección. Los anticuerpos que se 20 dirigen a una región similar como HM14c10 o CR4354 en otros flavivirus pueden por lo tanto ser protectores. Dado que los anticuerpos HM14c10 y CR4354 son los únicos dos anticuerpos caracterizados con esta actividad de unión y ambos se derivan de fuentes humanas, indica que este tipo de epítipo es probablemente un determinante para la inmunidad de Flavivirus generalizada. Esto tiene importantes implicaciones para el diseño y evaluación de futuras vacunas.

Por último, dado que HM14c10 tiene perfiles de neutralización fuertes contra la mayoría de los aislados clínicos de DENV1 y excelente eficacia *in vivo*, este anticuerpo representa un buen candidato terapéutico para el 25 tratamiento de pacientes infectados con DENV1.

30 REFERENCIAS

1. S. B. Halstead, E. J. O'Rourke, Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 146, 201-217 (1977).
2. A. B. Sabin, Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* 1, 30-50 (1952).
3. R. J. Kuhn, W. Zhang, M. G. Rossmann, S. V. Pletnev, J. Corver, E. Lenches, C. T. Jones, S. Mukhopadhyay, P. R. Chipman, E. G. Strauss, T. S. Baker, J. H. Strauss, Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108, 717-725 (2002).
4. F. A. Rey, F. X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz, S. C. Harrison, The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375, 291-298 (1995).
5. Y. Zhang, W. Zhang, S. Ogata, D. Clements, J. H. Strauss, T. S. Baker, R. J. Kuhn, M. G. Rossmann, Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure* 12, 1607-1618 (2004).
6. G. D. Gromowski, A. D. Barrett, Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. *Virology* 366, 349-360 (2007).
7. S. Sukupolvi-Petty, S. K. Austin, W. E. Purtha, T. Oliphant, G. E. Nybakken, J. J. Schlesinger, J. T. Roehrig, G. D. Gromowski, A. D. Barrett, D. H. Fremont, M. S. Diamond, Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes. *J Virol* 81, 12816-12826 (2007).
8. C. M. Midgley, M. Bajwa-Joseph, S. Vasanaathana, W. Limpitikul, B. Wills, A. Flanagan, E. Waiyaiya, H. B. Tran, A. E. Cowper, P. Chotiyarnwon, J. M. Grimes, S. Yoksan, P. Malasit, C. P. Simmons, J. Mongkolsapaya, G. R. Screaton, An in-depth analysis of original antigenic sin in dengue virus infection. *J Virol* 85, 410-421.
9. W. M. Wahala, A. A. Kraus, L. B. Haymore, M. A. Accavitti-Loper, A. M. de Silva, Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology* 392, 103-113 (2009).
10. E. Traggiai, S. Becker, K. Subbarao, L. Kolesnikova, Y. Uematsu, M. R. Giamondo, B. R. Murphy, R. Rappuoli, A. Lanzavecchia, An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med* 10, 871-875 (2004).
11. S. B. Halstead, Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res* 60, 421-467 (2003).
12. R. Littaua, I. Kurane, F. A. Ennis, Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol* 144, 3183-3186 (1990).
13. J. T. Roehrig, R. A. Bolin, R. G. Kelly, Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology* 246, 317-328 (1998).
14. J. Lund, G. Winter, P. T. Jones, J. D. Pound, T. Tanaka, M. R. Walker, P. J. Artymiuk, Y. Arata, D. R. Burton, R. Jefferis, et al., Human Fc gamma RI and Fc gamma RII interact with distinct but overlapping sites on human IgG. *J Immunol* 147, 2657-2662 (1991).
15. M. S. Chiofalo, G. Teti, J. M. Goust, R. Trifiletti, M. F. La Via, Subclass specificity of the Fc receptor for human

- IgG on K562. *Cell Immunol* 114, 272-281 (1988).
16. E. Mehlhop, C. Ansarah-Sobrinho, S. Johnson, M. Engle, D. H. Fremont, T. C. Pierson, M. S. Diamond, Complement protein C1q inhibits antibody-dependent enhancement of flavivirus infection in an IgG subclass-specific manner. *Cell Host Microbe* 2, 417-426 (2007).
- 5 17. J. D. Brien, S. K. Austin, S. Sukupolvi-Petty, K. M. O'Brien, S. Johnson, D. H. Fremont, M. S. Diamond, Genotype-specific neutralization and protection by antibodies against dengue virus type 3. *J Virol* 84, 10630-10643.
18. V. Nayak, M. Dessau, K. Kucera, K. Anthony, M. Ledizet, Y. Modis, Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. *J Virol* 83, 4338-4344 (2009).
- 10 19. N. Eswar, B. Webb, M. A. Marti-Renom, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Y. Shen, U. Pieper, A. Sali, Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 5, Unit 5 6 (2006).
20. R. Rajamanonmani, C. Nkenfou, P. Clancy, Y. H. Yau, S. G. Shochat, S. Sukupolvi-Petty, W. Schul, M. S. Diamond, S. G. Vasudevan, J. Lescar, On a mouse monoclonal antibody that neutralizes all four dengue virus serotypes. *J Gen Virol* 90, 799-809 (2009).
- 15 21. S. M. Lok, V. Kostyuchenko, G. E. Nybakken, H. A. Holdaway, A. J. Battisti, S. Sukupolvi-Petty, D. Sedlak, D. H. Fremont, P. R. Chipman, J. T. Roehrig, M. S. Diamond, R. J. Kuhn, M. G. Rossmann, Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins. *Nat Struct Mol Biol* 15, 312-317 (2008).
22. S. L. Zhang, H. C. Tan, B. J. Hanson, E. E. Ooi, A simple method for Alexa Fluor dye labelling of dengue virus. *J Virol Methods* 167, 172-177 (2010).
- 20 23. R. de Alwis, M. Beltramello, W. B. Messer, S. Sukupolvi-Petty, W. M. Wahala, A. Kraus, N. P. Olivarez, Q. Pham, J. Brian, W. Y. Tsai, W. K. Wang, S. Halstead, S. Kliks, M. S. Diamond, R. Baric, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, A. M. de Silva, In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1188.
- 25 24. M. Beltramello, K. L. Williams, C. P. Simmons, A. Macagno, L. Simonelli, N. T. Quyen, S. Sukupolvi-Petty, E. Navarro-Sanchez, P. R. Young, A. M. de Silva, F. A. Rey, L. Varani, S. S. Whitehead, M. S. Diamond, E. Harris, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe* 8, 271-283.
- 30 25. B. Kaufmann, M. R. Vogt, J. Goudsmit, H. A. Holdaway, A. A. Aksyuk, P. R. Chipman, R. J. Kuhn, M. S. Diamond, M. G. Rossmann, Neutralization of West Nile virus by cross-linking of its surface proteins with Fab fragments of the human monoclonal antibody CR4354. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18950-18955.
26. S. Mukhopadhyay, B. S. Kim, P. R. Chipman, M. G. Rossmann, R. J. Kuhn, Structure of West Nile virus. *Science* 302, 248 (2003).
- 35 27. W. Zhang, P. R. Chipman, J. Corver, P. R. Johnson, Y. Zhang, S. Mukhopadhyay, T. S. Baker, J. H. Strauss, M. G. Rossmann, R. J. Kuhn, Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol* 10, 907-912 (2003).
28. C. Y. Huang, S. Butrapet, D. J. Pierro, G. J. Chang, A. R. Hunt, N. Bhamarapavati, D. J. Gubler, R. M. Kinney, Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK-53)/dengue type 1 virus as a potential candidate dengue type 1 virus vaccine. *J Virol* 74, 3020-3028 (2000).
- 40 29. J. G. Low, E. E. Ooi, T. Tolfvenstam, Y. S. Leo, M. L. Hibberd, L. C. Ng, Y. L. Lai, G. S. Yap, C. S. Li, S. G. Vasudevan, A. Ong, Early Dengue infection and outcome study (EDEN) - study design and preliminary findings. *Ann Acad Med Singapore* 35, 783-789 (2006).
30. B. J. Hanson, A. C. Boon, A. P. Lim, A. Webb, E. E. Ooi, R. J. Webby, Passive immunoprophylaxis and therapy with humanized monoclonal antibody specific for influenza A H5 hemagglutinin in mice. *Respir Res* 7, 126 (2006).
- 45 31. M. F. van den Broek, U. Muller, S. Huang, M. Aguet, R. M. Zinkernagel, Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *J Virol* 69, 4792-4796 (1995).
32. G. K. Tan, J. K. Ng, S. L. Trasti, W. Schul, G. Yip, S. Alonso, A non mouse-adapted dengue virus strain as a new model of severe dengue infection in AG129 mice. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e672 (2010).
- 50 33. S. J. Ludtke, P. R. Baldwin, W. Chiu, EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol* 128, 82-97 (1999).
34. X. Liu, W. Jiang, J. Jakana, W. Chiu, Averaging tens to hundreds of icosahedral particle images to resolve protein secondary structure elements using a Multi-Path Simulated Annealing optimization algorithm. *J Struct Biol* 160, 11-27 (2007).
- 55 35. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612 (2004).
36. Kohler and Milstein. Continuous culture of fused cells secreting antibody of redefined specificity. *Nature*, 1975. 256, pp495-497.
- 60 37. Rosen, A.; Gergely, P.; Jondal, M.; Klein, G. and Britton, S. Polyclonal Ig production after Epstein-Barr virus infection of human lymphocytes in vitro. *Nature*, 1977. 267, p. 52-54, Steinitz, M.; Klein, G.; Koskimies, S. and Makel, O. EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature*, 1977. 269, p. 420-422,
38. Gubler, D.J., Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*, 2002. 10(2): p. 100-3.
- 65 39. Mackenzie, J.S., D.J. Gubler, and L.R. Petersen, Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med*, 2004. 10(12 Suppl): p. S98-109
- Gubler, D.J., Cities spawn epidemic dengue viruses. *Nat Med*, 2004. 10(2): p. 129-30.

> Pinheiro, F.P. and S.J. Corber, Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. World Health Stat Q, 1997. 50(3-4): p. 161-9.

41. Ooi, E.E., K.T. Goh, and D.J. Gubler, Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. Emerg Infect Dis, 2006. 12(6): p. 887-93.

5 42. Edelman, R., Dengue vaccines approach the finish line. Clin Infect Dis, 2007. 45 Suppl 1: p. S56-60.

43. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. Nat Struct Biol, 2003.10(11): p. 907-912

10 Aunque se han descrito e ilustrado aspectos específicos de la invención, dichos aspectos deben ser considerados ilustrativos de la invención solamente y no como limitantes de la invención tal como se interpretará de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

15 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para un experto ordinario en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que ciertos cambios y modificaciones se pueden hacer a la misma sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une específicamente a una proteína (E) de envoltura de serotipo de virus de Dengue 1 o fragmento de la misma, en la que el anticuerpo es un anticuerpo humano con la actividad neutralizante que se une a través de dos proteínas E en un virus, en el que la unión a través de dos proteínas E comprende la unión a DI y la bisagra entre DI y II en la proteína E y DIII de una proteína E vecina.
- 10 **2.** El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se seleccionan del grupo que consiste en: (a) una molécula de inmunoglobulina entera; (b) un scFv; (c) un fragmento Fab; (d) un F(ab')₂; y (e) un Fv vinculado a disulfuro.
- 15 **3.** El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento comprende los mismos:
un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en: (a) un dominio constante de IgM humana; (b) un dominio constante de IgG1 humana; (c) un dominio constante de IgG2 humana; (d) un dominio constante de IgG3 humana; (e) un dominio constante de IgG4 humana; y (f) un dominio constante de IgA1/2 humana;
- 20 **4.** El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende:
una cadena pesada que comprende al menos una CDR seleccionada de entre el grupo de CDRs con las secuencias de aminoácidos SYGMH, VIWYDGSKTYYGDSVKG o GIAGGWAFW.
- 25 **5.** El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento comprende los mismos:
una cadena pesada que comprende las tres CDR con las secuencias de aminoácidos SYGMH, VIWYDGSKTYYGDSVKG y GIAGGWAFW.
- 30 **6.** El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende:
una cadena pesada con la secuencia de aminoácidos
- 35
EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKG
40
LEWVAVIWYDGSKTYYGDSVKG RFTISKDNSKMKMVLNMQMDSLGV
EDTAFYYCARGIAGGWAFW GIDLWGQGTLVTVSS.
45
- 7.** El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento comprende:
un marco de cadena pesada de IGHV1-2*02 y al menos una de las CDR con la secuencia de aminoácidos SYGMH, VIWYDGSKTYYGDSVKG o GIAGGWAFW.
- 50 **8.** El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento comprende:
un dominio constante de inmunoglobulina de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en: (a) un dominio constante de Ig kappa humana; y (b) un dominio constante de Ig lambda humana.
- 55 **9.** El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende:
una cadena ligera que comprende al menos una CDR seleccionada de entre el grupo de CDRs con las secuencias de aminoácidos RASQNVYSYLG, GVTSRAT o QQYAG.
- 60 **10.** El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento comprende:
- 65

una cadena ligera que comprende las tres CDR con las secuencias de aminoácidos RASQNVYSYLG, GVTSRAT y QQYAG.

5 **11.** El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende:

una cadena ligera con la secuencia de aminoácidos

10 DVVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQNVYSYLGWYQHKPGRSPR
 LLIFGVTSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYA
 15 GSAYTFGQGTKVEIKR

o

20 DIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQNVYSYLGWYQHKPGRSPR
 LLIFGVTSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYA
 25 GSAYTFGQGTKVEIKR.

12. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento comprende:

30 un marco de cadena ligera de IGKV3-20*01 y al menos una de las CDRs con las secuencias de aminoácidos RASQNVYSYLG, GVTSRAT o QQYAG.

13. El anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el anticuerpo:

35 se une a un virus de Dengue que tiene la especificidad de unión de un anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKG LEWVAVIWDGSKTYYGDSVK- GRFTISKDNSKMKMVLQMDSLGV EDTAFYYCARGIAGGWAFWGIDLWGQGLTVSS y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera

40 DVVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQNVYSYLGWYQHKPGRSPR
 LLIFGVTSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYA
 45 GSAYTFGQGTKVEIKR

o

50 DIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQNVYSYLGWYQHKPGRSPR
 LLIFGVTSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYA
 55 GSAYTFGQGTKVEIKR.

14. El anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el anticuerpo:

60 es un anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKG LEWVAVIWDGSKTYYGDSVKGRFTISKDNSKMKMVLQMDSLGV EDTAFYYCARGIAGGWAFWGIDLWGQGLTVSS y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera

65

DVVMTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQNVYSYLGWYQHKPGRSPR

5 LLIFGVTSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYA
GSAYTFGQGTKVEIKR

10 o

15 DIVMTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQNVYSYLGWYQHKPGRSPR
LLIFGVTSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYA
GSAYTFGQGTKVEIKR.

20 **15.** El anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une a un antígeno con una constante de afinidad (K_D) de menos de 1×10^{-8} M y, opcionalmente, se une a un antígeno con una constante de afinidad (K_D) de menos de 1×10^{-9} M.

25 **16.** El anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el anticuerpo se deriva de una célula B de un paciente que se ha recuperado de la infección por el virus de Dengue.

17. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable eficaz para reducir o prevenir la infección por virus de Dengue en un sujeto.

30 **18.** La composición farmacéutica de la reivindicación 17, que comprende además un segundo agente.

19. Un anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 para su uso en un método de inmunización pasiva contra la infección por virus de Dengue que comprenden la administración a un sujeto de una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16.

40 **20.** Un anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 para su uso en un método de tratamiento de la infección por virus de Dengue que comprende la administración a un sujeto en necesidad del mismo de una cantidad de anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 que es eficaz para reducir o prevenir la enfermedad.

21. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 20, en donde:

45 el anticuerpo se administra por vía intravenosa (IV), subcutánea (SC), intramuscular (IM), transdérmica, o por vía oral; o
el anticuerpo se administra en una cantidad en el intervalo de 1 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal del sujeto; o
dicho uso comprende además la administración de un segundo agente, opcionalmente en el que el segundo agente es fármaco antiviral o fármaco analgésico.

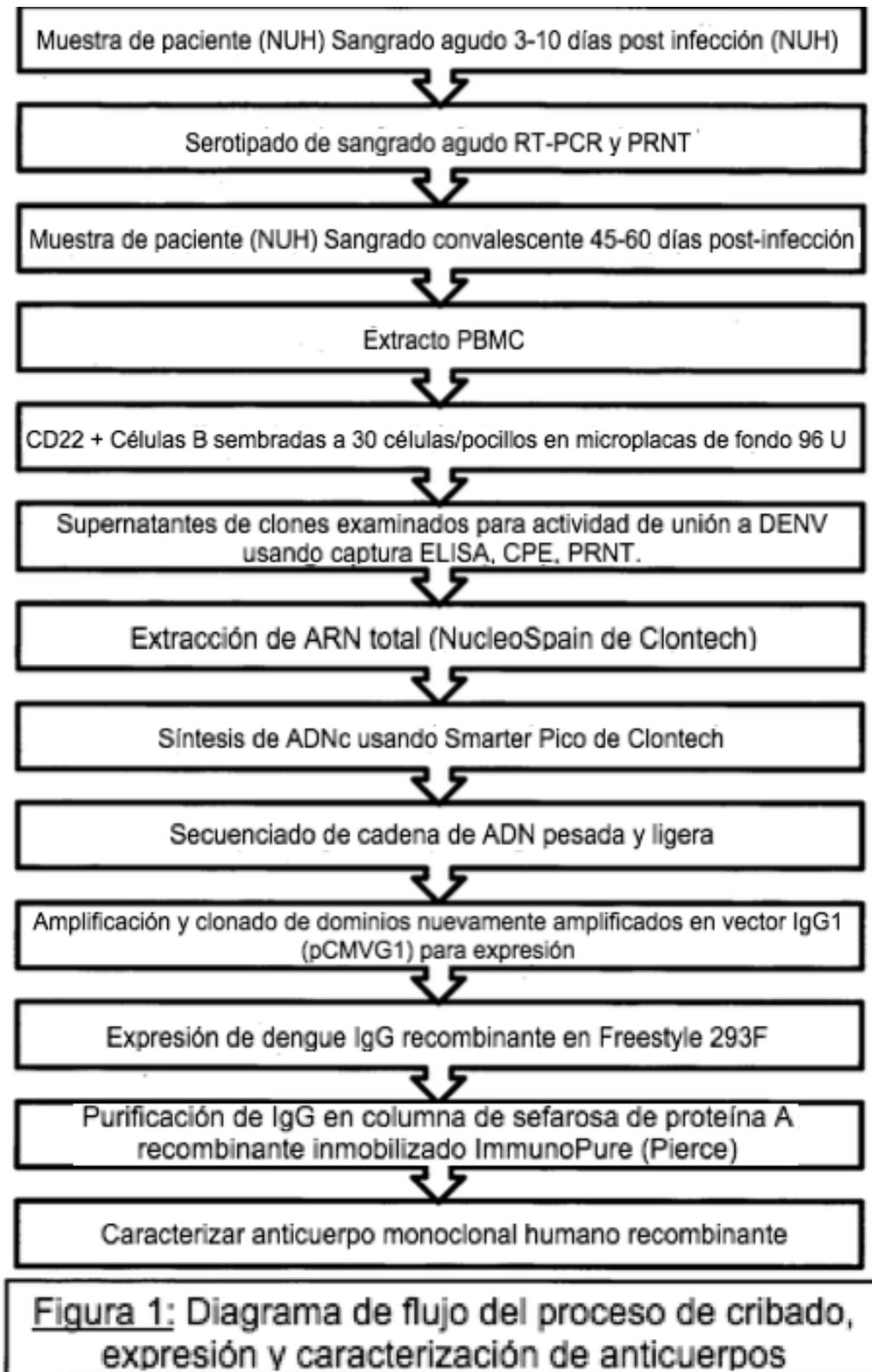
50 **22.** Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16.

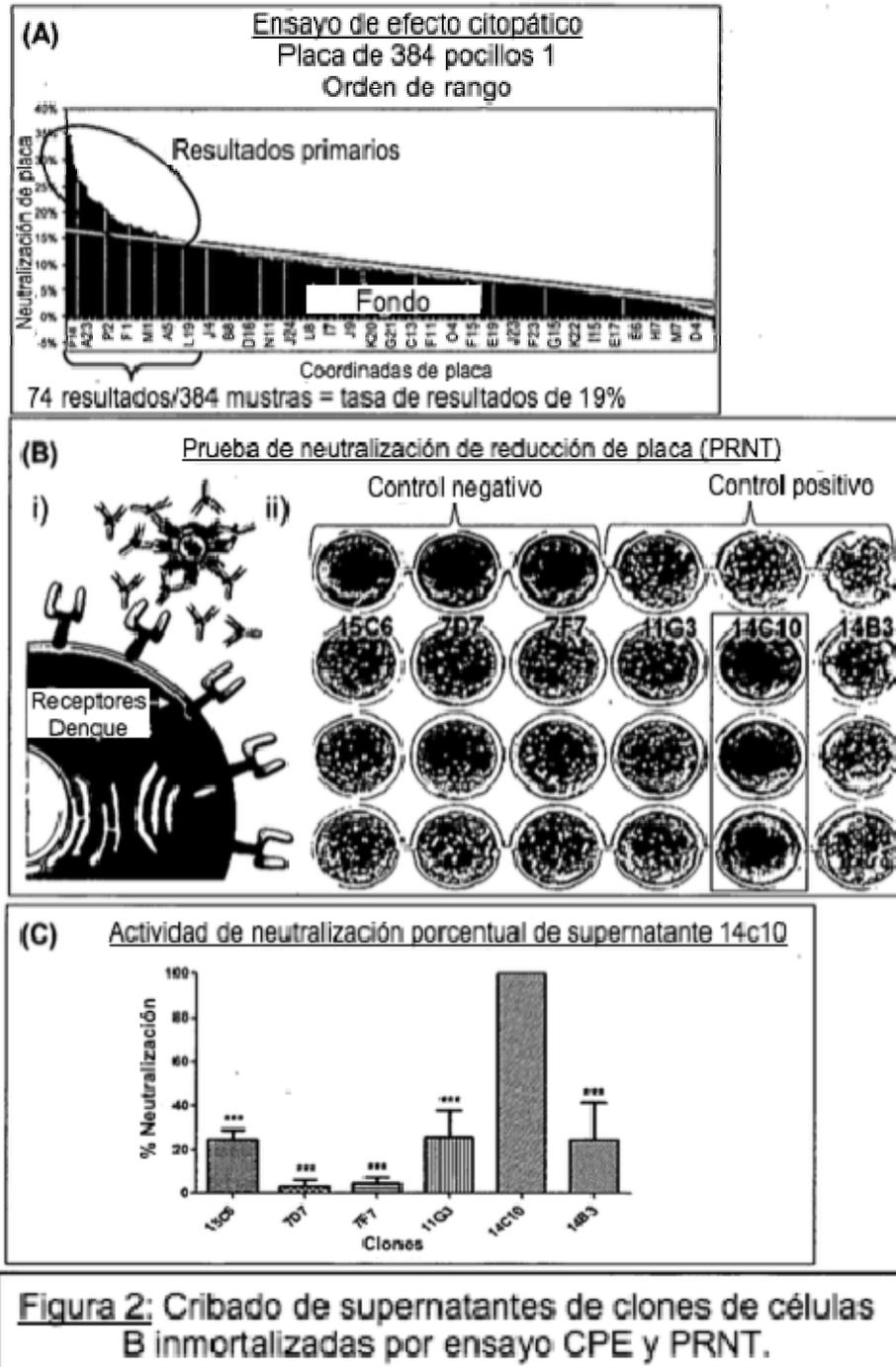
55 **23.** Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 22.

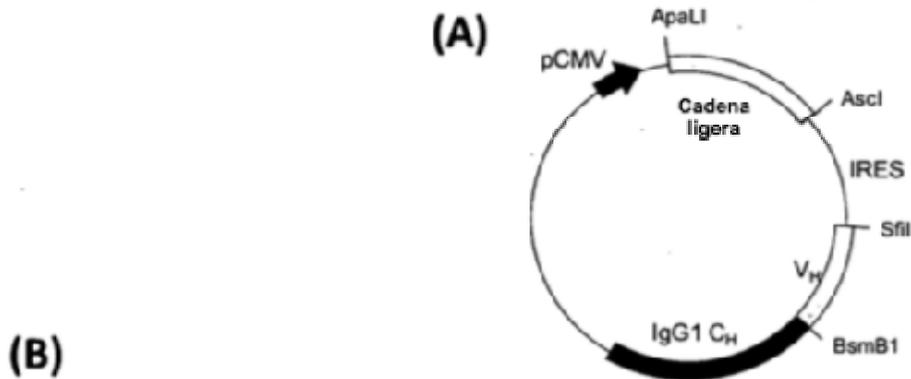
24. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 23, opcionalmente en la que la célula huésped es una célula bacteriana, una célula eucariótica, o una célula de mamífero

60

65

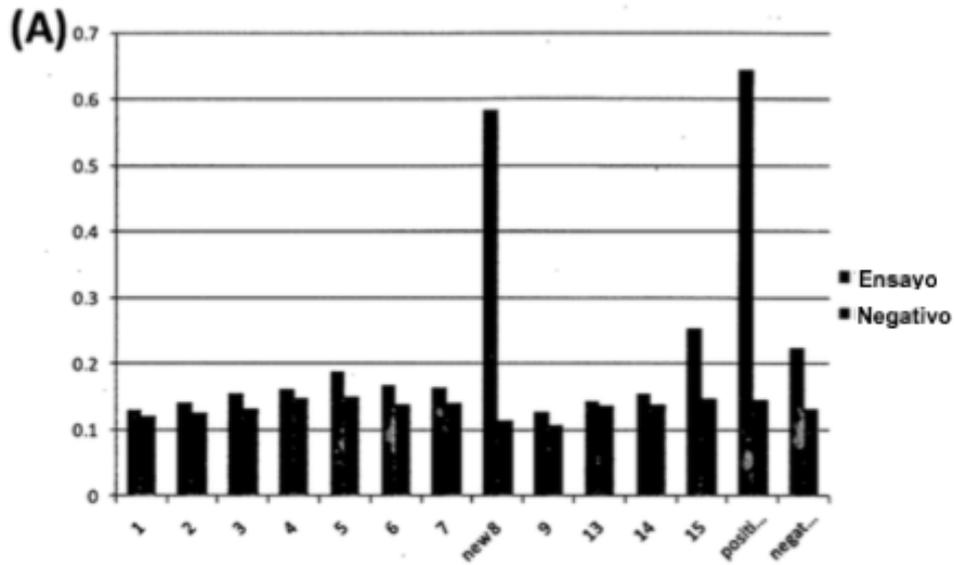






Clon	Secuencia de cadena ligera	Secuencia de cadena pesada
1	DIVMTQSP ¹ SLSVTPGQPASISCRSSQSLHSDGRT SLDWFLLRPGQFPQVKISELSRRFSGVDPDRVSGSG SGTDFTLKISRGEAEDVRAFVYQYGYVGRSAKGPS WRSN	QVQLVQSGAEVKKPGT ¹ SVKVSCKASGYNFTDYYVHWVRQ APGQGLEWMAWINPNSGGSKYAQMFGGRISLTRDTSISTA YLELFSLTSDDAVYYCADLTAEDVWGGGLVTVSSGTTV TVSS
2	DIVMTQSP ¹ SLSVTPGQPASISCRSSQSLHSDGRT SLDWFLLRPGQFPQVKISELSRRFSGVDPDRVSGSG SGTDFTLKISRGEAEDVRAFVYQYGYVGRSAKGPS WRSN	EVQLVESGGGVWQ ¹ PGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVR QAPGKGL ¹ EWVAIVWYDGSKTYYGDSVKGKGRFTISKD ¹ NSKK MVLNQ ¹ MDSLGVEDTAFYYCARGIAGGWAFAVYGGIDLWG ¹ GGT LTVSS
3	DIVMTQSP ¹ SLSVTPGQPASISCRSSQSLHSDGRT SLDWFLLRPGQFPQVKISELSRRFSGVDPDRVSGSG SGTDFTLKISRGEAEDVRAFVYQYGYVGRSAKGPS WRSN	EVQLVQSGGGVWR ¹ PGKSLRLSCAASGFTFDYGM ¹ SWVR QAPGKGL ¹ EWVSGINWNGGSTIGYADSVKGRFTISR ¹ DNAKN SLYQM ¹ NSLRAEDTAFYYCAREYGGSGSYINWFDPWG ¹ GGT LTVSS
4	DIQMTQSP ¹ SLSPVTPGEPASISCRSSQSLHHTNGN YLDWYLQKPGQSPQLLIYGSNRRASGVDPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQALQIXTTFGG GTKLEIKR	QVQLVQSGAEVKKPGT ¹ SVKVSCKASGYNFTDYYVHWVRQ APGQGLEWMAWINPNSGGSKYAQMFGGRISLTRDTSISTA YLELFSLTSDDAVYYCADLTAEDVWGGGLVTVSSGTTV TVSS
5	DIQMTQSP ¹ SLSPVTPGEPASISCRSSQSLHHTNGN YLDWYLQKPGQSPQLLIYGSNRRASGVDPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQALQIXTTFGG GTKLEIKR	EVQLVESGGGVWQ ¹ PGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVR QAPGKGL ¹ EWVAIVWYDGSKTYYGDSVKGKGRFTISKD ¹ NSKK MVLNQ ¹ MDSLGVEDTAFYYCARGIAGGWAFAVYGGIDLWG ¹ GGT LTVSS
6	DIQMTQSP ¹ SLSPVTPGEPASISCRSSQSLHHTNGN YLDWYLQKPGQSPQLLIYGSNRRASGVDPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQALQIXTTFGG GTKLEIKR	EVQLVQSGGGVWR ¹ PGKSLRLSCAASGFTFDYGM ¹ SWVR QAPGKGL ¹ EWVSGINWNGGSTIGYADSVKGRFTISR ¹ DNAKN SLYQM ¹ NSLRAEDTAFYYCAREYGGSGSYINWFDPWG ¹ GGT LTVSS
7	DIVMTQSP ¹ GTLSLSPGERATLSCRASQNVVYSYLGW YQHKPGRSPRLIFGVTSRAIGVDPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAGSAYTFGQGTKVEI K	QVQLVQSGAEVKKPGT ¹ SVKVSCKASGYNFTDYYVHWVRQ APGQGLEWMAWINPNSGGSKYAQMFGGRISLTRDTSISTA YLELFSLTSDDAVYYCADLTAEDVWGGGLVTVSSGTTV TVSS
8*	DIVMTQSP ¹ GTLSLSPGERATLSCRASQNVVYSYLGW YQHKPGRSPRLIFGVTSRAIGVDPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAGSAYTFGQGTKVEI K	EVQLVESGGGVWQ ¹ PGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVR QAPGKGL ¹ EWVAIVWYDGSKTYYGDSVKGKGRFTISKD ¹ NSKK MVLNQ ¹ MDSLGVEDTAFYYCARGIAGGWAFAVYGGIDLWG ¹ GGT LTVSS
9	DIVMTQSP ¹ GTLSLSPGERATLSCRASQNVVYSYLGW YQHKPGRSPRLIFGVTSRAIGVDPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAGSAYTFGQGTKVEI K	EVQLVQSGGGVWR ¹ PGKSLRLSCAASGFTFDYGM ¹ SWVR QAPGKGL ¹ EWVSGINWNGGSTIGYADSVKGRFTISR ¹ DNAKN SLYQM ¹ NSLRAEDTAFYYCAREYGGSGSYINWFDPWG ¹ GGT LTVSS
10	DIVMTQSP ¹ DSLAVSLGERATINC ¹ KSSQSVLHSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSAPHKFG QGKLEIK	QVQLVQSGAEVKKPGT ¹ SVKVSCKASGYNFTDYYVHWVRQ APGQGLEWMAWINPNSGGSKYAQMFGGRISLTRDTSISTA YLELFSLTSDDAVYYCADLTAEDVWGGGLVTVSSGTTV TVSS
11	DIVMTQSP ¹ DSLAVSLGERATINC ¹ KSSQSVLHSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSAPHKFG QGKLEIK	EVQLVESGGGVWQ ¹ PGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVR QAPGKGL ¹ EWVAIVWYDGSKTYYGDSVKGKGRFTISKD ¹ NSKK MVLNQ ¹ MDSLGVEDTAFYYCARGIAGGWAFAVYGGIDLWG ¹ GGT LTVSS
12	DIVMTQSP ¹ DSLAVSLGERATINC ¹ KSSQSVLHSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSAPHKFG QGKLEIK	EVQLVQSGGGVWR ¹ PGKSLRLSCAASGFTFDYGM ¹ SWVR QAPGKGL ¹ EWVSGINWNGGSTIGYADSVKGRFTISR ¹ DNAKN SLYQM ¹ NSLRAEDTAFYYCAREYGGSGSYINWFDPWG ¹ GGT LTVSS

Figura 3: Identificación y expresión recombinante de moldes de cadena pesada y ligera de anticuerpo de línea de célula B 14c10



(B)
Cadena pesada : IGHV1-2*02

```

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG 70
E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A
CGTCTGGATTGAGCTTCAGCAGTTATGGCATGCACATGGGTCCGCCAGGCCCCAGGCAAGGGGCTGGAGTG 140
A S G F S F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E W
GGTGGCAGTGTATGGTATGATGGAAGTAAAACGTATTATGGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACATC 210
V A V I W Y D G S K T Y Y G D S V K G R F T I
TCCAAAGACAATTCCAAGAAAATGGTGAATCTCCAAATGGACAGCCTGGGAGTCCGAGGACACGGCTTTTT 280
S K D N S K K M V N L Q M D S L G V E D T A F
ATTACTGTGCAAGAGGGATAGCCGGTGGCTGGGCGITTTGGGGATTGACCTCTGGGGCCAGGGAACCCCT 350
Y Y C A R G I A G G W A F W G I D L W G G G T L
GGTCACCGTCTCCTCA 366
V T V S S
    
```

Cadena ligera : IGKV3-20*01

```

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCA 70
D V V M T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C
GGGCCAGCCAGAATGTTTACAGCTACTTAGGCTGGTACCAGCACAAACCTGGCCGGTCTCCAGGCTCCT 140
R A S Q N V Y S Y L G W Y Q H K P G R S P R L L
CATCTTTGGTGTCAACCAGCAGGGCCACTGGCGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC 210
I F G V T S R A T G V P D R F S G S G S G T D
TTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGGCGGTGTACTACTGTGAGCAGTACGCTGGCT 280
F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y A G
CAGCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGT 324
S A Y T F G Q G T K V E I K R
    
```

Figura 4: Anticuerpo recombinante n°: 8 de línea de células B 14C10 tiene actividad neutralizante para serotipo Dengue 1.

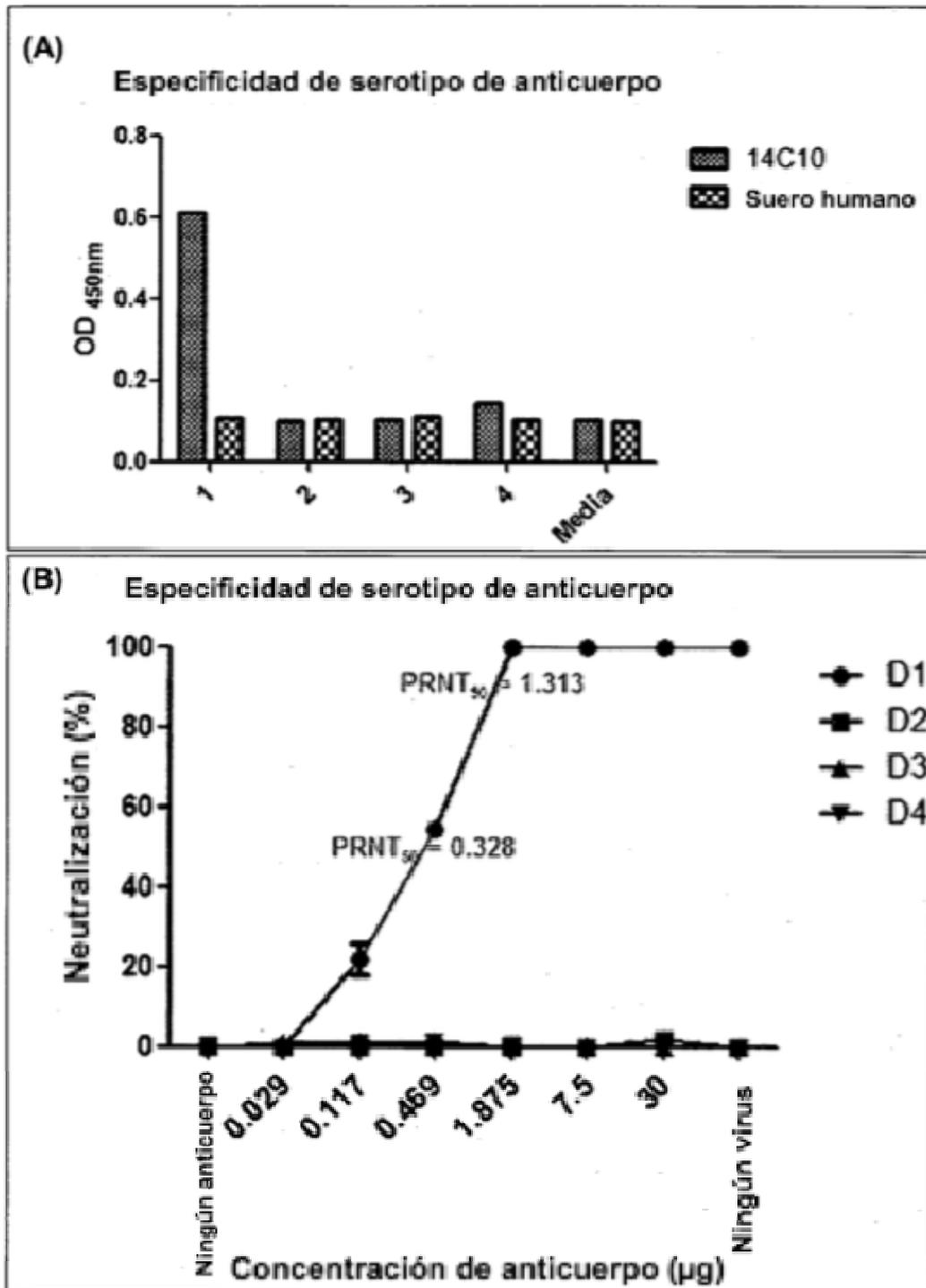


Figura 4: Anticuerpo recombinante n°: 8 de línea de células B 14C10 tiene actividad neutralizante para serotipo Dengue 1.

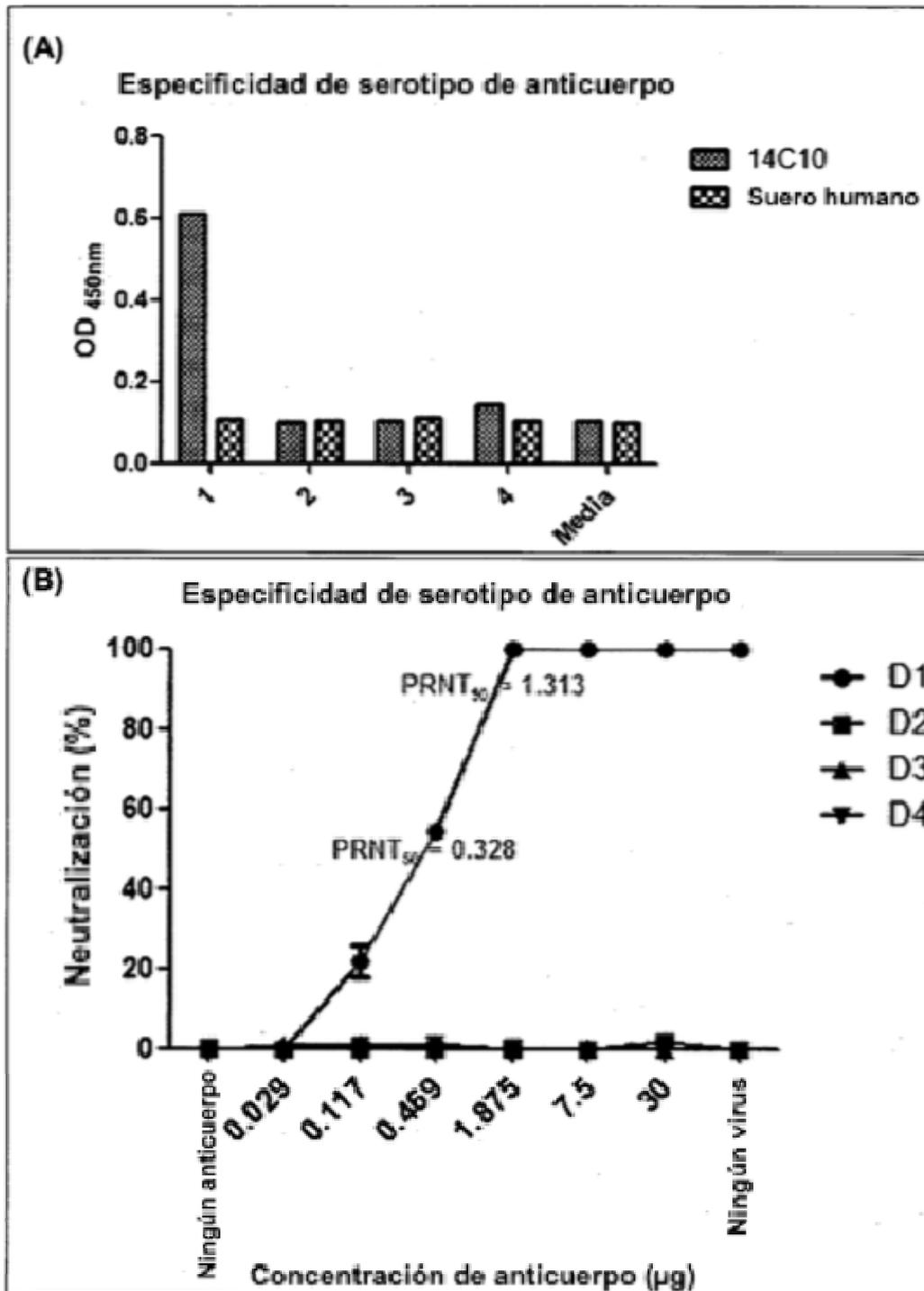


Figura 5: Especificidad de serotipo de anticuerpo 14C10.8 recombinante ensayado por PRNT y ELISA.

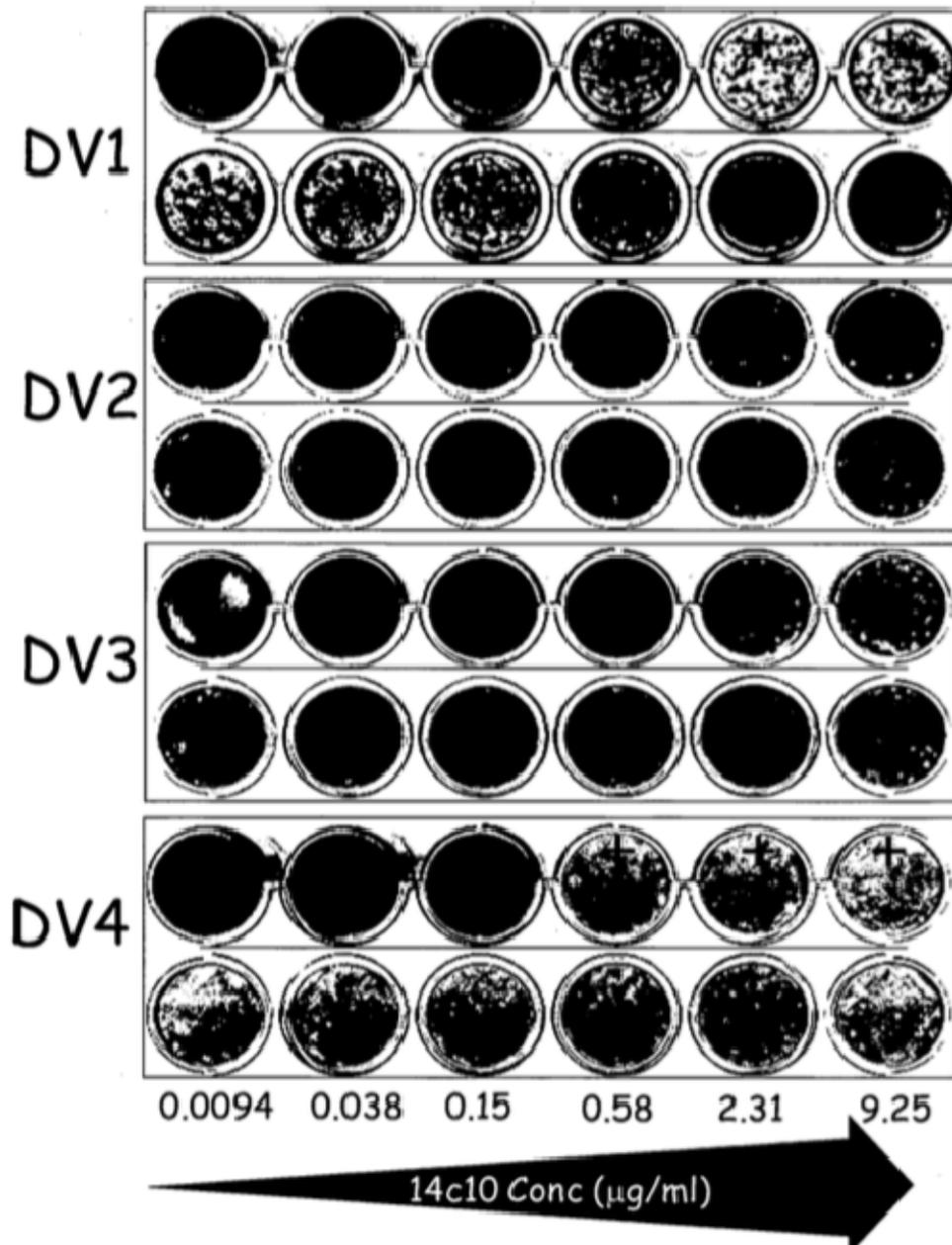


Figura 5 cont.: Especificidad de serotipo de anticuerpo 14C10.8 recombinante con PRNT y ELIZA.

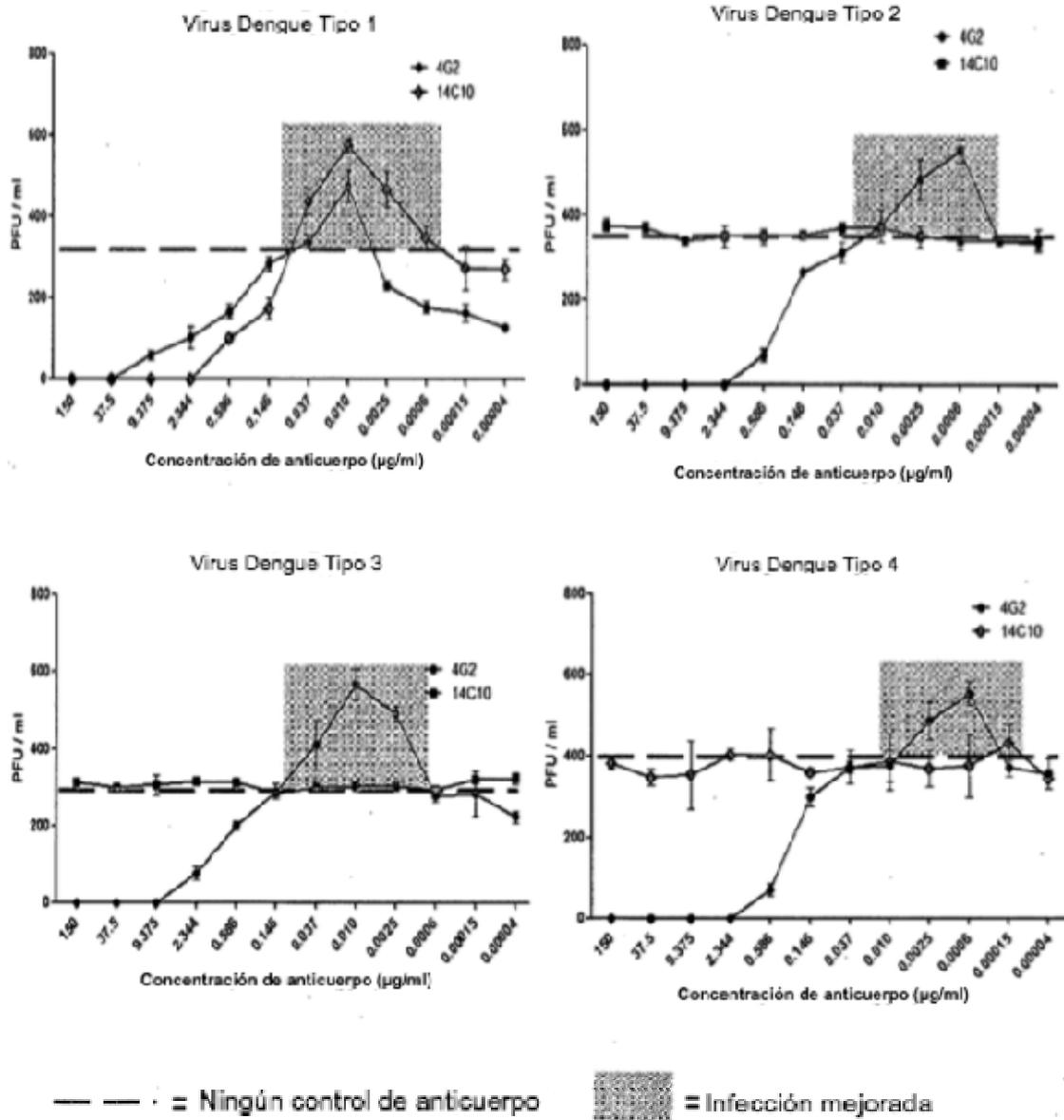


Figura 6: Mejora dependiente de anticuerpo in vitro de serotipo Dengue 1, 2, 3 y 4, infección de células K562 por 14c10 contra 4G2.

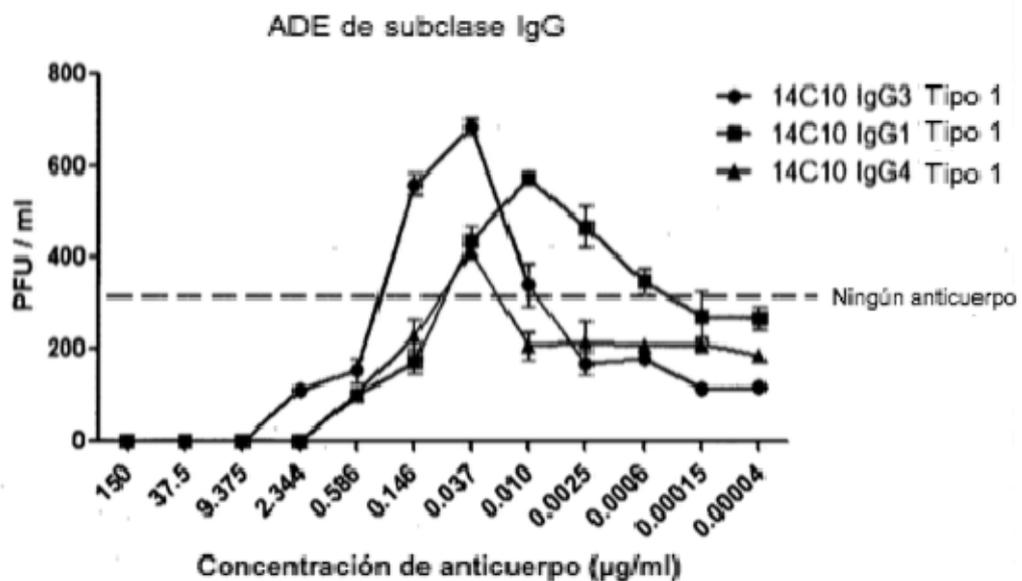
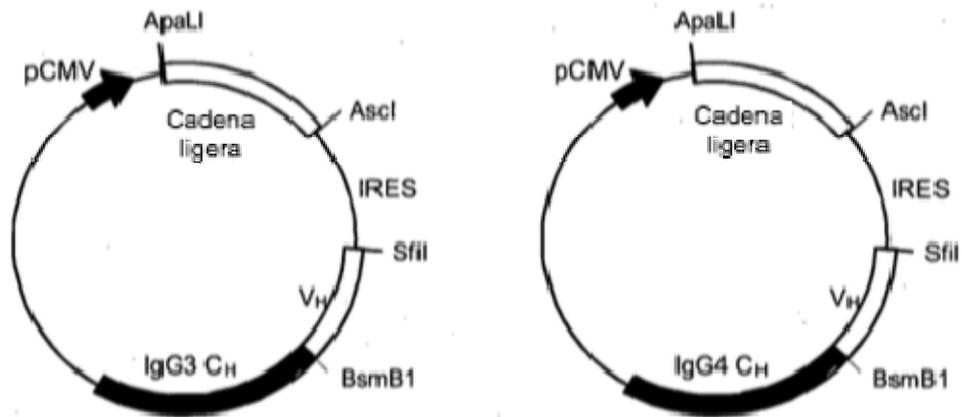


Figura 7: Mejora dependiente de anticuerpo in vitro de serotipo Dengue 1, infección de células K562 por 14c10.8 expresadas como IgG1, IgG3 o IgG4 recombinantes humanas

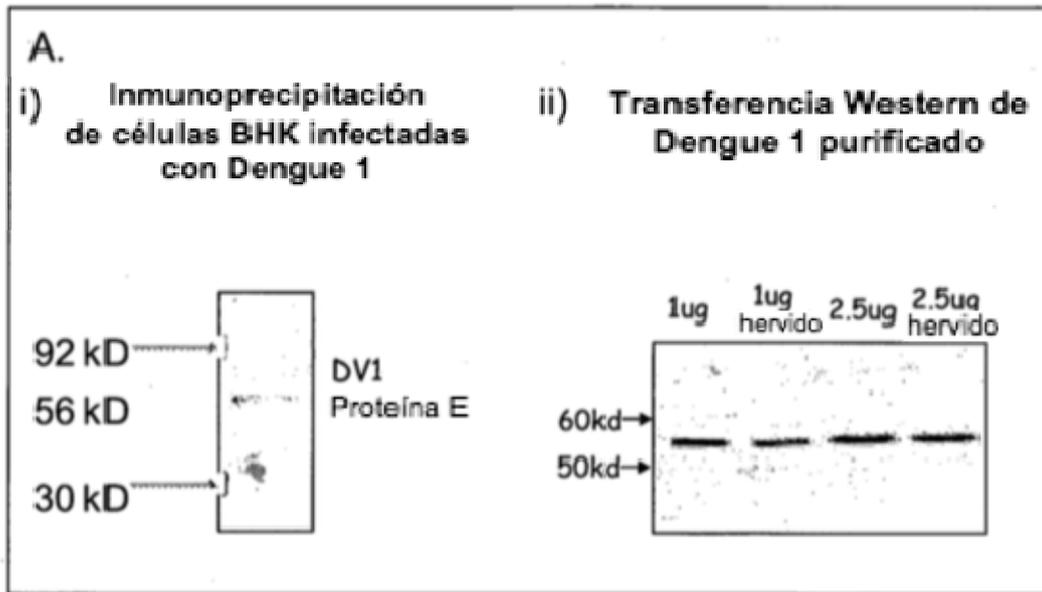


Figura 8: 14c10.8 es específico para un epítopo lineal en proteína E de serotipo Dengue 1

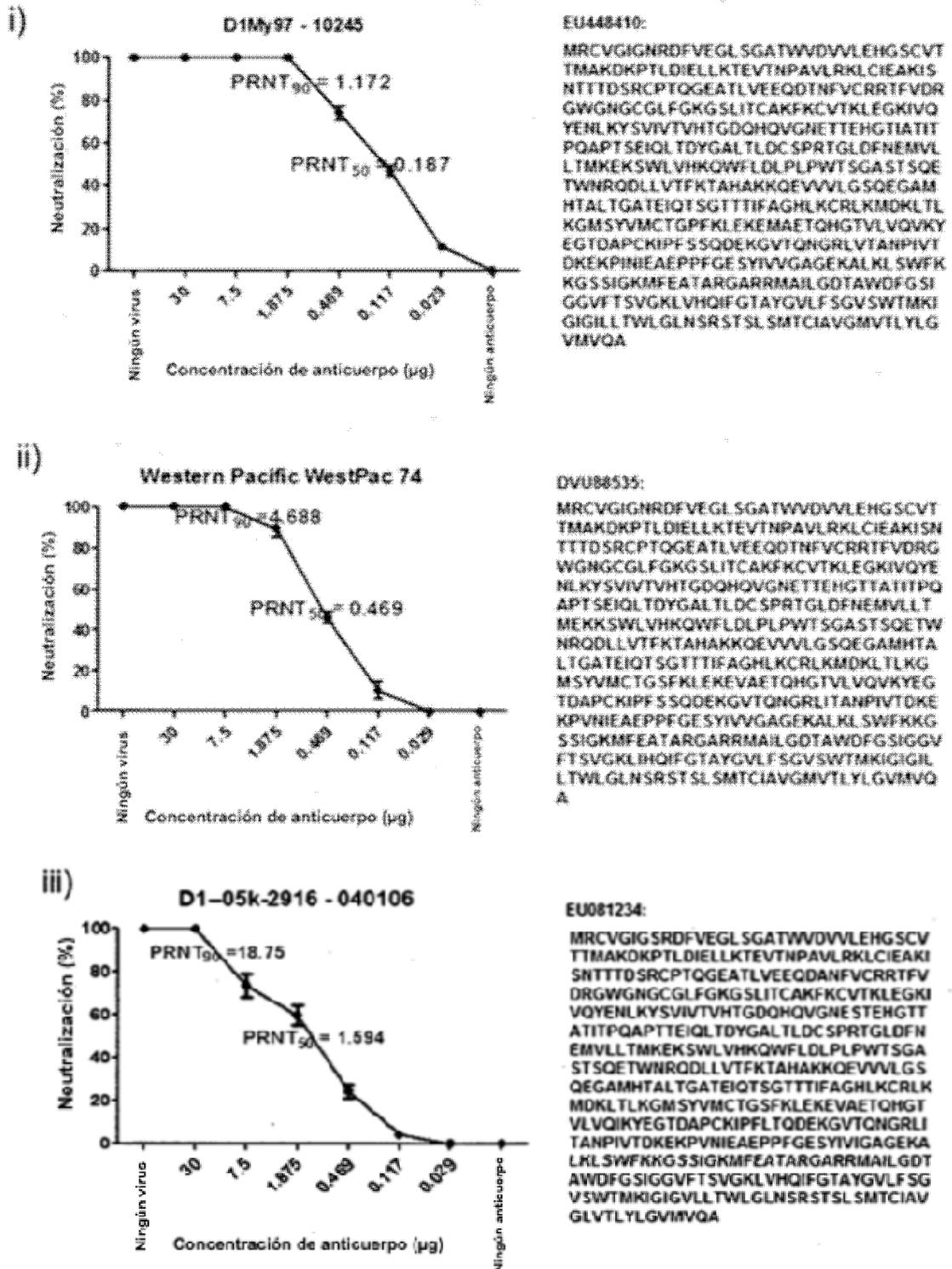
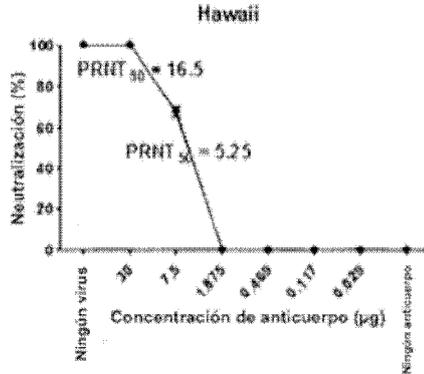


Figura 9: Actividad de neutralización de 14c10 recombinante contra varios genotipos

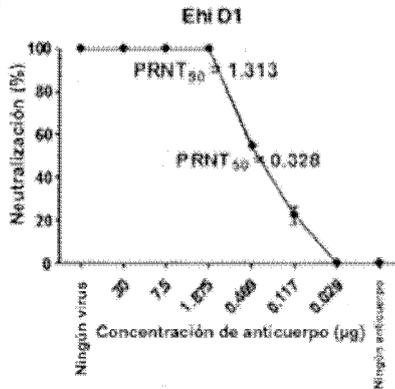
iv)



AF425619:

```
MRCVIGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAK
DKPTLDIELLKTEVTNPAVLRKLCIEAKISNTTDSRCPT
QGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGS
LITCAKFKCVTKLEGKIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHGV
GNETTEHGTIATITPOAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTG
LDFNEMVLLTMKEKSWLVHKQWFLDLPLPWTSGAST
POETWNRDQLLVTFKTAHAKKQEVAVLGSQEGAMHT
ALTGATEIOTSGTTKIFAGHLKCRCLKMDKLLKGM SYV
MCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFS
TQDEKGVTONGRLLITANPIVTOKEKPVNIEAEPFGE SY
IVVGAGEKALKL SWFKKGS SIGKMLEATARGARRMAI
LGDTAWDFG SIGGVFT SVGKLVHQIFGTAYGVLF SGV
SWTMKIGIGILLTWLGLNSRSL SMTCIAVGMVTLYL
GVMVQA
```

v)



GQ357687:

```
MRCVIGIGSRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMA
KDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRKLCIEAKISNTTDSRC
PTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRGWGNGCGLFG
KGLITCAKFKCVTKLEGKIVQYENLKYSVIVTVHTGD
QHGVGNESTEHGTTATITPOAPTTEIQLTDYGALTLDC
SPRTGLDFNEMVLLTMKEKSWLVHKQWFLDLPLP
WTSAGASTSQETWNRDQLLVTFKTAHAKKQEVVVLG
SQEGAMHTALTGATEIOTSGTTIFAGHLKCRCLKMDK
LTLKGM SYVMCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQIKYE
GTDAPCKIPFS TQDEKGVTONGRLLITANPIVTOKEK
PVNIEAEPFGE SYIVIGAGEKALKL SWFKKGS SIGKM
FEATARGARRMAILGDTAWDFG SIGGVFT SVGKLVH
QIFGTAYGVLF SGVSWTMKIGIGILLTWLGLNSRSL
SMTCIAVGLVTLYL GVMVQA
```

Figura 9 cont.: Actividad de neutralización de 14c10.8 recombinante contra varios genotipos

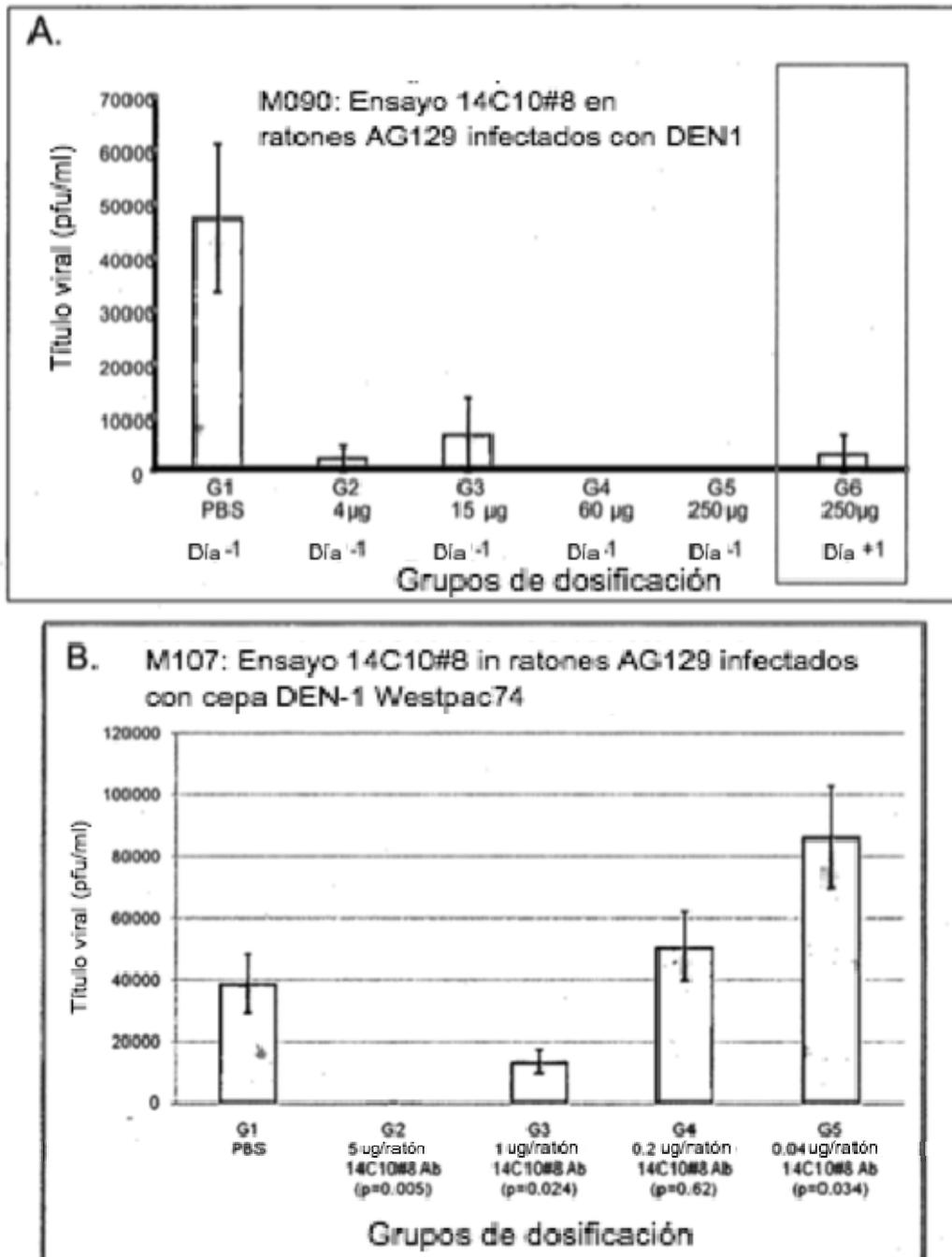


Figura 10: 14c10.8 tiene actividad profiláctico y actividad terapéutica *in vivo*.

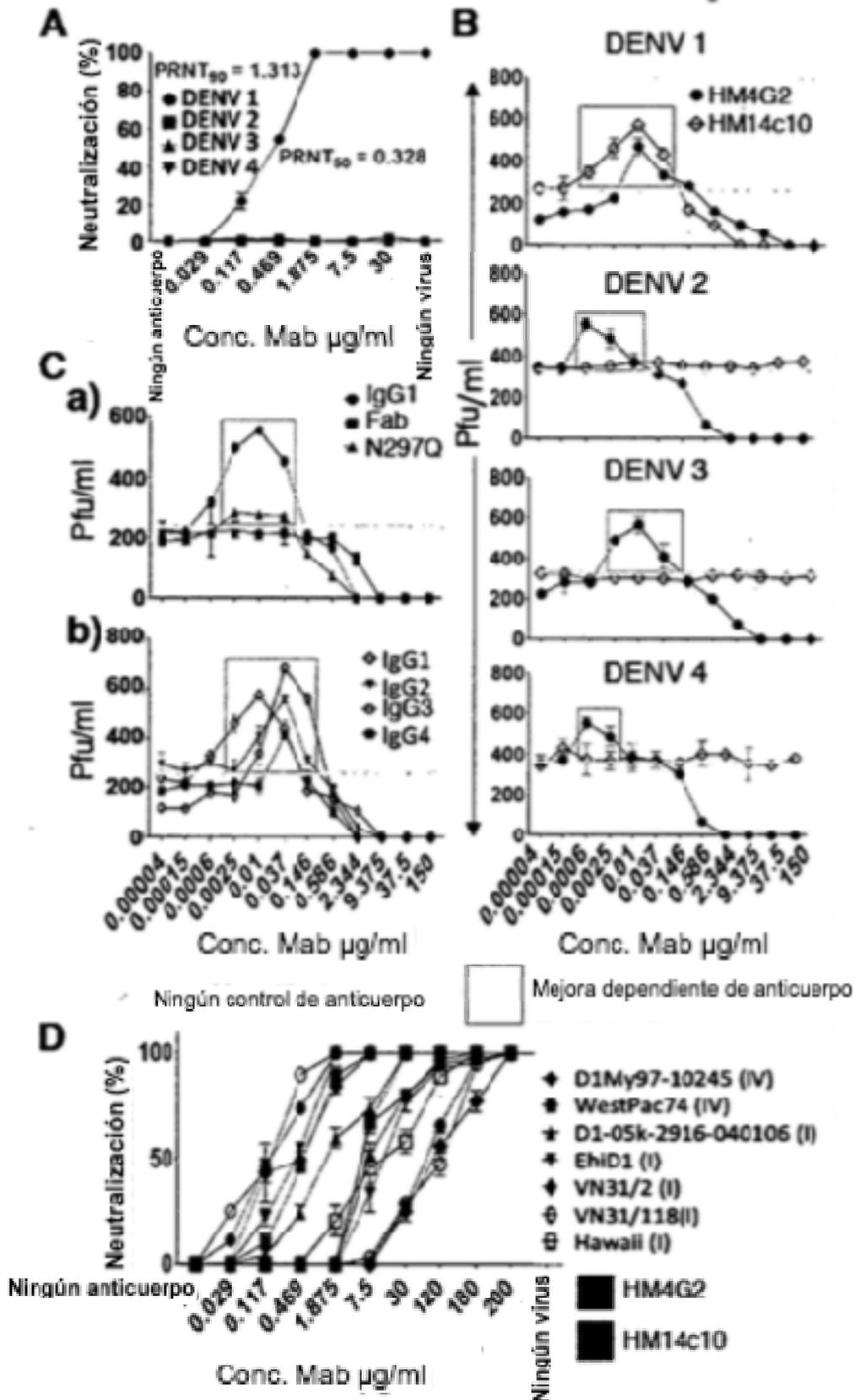


Figura 11

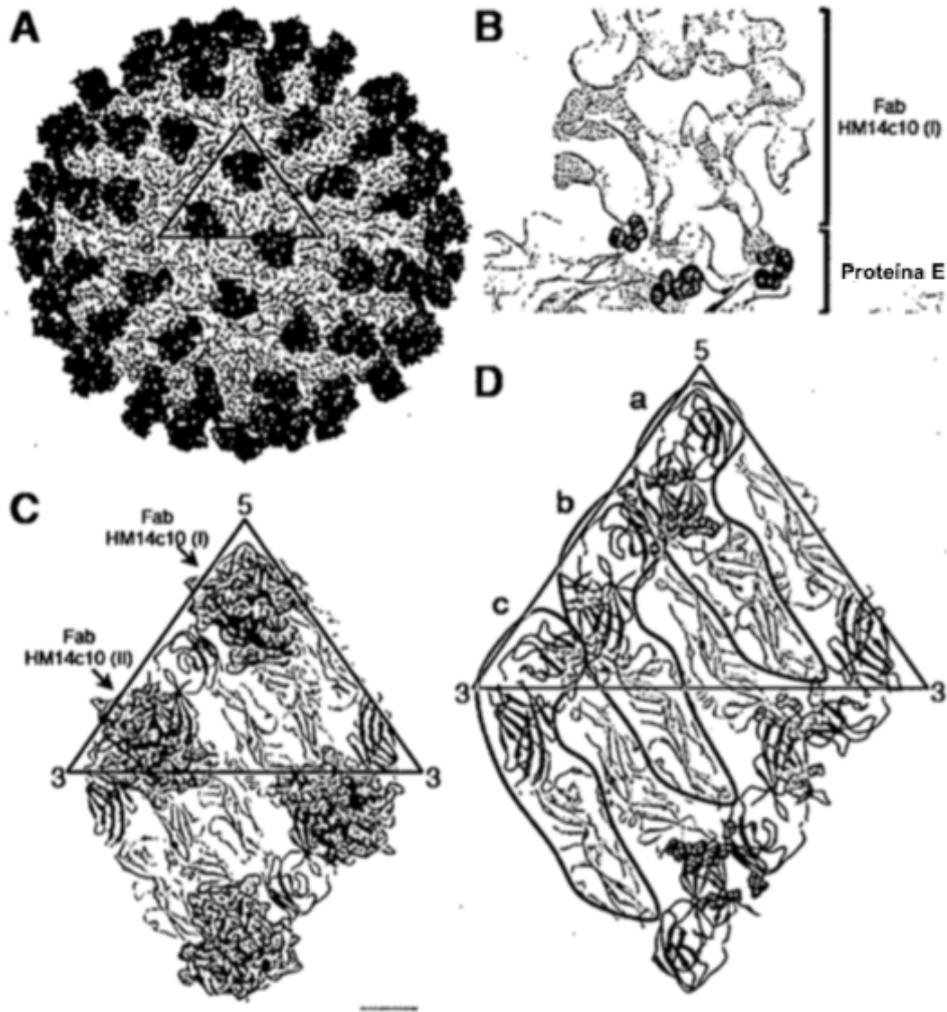


Figura 12

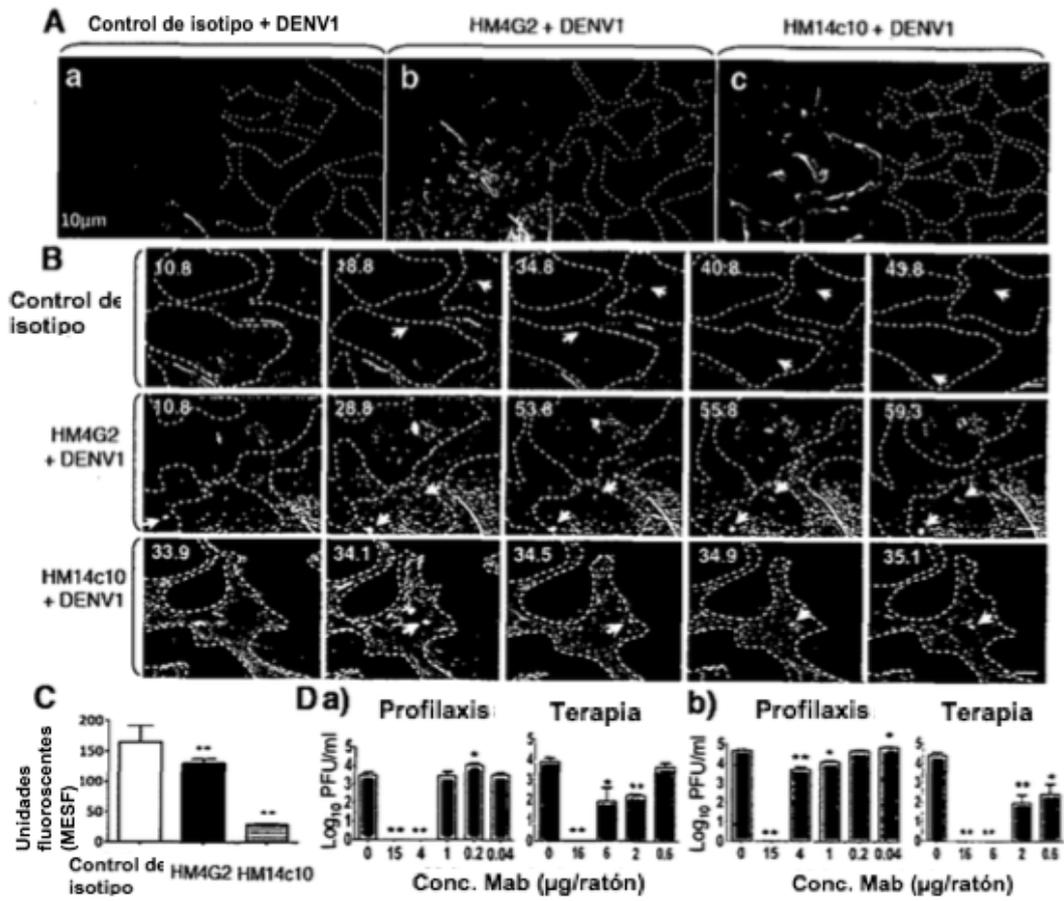


Figura 13

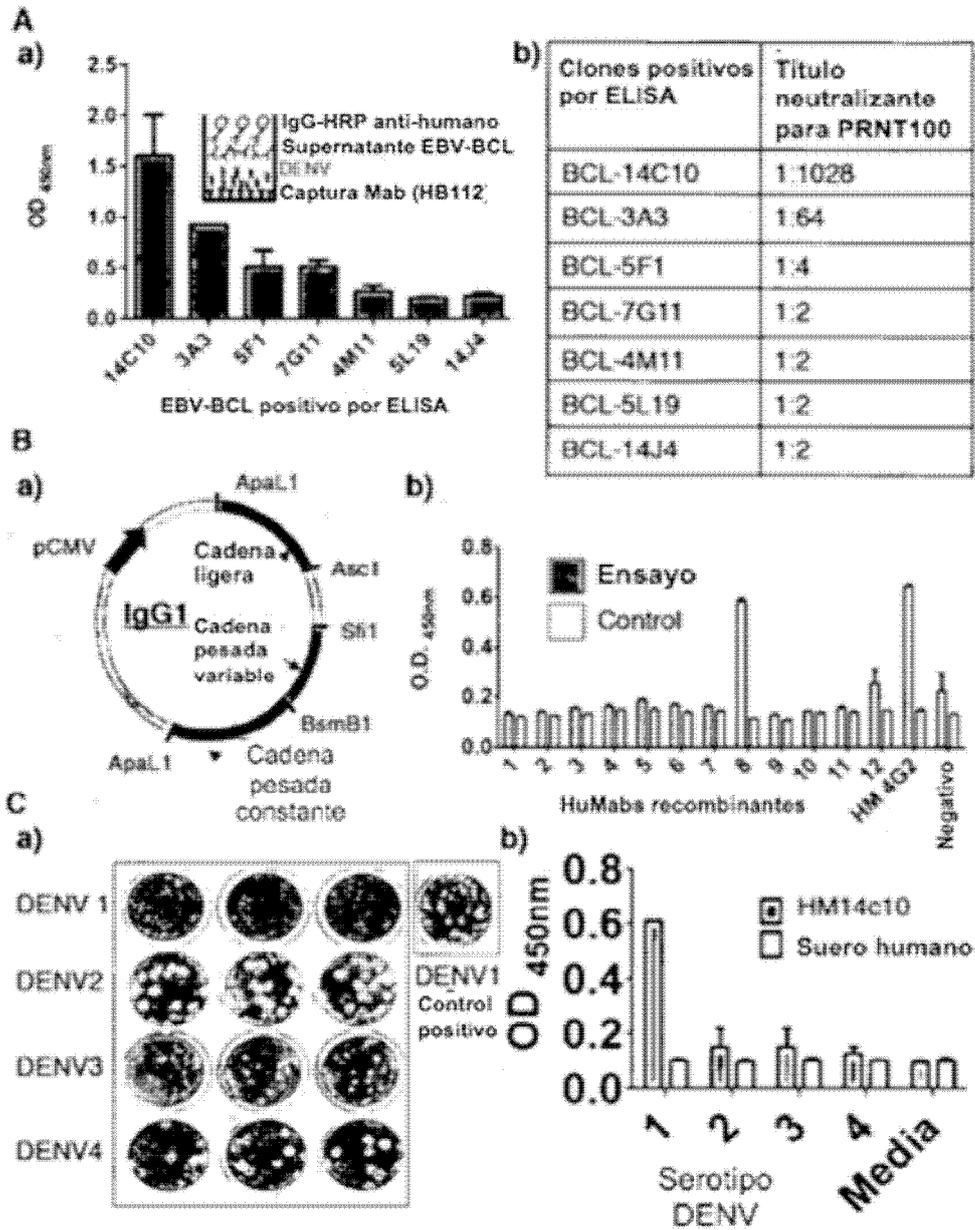


Figura 14

Identificación y expresión recombinante de un anticuerpo completamente humano con actividad neutralizante para virus Dengue

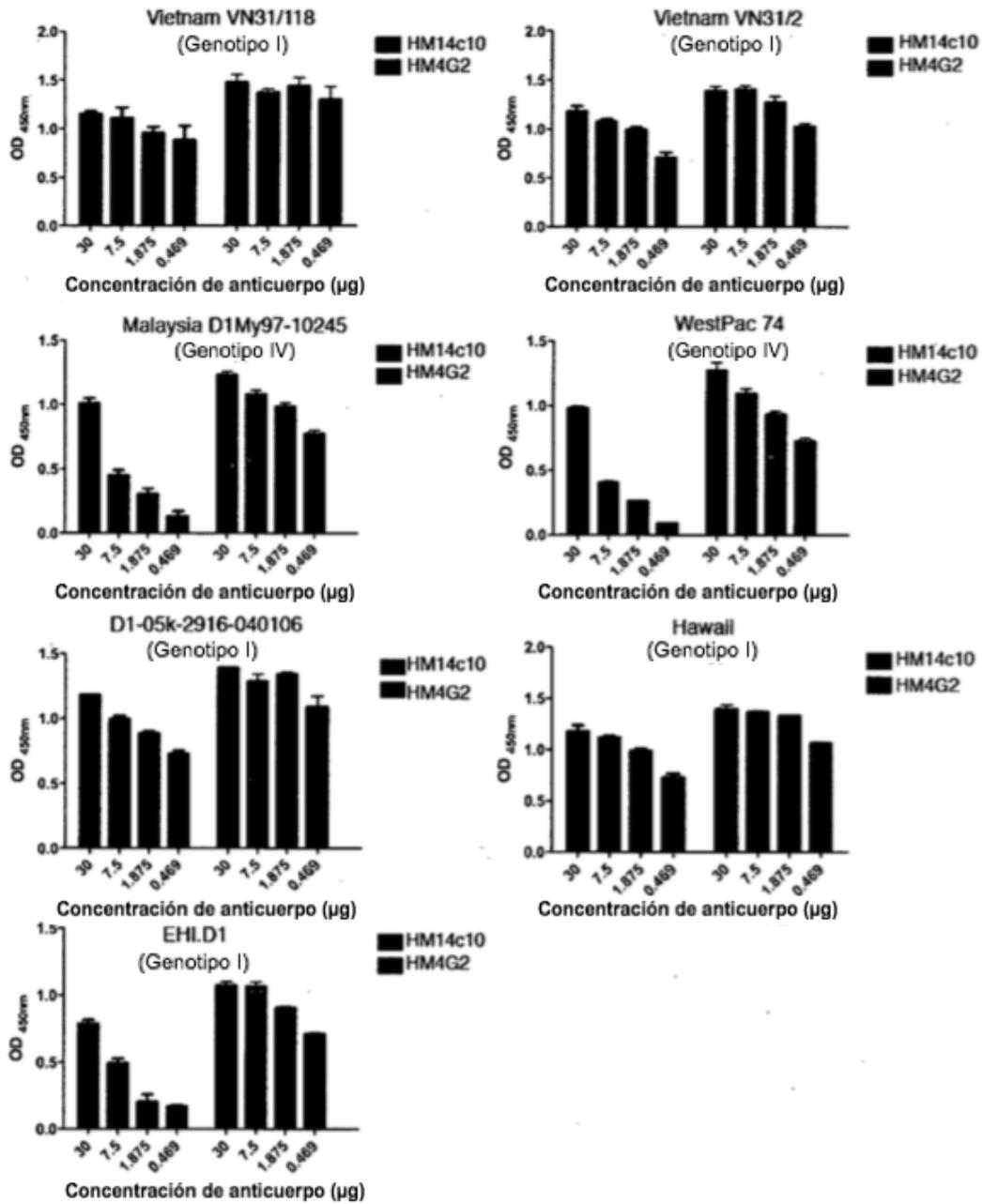


Figura 15

HM14c10 exhibe actividad de unión para aislados clínicos DENV1 múltiples



Figura 16

Ajuste de la estructura cristalina post fusión de proteínas E de DENV1 en el mapa cryoEM de Fab HM14c10 complejo con virus Dengue 1



Figura 17

Estereo-diagrama de Fab HM14c10 y interfaz de unión de proteína E

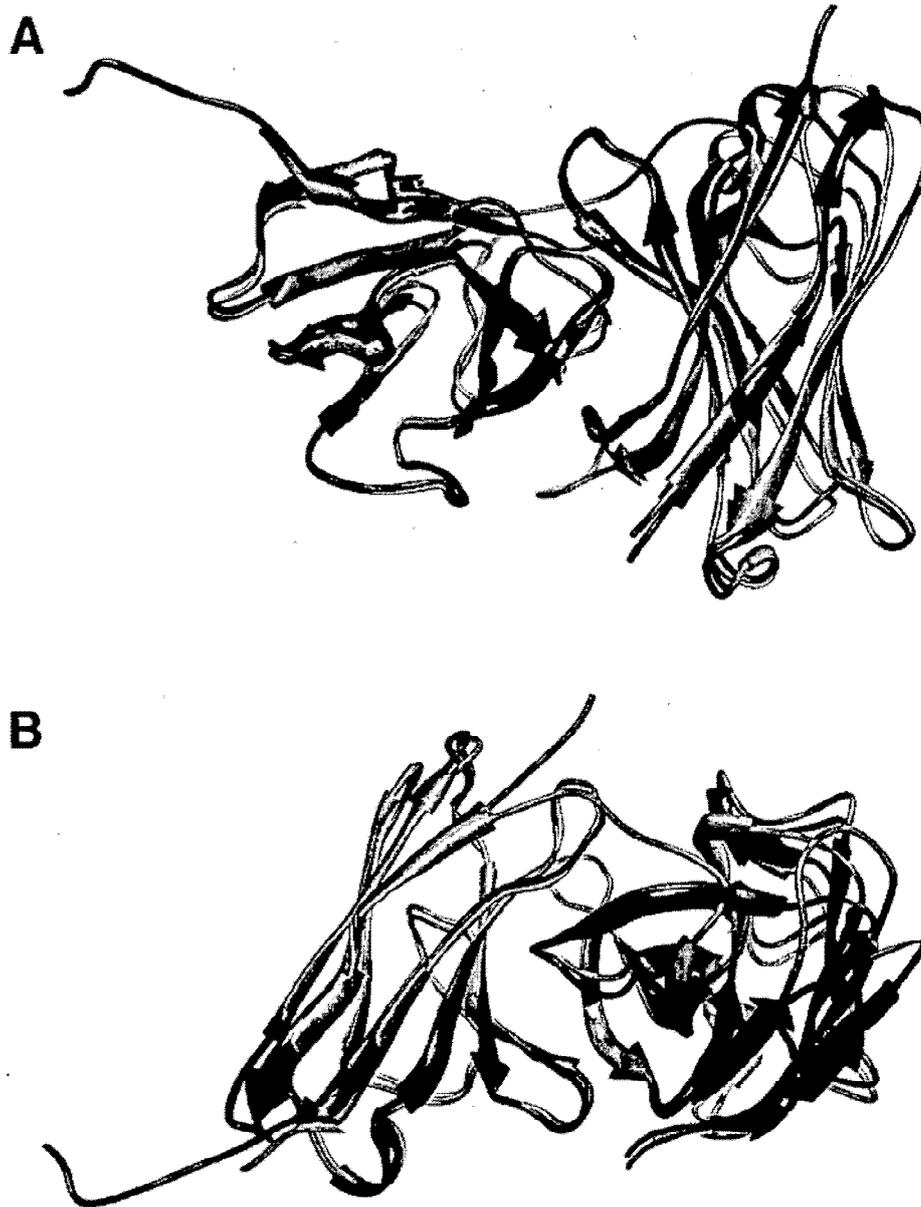


Figura 18

Superposición de las regiones variables de modelo de homología de Hm14c10 (verde) con anticuerpo monoclonal humano de referencia (PDB código 2GHW) (azul). Figura muestra el lado (A) y vista superior (B) de las regiones variables de anticuerpo

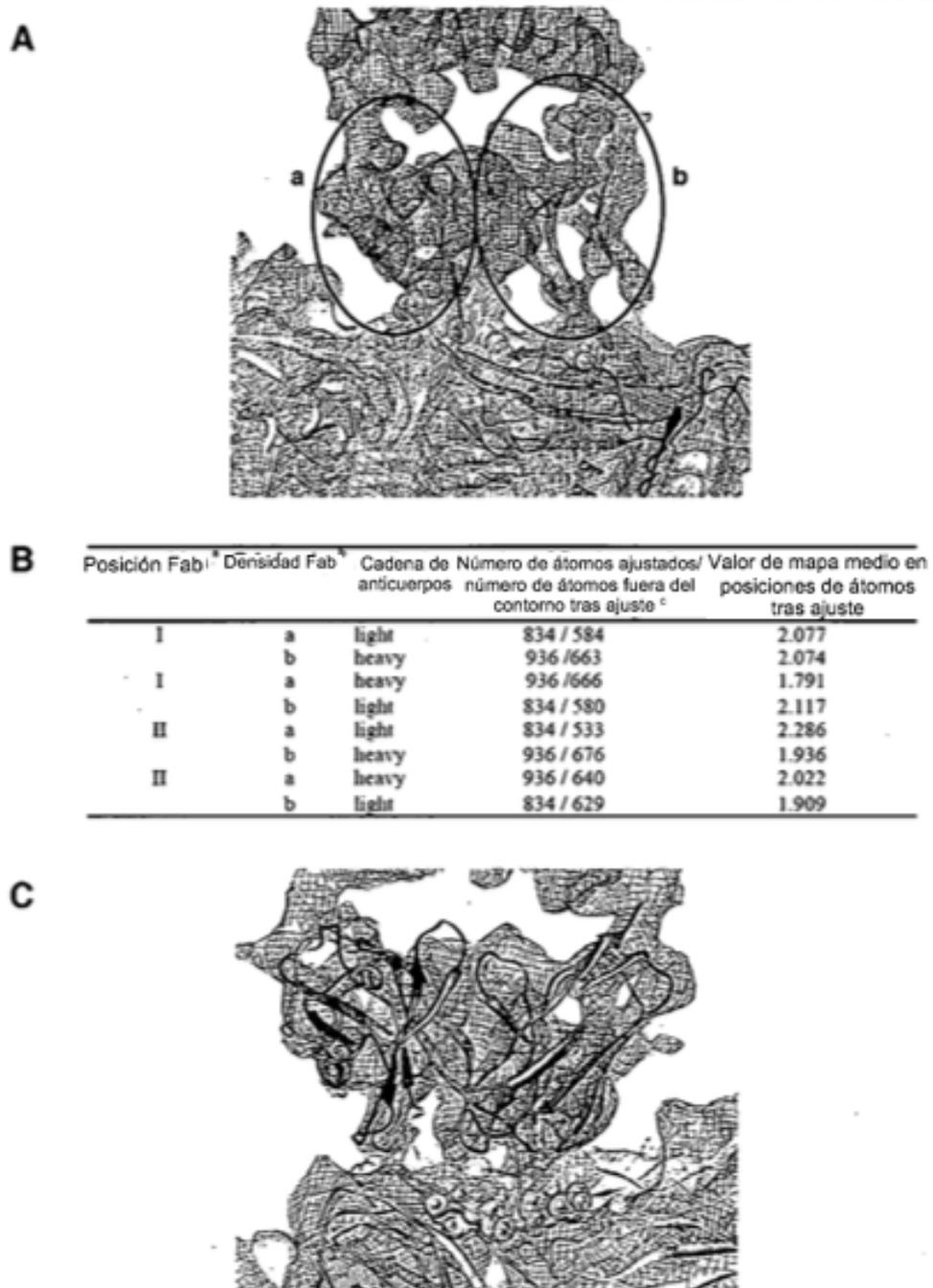


Figura 19

Ajuste del modelo de homología de región variable HM14c10 en el mapa de densidad HM14c10:DENV1 cryoEM

A

DENV1 PVP159 MRCVGI GNRDFVEGLSGATWVDDVLEHGSCVTTMAKDKPTLDEI ELAKTEVTPPAVLRKLCIEAKI GNPTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100
DENV1 Hawaii MRCVGI GNRDFVEGLSGATWVDDVLEHGSCVTTMAKDKPTLDEI ELAKTEVTPPAVLRKLCIEAKI GNPTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100
DENV1 D1My97-10245 MRCVGI GNRDFVEGLSGATWVDDVLEHGSCVTTMAKDKPTLDEI ELAKTEVTPPAVLRKLCIEAKI GNPTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100
DENV1 WestPac 74 MRCVGI GNRDFVEGLSGATWVDDVLEHGSCVTTMAKDKPTLDEI ELAKTEVTPPAVLRKLCIEAKI GNPTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100
DENV1 Ehi D1 MRCVGI GNRDFVEGLSGATWVDDVLEHGSCVTTMAKDKPTLDEI ELAKTEVTPPAVLRKLCIEAKI GNPTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100
DENV1 D1-05k-2916-040106 MRCVGI GNRDFVEGLSGATWVDDVLEHGSCVTTMAKDKPTLDEI ELAKTEVTPPAVLRKLCIEAKI GNPTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100

DENV1 PVP159 WNGCGLFGKGSLLITCAFFKCVTKLEGIIVQYENMAYSVIVTVHTGDQHVGNRETTETHTATITPQAPTSEIQLDITDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 200
DENV1 Hawaii WNGCGLFGKGSLLITCAFFKCVTKLEGIIVQYENMAYSVIVTVHTGDQHVGNRETTETHTATITPQAPTSEIQLDITDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 200
DENV1 D1My97-10245 WNGCGLFGKGSLLITCAFFKCVTKLEGIIVQYENMAYSVIVTVHTGDQHVGNRETTETHTATITPQAPTSEIQLDITDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 200
DENV1 WestPac 74 WNGCGLFGKGSLLITCAFFKCVTKLEGIIVQYENMAYSVIVTVHTGDQHVGNRETTETHTATITPQAPTSEIQLDITDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 200
DENV1 Ehi D1 WNGCGLFGKGSLLITCAFFKCVTKLEGIIVQYENMAYSVIVTVHTGDQHVGNRETTETHTATITPQAPTSEIQLDITDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 200
DENV1 D1-05k-2916-040106 WNGCGLFGKGSLLITCAFFKCVTKLEGIIVQYENMAYSVIVTVHTGDQHVGNRETTETHTATITPQAPTSEIQLDITDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 200

DENV1 PVP159 MKEKSMIVHKQWFLDLPFWTSGASTPQETWNRDLVTFKTAHAKKQEVAVLSSQEGAMHTALGATEIQTSGTTFAGHLKCRIRMDKILTKMSYV 300
DENV1 Hawaii MKEKSMIVHKQWFLDLPFWTSGASTPQETWNRDLVTFKTAHAKKQEVAVLSSQEGAMHTALGATEIQTSGTTFAGHLKCRIRMDKILTKMSYV 300
DENV1 D1My97-10245 MKEKSMIVHKQWFLDLPFWTSGASTPQETWNRDLVTFKTAHAKKQEVAVLSSQEGAMHTALGATEIQTSGTTFAGHLKCRIRMDKILTKMSYV 300
DENV1 WestPac 74 MKEKSMIVHKQWFLDLPFWTSGASTPQETWNRDLVTFKTAHAKKQEVAVLSSQEGAMHTALGATEIQTSGTTFAGHLKCRIRMDKILTKMSYV 300
DENV1 Ehi D1 MKEKSMIVHKQWFLDLPFWTSGASTPQETWNRDLVTFKTAHAKKQEVAVLSSQEGAMHTALGATEIQTSGTTFAGHLKCRIRMDKILTKMSYV 300
DENV1 D1-05k-2916-040106 MKEKSMIVHKQWFLDLPFWTSGASTPQETWNRDLVTFKTAHAKKQEVAVLSSQEGAMHTALGATEIQTSGTTFAGHLKCRIRMDKILTKMSYV 300

DENV1 PVP159 NCTGSPFLREVAETQHGTVLVQVYEGEDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLLITANFIVTDREKPNIEAEPPFGESYIVVGGAGLALKLSWFKKGS 396
DENV1 Hawaii NCTGSPFLREVAETQHGTVLVQVYEGEDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLLITANFIVTDREKPNIEAEPPFGESYIVVGGAGLALKLSWFKKGS 396
DENV1 D1My97-10245 NCTGSPFLREVAETQHGTVLVQVYEGEDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLLITANFIVTDREKPNIEAEPPFGESYIVVGGAGLALKLSWFKKGS 396
DENV1 WestPac 74 NCTGSPFLREVAETQHGTVLVQVYEGEDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLLITANFIVTDREKPNIEAEPPFGESYIVVGGAGLALKLSWFKKGS 396
DENV1 Ehi D1 NCTGSPFLREVAETQHGTVLVQVYEGEDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLLITANFIVTDREKPNIEAEPPFGESYIVVGGAGLALKLSWFKKGS 396
DENV1 D1-05k-2916-040106 NCTGSPFLREVAETQHGTVLVQVYEGEDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLLITANFIVTDREKPNIEAEPPFGESYIVVGGAGLALKLSWFKKGS 396

B

DENV1 Hawaii MRCVGI GNRDFVEGLSGATWVDDVLEHGSCVTTMAKDKPTLDEI ELAKTEVTPPAVLRKLCIEAKI GNPTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100
DENV1 H87 MRCVGI GNRDFVEGLSGATWVDDVLEHGSCVTTMAKDKPTLDEI ELAKTEVTPPAVLRKLCIEAKI GNPTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100
DENV2 NSC MRCVGI GNRDFVEGLSGATWVDDVLEHGSCVTTMAKDKPTLDEI ELAKTEVTPPAVLRKLCIEAKI GNPTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100
DENV4 H241 MRCVGI GNRDFVEGLSGATWVDDVLEHGSCVTTMAKDKPTLDEI ELAKTEVTPPAVLRKLCIEAKI GNPTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100
WNV NY99 ENCLMSENDFLEGVSGATWVDDVLEHGSCVTTMAKDKPTLDEI ELAKTEVTPPAVLRKLCIEAKI GNPTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100

DENV1 Hawaii WNGCGLFGKGSLLITCAFFKCVTKLEGIIVQYENMAYSVIVTVHTGDQHVGNRETTETHTATITPQAPTSEIQLDITDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 195
DENV3 H87 WNGCGLFGKGSLLITCAFFKCVTKLEGIIVQYENMAYSVIVTVHTGDQHVGNRETTETHTATITPQAPTSEIQLDITDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 193
DENV2 NSC WNGCGLFGKGSLLITCAFFKCVTKLEGIIVQYENMAYSVIVTVHTGDQHVGNRETTETHTATITPQAPTSEIQLDITDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 195
DENV4 H241 WNGCGLFGKGSLLITCAFFKCVTKLEGIIVQYENMAYSVIVTVHTGDQHVGNRETTETHTATITPQAPTSEIQLDITDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 195
WNV NY99 WNGCGLFGKGSLLITCAFFKCVTKLEGIIVQYENMAYSVIVTVHTGDQHVGNRETTETHTATITPQAPTSEIQLDITDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 200

DENV1 Hawaii MLLITMKNKAWLVHRQWFLDLPFWTSGASTPQETWNRDLVTFKTAHAKKQEVAVLSSQEGAMHTALGATEIQTSGTTFAGHLKCRIRMDKILTKMSYV 294
DENV3 H87 MLLITMKNKAWLVHRQWFLDLPFWTSGASTPQETWNRDLVTFKTAHAKKQEVAVLSSQEGAMHTALGATEIQTSGTTFAGHLKCRIRMDKILTKMSYV 292
DENV2 NSC MLLITMKNKAWLVHRQWFLDLPFWTSGASTPQETWNRDLVTFKTAHAKKQEVAVLSSQEGAMHTALGATEIQTSGTTFAGHLKCRIRMDKILTKMSYV 294
DENV4 H241 MLLITMKNKAWLVHRQWFLDLPFWTSGASTPQETWNRDLVTFKTAHAKKQEVAVLSSQEGAMHTALGATEIQTSGTTFAGHLKCRIRMDKILTKMSYV 294
WNV NY99 YVMTIVGTSTFLVHRQWFLDLPFWTSGASTPQETWNRDLVTFKTAHAKKQEVAVLSSQEGAMHTALGATEIQTSGTTFAGHLKCRIRMDKILTKMSYV 297

DENV1 Hawaii KGNYSVMCTGSPFLREVAETQHGTVLVQVYEGEDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLLITANFIVTDREKPNIEAEPPFGESYIVVGGAGLALKLSWFKKGS 394
DENV3 H87 KGNYSVMCTGSPFLREVAETQHGTVLVQVYEGEDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLLITANFIVTDREKPNIEAEPPFGESYIVVGGAGLALKLSWFKKGS 394
DENV2 NSC KGNYSVMCTGSPFLREVAETQHGTVLVQVYEGEDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLLITANFIVTDREKPNIEAEPPFGESYIVVGGAGLALKLSWFKKGS 396
DENV4 H241 KGNYSVMCTGSPFLREVAETQHGTVLVQVYEGEDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLLITANFIVTDREKPNIEAEPPFGESYIVVGGAGLALKLSWFKKGS 396
WNV NY99 KGTPTVVCCKAFKFLGATADTQHGTVLVQVYEGEDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLLITANFIVTDREKPNIEAEPPFGESYIVVGGAGLALKLSWFKKGS 402

Figura 20

Epítipo de HM14c10 en el serotipo dengue 1 (genotipo PVP159) y la comparación del epítipo con (A) otros genotipos de DENV1 y (B) serotipos dengue y virus del Nilo Occidental (WNV)

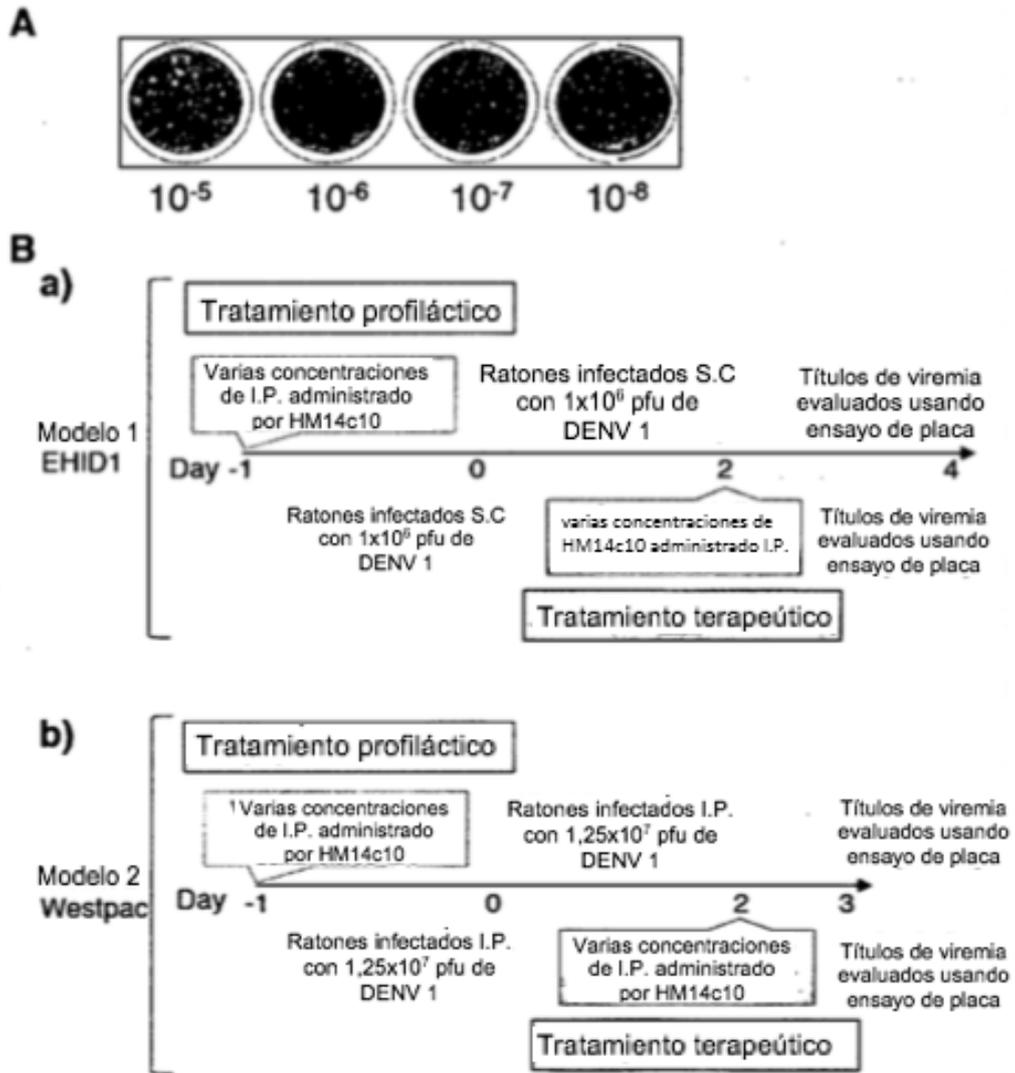


Figura 21

Infectividad y eficacia *in vivo* de DENV1 etiquetado.

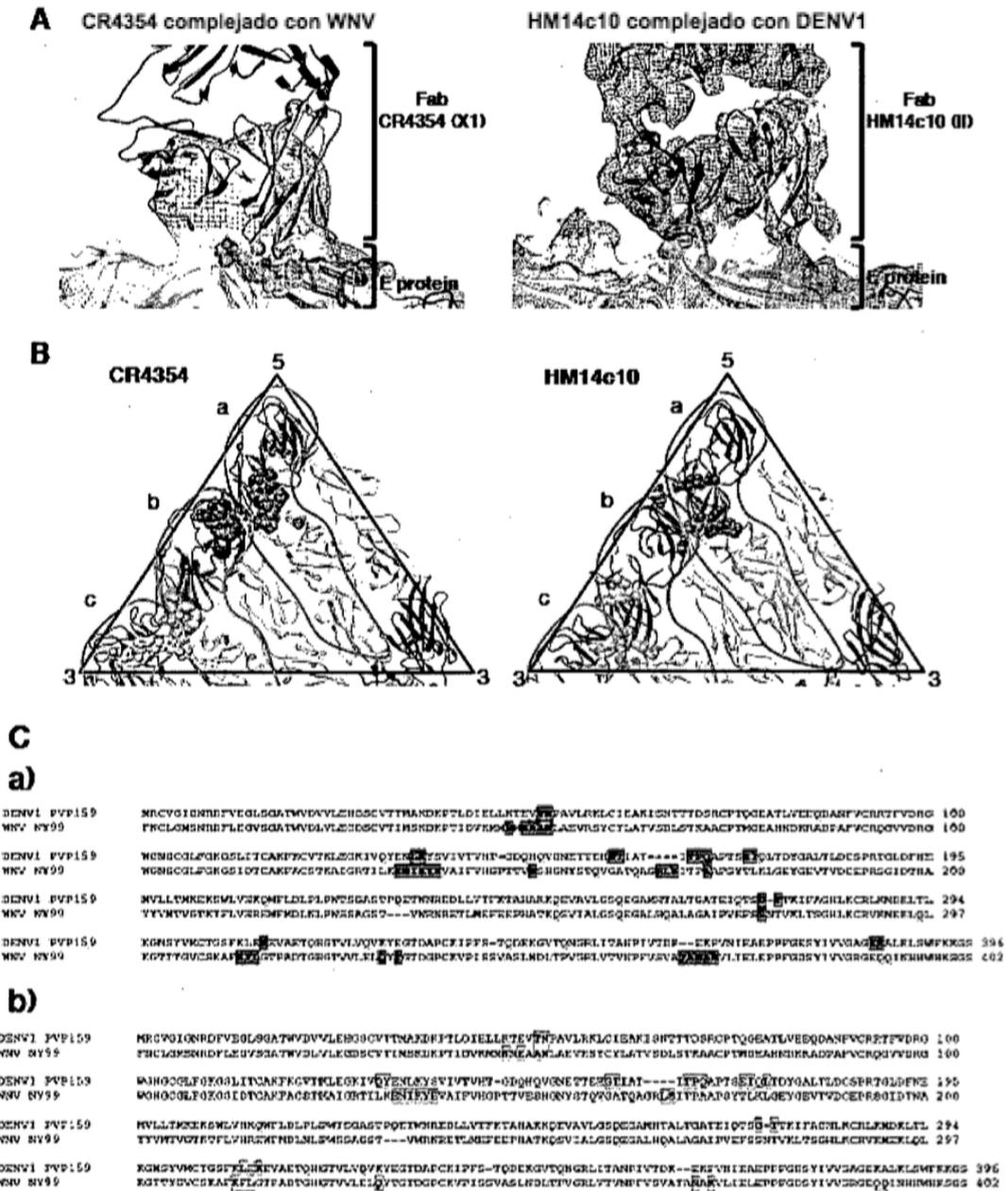


Figura 22

Comparación de epítipo unido por virus de Nilo Occidental CR4354 y HM14c10 específico a dengue 1