

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 470**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

C07K 14/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013 PCT/IB2013/000627**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13140247**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013 E 13724357 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2828293**

54 Título: **Anticuerpos que neutralizan RSV, MPV y PVM y usos de los mismos**

30 Prioridad:

20.03.2012 US 201261613197 P
04.06.2012 US 201261655310 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2018

73 Titular/es:

HUMABS BIOMED S.A. (100.0%)
Via Mirasole 1
6500 Bellinzona, CH

72 Inventor/es:

CORTI, DAVIDE

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 657 470 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que neutralizan RSV, MPV y PVM y usos de los mismos

ANTECEDENTES

- 5 El virus respiratorio sincitial (RSV), el metapneumovirus (MPV) y el virus de la neumonía del ratón (PVM) son virus del resfriado común pertenecientes a la familia de *paramyxovirus* que comparten población diana y representan un grave problema sanitario en recién nacidos y pacientes inmunocomprometidos.

10 El RSV es la causa principal de enfermedad aguda del tracto respiratorio en niños y adultos en todo el mundo. Entre un 0,5% y un 3,2% de los niños infectados por RSV requieren hospitalización (Thompson, W. W. et al., 2003, JAMA: The Journal of the American Medical Association 289: 179-186) y del 5% al 10% de los niños tienen infección grave prolongada, un factor considerado predisponente a sibilancia y síntomas de tipo asmático en la infancia posterior. La inmunidad al RSV parece ser de corta duración, por lo que las reinfecciones son frecuentes (Ogra, 2003, Paediatric Respiratory Reviews 5 Supl A: S119-126).

15 El MPV humano fue aislado por vez primera en 2001 y ahora se admite que es la segunda causa principal de enfermedad aguda del tracto respiratorio en niños y adultos; se estima que infecta a más del 50% de los niños de menos dos años de edad y a casi todos los niños de menos de cinco años. El MPV es la causa de aproximadamente el 5 al 15% de las enfermedades respiratorias en niños pequeños hospitalizados (Alto, 2004, The Journal of the American Board of Family Practice / American Board of Family Practice 17: 466-469; Williams et al., 2004, N Engl J Med 350: 443-450). La infección por MPV es una importante carga de morbilidad en bebés prematuros en situación de riesgo, enfermedad pulmonar crónica de prematuridad, insuficiencia cardíaca congestiva e inmunodeficiencia (Martino et al., 2005, Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation 11: 781-796).

20 Las coinfecciones con MPV y RSV pueden ser comunes dada su prevalencia y la coincidencia parcial de sus brotes epidémicos invernales. Aunque no está claro si se puede producir una patología sinérgica entre estos dos virus, en algunos niños coinfectados por MPV y RSV se han observado exacerbaciones que han conducido a una enfermedad del tracto respiratorio particularmente grave (Greensill, 2003, Emerging Infectious Diseases 9: 372).

25 El RSV, que pertenece al género *Pneumovirus* de la subfamilia Pneumovirinae, y el MPV, que pertenece al género *Metapneumovirus* de la subfamilia Pneumovirinae, tienen algunas similitudes en su estructura genética, aunque el MPV carece de los genes no estructurales NS1 y NS2 hallados en el RSV. Las envolturas del RSV y el MPV contienen tres glicoproteínas de superficie transmembrana codificados por virus: la proteína de unión principal G, la proteína de fusión F y la proteína hidrófoba pequeña SH. Aunque las envolturas del RSV y el MPV contienen proteínas que son funcionalmente similares, es importante señalar, no obstante, que las proteínas F del RSV y del MPV solo comparten un 33% de identidad de secuencia de aminoácidos. Además, los antisueros generados contra el RSV o el MPV no producen una neutralización cruzada de ambos virus (Wyde et al., 2003, Antiviral Research 60: 51-59) y hasta ahora no se ha aislado ningún anticuerpo monoclonal que sea capaz de una neutralización cruzada tanto del RSV como del MPV.

30 Las glicoproteínas F del RSV y del MPV dirigen la penetración viral mediante fusión entre la envoltura del virión y la membrana plasmática de la célula huésped. Posteriormente en la infección, la proteína F expresada sobre la superficie celular puede mediar la fusión con células cercanas para formar sincitios (Collins et al., 1984 PNAS 81: 7683-7687). En ambos casos, el extremo N de la subunidad F que se crea mediante escisión proteolítica y que contiene una extensión hidrófoba de aminoácidos, denominada péptido de fusión, se inserta directamente en la membrana diana para iniciar la fusión. Después de la unión con la célula diana y la activación subsiguiente, la proteína F prefusión metaestable experimenta una serie de reordenaciones estructurales que resultan en la inserción del péptido de fusión en la membrana de la célula diana, seguida por la formación de un haz helicoidal estable que se forma cuando las membranas virales y celulares se yuxtaponen. Estos cambios estructurales conducen a la formación de una proteína F postfusión estable.

35 Actualmente no hay disponible ninguna vacuna para la infección por el RSV o por el MPV. Se comprobó que una vacuna contra el RSV con adyuvante de alumbre e inactivada con formalina (FI-RSV) ensayada en la década de 1960 predisponía a los niños a un aumento de la enfermedad después de una infección por RSV natural que conducía a fiebre alta y neumonía grave, resultando en altas tasas de hospitalización e incluso en algunos fallecimientos (Fulginiti et al., 1969, American Journal of Epidemiology 89: 435-448; Kapikian et al., 1969, American Journal of Epidemiology 89: 405-421; Kim et al., 1969, American Journal of Epidemiology 89: 422-434). De modo similar, algunas vacunas contra el MPV inactivadas con formalina mostraron un aumento de la enfermedad mediado por el sistema inmune en macacos cangrejeros jóvenes (de Swart et al., 2007,

Vaccine 25: 8518-8528). Además, ciertas terapias antivirales tales como la ribavirina no han demostrado ser eficaces en caso de infección por el RSV o el MPV.

5 De estudios epidemiológicos y con animales han surgido pruebas del papel desempeñado por los anticuerpos séricos en la protección contra el virus RSV. En los niños, los títulos de anticuerpos transmitidos por la madre están en correlación con la resistencia a enfermedad grave (Glezen et al., 1981, The Journal of Pediatrics 98: 708-715) y la incidencia y gravedad en adultos de la implicación del tracto respiratorio inferior disminuye en presencia de altos niveles de anticuerpos séricos neutralizadores del RSV (McIntosh et al., 1978, The Journal of Infectious Diseases 138: 24-32). Existe un anticuerpo monoclonal, el palivizumab (Synagis), registrado para la prevención de la infección por el RSV en recién nacidos prematuros. Sin embargo, el palivizumab no siempre es eficaz para prevenir la infección por RSV y no es terapéuticamente eficaz. Además, en animales, después de una replicación pulmonar prolongada del RSV en presencia de palivizumab aparecen cepas víricas resistentes (Zhao y Sullender, 2005, Journal of Virology 79: 3962-3968). Actualmente no existen anticuerpos monoclonales para el tratamiento o la prevención de la infección por el MPV.

15 La falta de un modelo animal que funcione bien para las formas más graves de infección por RSV está relacionada con el hecho de que el RSV y el MPV son patógenos *Pneumovirus* restringidos al huésped. El desarrollo de nuevos fármacos para la terapia de infecciones por RSV y MPV se ha visto entorpecida por la falta de un modelo animal capaz de reunir todos los síntomas y la gravedad de la enfermedad humana. De hecho, el RSV y el MPV no son patógenos naturales de los ratones y solo inducen una infección primaria limitada, mínimamente sintomática y rápidamente anulada en respuesta a un inóculo masivo no fisiológico del virus. El virus de la neumonía del ratón (PVM) es un patógeno *Pneumovirus* natural de roedores que pertenece a la misma familia, subfamilia y género (*Pneumovirus*) que el RSV humano y bovino. La proteína F del PVM solo comparte un 40% de identidad de aminoácidos con la proteína F del RSV humano, pero tiene la misma organización genética excepto en el solapamiento M2-L, que está presente en el RSV pero no lo está en el PVM. La infección por el patógeno natural de ratones PVM reproduce muchos de los signos y síntomas de las formas más graves del RSV en niños. La infección por el PVM se caracteriza por una rápida replicación del virus acompañada por una respuesta inflamatoria masiva que conduce a insuficiencia respiratoria y muerte (Rosemberg y Domachowski, 2008, Immunology Letter 118: 6-12). Por tanto, la infección por el PVM en ratones es considerada como el modelo animal más relevante de infecciones graves por el RSV y el MPV en humanos.

30 La WO 2010/149743 A2 describe un "antígeno preF" recombinante, habiendo sido modificado el polipéptido F0 para estabilizar la conformación de prefusión de la proteína F. De este modo, los epítopos inmunógenos predominantes de la proteína F se conservan, dado que son presentados por el virus RSV antes de unirse a las células huésped y fusionarse con las mismas.

35 Magro et al., 2012, PNAS, 109: 8, p. 3089-3094, describen anticuerpos policlonales específicos de la forma prefusión de la proteína F del RSV que generan la mayor parte de la actividad neutralizadora de un suero de conejo producido contra un vaccinia virus recombinante que expresa hRSV_F, o de una preparación de Ig humana (Respigam). Además, Magro et al., 2012 describe una proteína F del RSV recombinante en la conformación prefusión.

40 La WO 2004/092207 A2 da a conocer péptidos adecuados para inducir una respuesta inmune frente al RSV. Dichos péptidos se unen a moléculas MHC de clase I e inducen linfocitos T citotóxicos.

La US 2006/0228367 A1 da a conocer anticuerpos monoclonales que se unen a la proteína F del MPV y neutralizan el MPV y anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con proteína F del MPV y proteína F del RSV.

45 Ling y Pringle, 1989, J. gen. Virol. 70: 1427-1440, describen un antisuero policlonal múrido y anticuerpos monoclonales que se emplearon para identificar polipéptidos del PVM en células infectadas y para estudiar modificaciones postraduccionales.

50 La falta de un tratamiento preventivo para la infección por MPV y de vacunas contra infecciones por RSV y MPV, así como la ineficacia terapéutica del palivizumab ponen de relieve la necesidad de nuevos agentes preventivos y terapéuticos contra estos importantes patógenos humanos. Dada la gran prevalencia y la posibilidad de coinfección, sería muy deseable disponer de un agente simple que sea capaz de prevenir y tratar o atenuar tanto la infección por RSV como la infección por MPV, y disponer de un modelo animal en el que ensayar dicho agente. Por tanto, existe una necesidad de anticuerpos neutralizadores ampliamente reactivos en reacciones cruzadas que protejan contra una amplia gama de *paramyxovirus*, por ejemplo al menos RSV y MPV, y preferiblemente RSV, MPV y PVM.

55

SUMARIO

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de anticuerpos ampliamente neutralizadores que neutralizan la infección por RSV, MPV y PVM y de polipéptidos a los que se unen los anticuerpos de la invención. Por consiguiente, en un aspecto de la invención, ésta comprende un anticuerpo monoclonal, por ejemplo un anticuerpo humano o un fragmento de unión de antígeno, que neutraliza de forma cruzada la infección por RSV, MPV y PVM, uniéndose el anticuerpo o el fragmento de unión de antígeno a una región conservada en la parte amino terminal de la proteína F del RSV, MPV o PVM que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID N°: 64-69.

En una realización de la invención, la invención comprende un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, que se une específicamente a proteína F prefusión del RSV y no a proteína F postfusión del RSV. En otra realización, la invención comprende un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína F prefusión y no a la proteína F postfusión del RSV y del MPV. En otra realización más, la invención comprende un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína F prefusión y no a la proteína F postfusión de RSV, MPV y PVM.

En otra realización de la invención, ésta comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, que comprende al menos una secuencia de región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID N°: 1-6, 19-23, 35, 39-42 o 53-54, neutralizando el anticuerpo la infección por RSV, MPV y PVM.

En otra realización de la invención, ésta comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, que incluye una cadena pesada CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 o SEQ ID N°: 19; una cadena pesada CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 20 o SEQ ID N°: 39; y una cadena pesada CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 40 o SEQ ID N°: 53, neutralizando el anticuerpo la infección por RSV, MPV y PVM. En otra realización de la invención, ésta comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, que incluye una cadena ligera CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 4; una cadena ligera CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 22 o SEQ ID N°: 41; y una cadena ligera CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 35, SEQ ID N°: 42 o SEQ ID N°: 54, neutralizando el anticuerpo la infección por RSV, MPV y PVM.

En otra realización de la invención, la invención comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, comprendiendo el anticuerpo: (i) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2 y SEQ ID N°: 3, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 y SEQ ID N°: 35, respectivamente; (ii) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2 y SEQ ID N°: 3, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 y SEQ ID N°: 6, respectivamente; (iii) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 39 y SEQ ID N°: 40, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 41 y SEQ ID N°: 42, respectivamente; (iv) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 39 y SEQ ID N°: 40, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 y SEQ ID N°: 6, respectivamente; (v) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2 y SEQ ID N°: 3, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 41 y SEQ ID N°: 42, respectivamente, y neutralizando el anticuerpo la infección por RSV, MPV y PVM.

En otra realización más de la invención, la invención comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, comprendiendo el anticuerpo: (i) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20 y SEQ ID N°: 21, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 22 y SEQ ID N°: 23, respectivamente; (ii) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 39 y SEQ ID N°: 53, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 41 y SEQ ID N°: 54, respectivamente; (iii) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 39 y SEQ ID N°: 53, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 22 y SEQ ID N°: 23, respectivamente; o (iv) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20 y SEQ ID N°: 21, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en las SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 41 y SEQ ID N°: 54, respectivamente, y neutralizando el anticuerpo la infección por RSV, MPV y PVM.

En otra realización más de la invención, la invención comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, comprendiendo el anticuerpo una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 17 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 37; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 14; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 17 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 14; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 49 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 50; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 49 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 14; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 17 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 50, y neutralizando el anticuerpo la infección por RSV, MPV y PVM.

En otra realización más de la invención, la invención comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, comprendiendo el anticuerpo una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 29 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 30; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 33 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 30; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 59 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 60; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 59 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 30; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 33 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 60, y neutralizando el anticuerpo la infección por RSV, MPV y PVM.

La invención comprende además un anticuerpo, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, descrito aquí como HMB3210 (o 3210) o HMB2430 (o 2430). En otra realización, la invención comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, que neutraliza la infección por RSV, MPV y PVM, siendo expresado el anticuerpo o fragmento del mismo por un clon de célula B inmortalizada que produce HMB3210 o HMB2430.

En otro aspecto, la invención comprende una molécula de ácido nucleico que incluye un polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención. En otro aspecto más, la invención comprende un vector que incluye la molécula de ácido nucleico de la invención. La invención también comprende una célula que expresa el anticuerpo de la invención o un fragmento de unión de antígeno del mismo.

La invención comprende además una composición farmacéutica que incluye el anticuerpo de la invención o un fragmento de unión de antígeno del mismo, la molécula de ácido nucleico de la invención, el vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención o la célula que expresa un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención, y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención también comprende una composición farmacéutica que incluye un primer anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno del mismo y un segundo anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno del mismo, siendo el primer anticuerpo el anticuerpo de la invención y siendo el segundo anticuerpo un anticuerpo, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, que neutraliza la infección por RSV o MPV, o tanto por RSV como por MPV, o por los tres RSV, MPV y PVM.

Dentro del alcance de la invención también se contempla el uso del anticuerpo de la invención o de un fragmento de unión de antígeno del mismo, del ácido nucleico de la invención, del vector que comprende un ácido nucleico de la invención, de la célula que expresa un vector de la invención o de la composición farmacéutica de la invención (i) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la atenuación de la coinfección por RSV o MPV, o tanto por RSV como por MPV, (ii) en una vacuna, o (iii) en el diagnóstico de infección por virus RSV y/o MPV. Además, dentro del alcance de la invención también se contempla el uso del anticuerpo de la invención o de un fragmento de unión de antígeno del mismo para controlar la calidad de una vacuna contra el RSV o el MPV, o tanto contra el RSV como contra el MPV, comprobando que el antígeno de dicha vacuna contiene el epítipo específico en la conformación correcta.

En otro aspecto, la invención comprende el anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno del anticuerpo de la invención para su uso en un método para tratar o atenuar la infección por RSV y MPV, que comprende la administración a un individuo que lo requiera de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o de un fragmento de unión de antígeno del anticuerpo de la invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1: muestra los resultados del rastreo de anticuerpos monoclonales producidos mediante células B de memoria inmortalizadas por el EBV de 7 donantes (Don. 1 a 7) en cuanto a su capacidad para neutralizar la infección por virus RSV o MPV *in vitro*.
- 5 Figura 2: muestra los resultados de la neutralización del RSV y del MPV mediante anticuerpos monoclonales HMB2430, HMB3210, mAb 234 y palivizumab.
- Figura 3: muestra la unión con proteína F del RSV o de toxina tetánica mediante anticuerpos monoclonales motavizumab, mAb 234, HMB2430 y HMB3210, medida mediante ELISA.
- Figura 4: muestra la unión de anticuerpos monoclonales marcados con células Hep-2 infectadas por el RSV en presencia de un gran exceso de los anticuerpos no marcados indicados.
- 10 Figura 5: muestra la unión de anticuerpos monoclonales HMB2430, HMB3210, mAb 234 y motavizumab con proteína F del RSV procedente de lisados de células Hep-2 infectadas con RSV bajo condiciones reductoras o no reductoras, medida mediante análisis Western blot.
- Figura 6: muestra la unión de anticuerpos monoclonales HMB3210 y mAb 234 con proteína F de MPV procedente de lisados de células LLC-MK2 infectadas con MPV bajo condiciones reductoras o no reductoras, medida mediante análisis Western blot.
- 15 Figura 7: muestra los resultados de neutralización de la cepa Long de RSV y la cepa clínica PZ-MARM6 mediante anticuerpos monoclonales HMB2430, HMB3210, mAb 234 y palivizumab.
- Figura 8: muestra los resultados del análisis de HMB3210v2 en un gel SDS-PAGE reductor después de incubación en presencia (+) o ausencia (-) de N-glicosidasa PNG-asa F. El recuadro negro resalta la fracción menor de la cadena ligera HMB3210 que está glicosilada.
- 20 Figura 9: muestra los resultados de neutralización del MPV I-PV 03/01-6621 y del RSV A2 mediante los anticuerpos monoclonales HMB3210v2 y HMB3210v3.
- Figura 10: muestra los resultados de neutralización de una serie de cepas de MPV y RSV mediante los anticuerpos monoclonales HMB3210v2 y HMB3210v3.
- 25 Figura 11: muestra los resultados de neutralización del MPV I-PV 03/01-6621 y del RSV A2 mediante variantes de línea germinal de anticuerpo monoclonal HMB3210 y HMB2430.
- Figura 12: muestra los resultados del análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de la proteína recombinante F postfusión del RSV coincubada o no con HMB3210 o palivizumab.
- 30 Figura 13: muestra los resultados del análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de la proteína recombinante F prefusión del RSV coincubada o no con HMB3210 o palivizumab.
- Figura 14: muestra la unión de HMB3210v3 o palivizumab (PVZ) con las proteínas F prefusión y postfusión del RSV, medida mediante resonancia en plasmón de superficie (SPR).
- Figura 15: muestra la neutralización vírica y la inhibición de la propagación viral mediante anticuerpos monoclonales humanos HMB3210v3 y D25.
- 35 Figura 16: muestra la eficacia profiláctica de HMB3210v3 y palivizumab en la infección por RSV o MPV.
- Figura 17: muestra la eficacia terapéutica de HMB3210 en ratones con deficiencia de STAT1 infectados por RSV.
- Figura 18: muestra la eficacia profiláctica y terapéutica de HMB3210 en ratones infectados con una dosis letal de PVM.
- 40 Figura 19: muestra el bloqueo de los títulos virales pulmonares en ratones tratados con HMB3210v3 el día 3, 4 o 5 después de infección letal con PVM.
- Figura 20: muestra la eficacia profiláctica y terapéutica de variantes de HMB3210v3 que portan la Fc de tipo silvestre o la mutación LALA en ratones infectados con una dosis letal de PVM.
- 45 Figura 21: muestra una alineación que pone de relieve la alta conservación del péptido YLSALR reconocido por HMB3210 en secuencias de RSV, BRSV, PVM y MPV en comparación con el virus de la parainfluenza 5 (PIV5).
- Figura 22: modelo de la proteína F prefusión del RSV que muestra la localización del péptido YLSALR y del sitio de palivizumab (PVZ) cercano, y diagramas de barras que ponen de relieve la reordenación de los sitios de PVZ y HMB3210v3 en la conformación prefusión y postfusión de la proteína F del RSV.
- 50 Figura 23: muestra el alto grado de conservación del epítipo de núcleo HMB3210 en cepas 364 RSV, 162 MPV, 8 BRSV y 5 PVM.
- Figura 24: muestra las secuencias de las diversas variantes de cadena pesada y ligera para HMB3210.
- 55 Figura 25: muestra las secuencias de las diversas variantes de cadena pesada y ligera para HMB2430.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento y aislamiento de anticuerpos que neutralizan de forma cruzada el RSV, el MPV y el PVM, así como epítopos a los que se unen los anticuerpos de la invención. Estos anticuerpos son deseables, ya que solo se requiere un anticuerpo para neutralizar RSV, MPV y PVM. Además, los anticuerpos de neutralización cruzada se producen en altos títulos para reducir los costes de producción de medicamentos que comprenden los anticuerpos para el tratamiento de infecciones por RSV y/o

60

MPV. Además, los epítomos reconocidos por estos anticuerpos pueden formar parte de una vacuna capaz de inducir una amplia protección tanto contra RSV como contra MPV.

5 Aunque los anticuerpos de la invención neutralizan RSV, MPV y PVM, en algunas realizaciones de la invención, por ejemplo las relacionadas con el tratamiento de enfermedades, desarrollo de vacunas, etc., la presente descripción se refiere únicamente a RSV y MPV, ya que estos virus son patógenos humanos, mientras que el PVM es un patógeno del ratón. Tal como se utilizan aquí, las expresiones "tanto RSV como MPV" y "RSV, MPV y PVM" se utilizan indistintamente en función del contexto.

10 Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado y fragmentos de unión de antígeno del mismo que neutralizan RSV, MPV y PVM, uniéndose el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno a una región conservada en la parte amino terminal de la proteína F del RSV, del MPV o del PVM que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID N°: 64-69. En una realización, el RSV es un RSV humano. En otra realización, el RSV es un RSV bovino. Los anticuerpos de la invención neutralizan tanto RSV humano (hRSV) como RSV bovino (bRSV). En otra realización, el MPV es un MPV humano.

15 En una realización, el anticuerpo aislado o un fragmento de unión de antígeno del mismo neutraliza la infección por RSV tanto del grupo A como del grupo B. En otra realización, el anticuerpo aislado o un fragmento de unión de antígeno del mismo neutraliza la infección por MPV tanto del grupo A como del grupo B. En otra realización más, el anticuerpo aislado o un fragmento de unión de antígeno del mismo neutraliza la infección por RSV tanto del grupo A como del grupo B, así como por MPV tanto del grupo A como del grupo B.

20 Tal como se ha descrito más arriba, el RSV, el MPV y el PVM tienen algunas similitudes en su estructura genética. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas G y F se clasifican en los grupos A y B tanto en el RSV como en el MPV; el MPV se divide además en 4 subgrupos: A1, A2, B1 y B2. El PVM no se subdivide en grupos o subgrupos. La proteína F del RSV, del MPV o del PVM es una proteína de superficie transmembrana que tiene un péptido de señal escindido en el extremo N y un anclaje de membrana cerca del extremo C. Las proteínas F del RSV y del MPV se sintetizan como precursores F0 inactivos que se reúnen en homotrímeros y se activan por escisión. La proteína F está formada por tres dominios (DI a DIII), un péptido de fusión (FP) y tres regiones de repetición heptad (HR-A, -B y -C). Las glicoproteínas F del RSV y del MPV dirigen la penetración viral mediante fusión entre la envoltura del virión y la membrana plasmática de la célula huésped. En ambos casos, el extremo N de la subunidad F, que se crea mediante escisión proteolítica y contiene el péptido de fusión, se inserta directamente en la membrana diana para iniciar la fusión. Después de la unión a la célula diana y la activación subsiguiente, la proteína F prefusión metaestable experimenta una serie de reordenaciones estructurales que resultan en la inserción del péptido de fusión en la membrana de la célula diana, seguida por la formación de un haz helicoidal estable que se forma cuando las membranas virales y celulares se yuxtaponen. Estos cambios estructurales conducen a la formación de una proteína F postfusión estable. Posteriormente en la infección, la proteína F expresada sobre la superficie celular de las células infectadas puede mediar la fusión con células no infectadas adyacentes para formar sincitios grandes.

35 Los epítomos para palivizumab y motavizumab han sido mapeados en el sitio antigénico II de la proteína F postfusión del RSV (también denominado sitio A) formado por los residuos 255-275. El MAB 19 y el 101F se orientan al sitio antigénico IV de la proteína F postfusión del RSV (también denominado sitio C) del RSV formado por los residuos 422-438. El MAB19 se ensayó en pruebas clínicas, pero no se logró que demostrara una eficacia significativa (Johnson et al., 1999, *The Journal of Infectious Diseases* 180: 35-40; Meissner et al., 1999, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 1183-1188).

45 Para ser eficaces, los anticuerpos deberían reconocer la proteína F prefusión, que es la conformación relevante para bloquear la entrada del virus, y preferiblemente evitar el reconocimiento de la abundante proteína F postfusión que puede actuar como señuelo, consumiendo así el anticuerpo y reduciendo su eficacia. Hasta ahora no se ha aislado ningún anticuerpo que reconozca la proteína F prefusión del RSV pero no la proteína F postfusión del RSV.

50 En una realización de la invención, el anticuerpo aislado o un fragmento de unión de antígeno del mismo se une específicamente a la proteína F prefusión del RSV y no a la proteína F postfusión del RSV. En otra realización, el anticuerpo aislado o un fragmento de unión de antígeno del mismo se une específicamente a la proteína F prefusión y no a la proteína F postfusión de RSV y MPV. En otra realización, los anticuerpos se unen específicamente a la proteína F prefusión pero no a la proteína F postfusión de RSV, MPV y PVM.

55 La invención proporciona anticuerpos que se unen a la proteína F de RSV, MPV y PVM. A pesar del hecho de que solo existe una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente un 33% y un 40% entre las proteínas F del RSV y MPV o del RSV y PVM, respectivamente, los anticuerpos de la invención reconocen un epítomo compartido presente en las proteínas F de RSV, MPV y PVM. Este epítomo es diferente a todos los

reconocidos por los anticuerpos conocidos hasta la fecha, tales como palivizumab, motavizumab, mAb 101F, etc. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención no se unen al sitio antigénico II (reconocido por el motavizumab y el palivizumab), ni al sitio antigénico IV (reconocido por el mAb 101F), ni al sitio antigénico I (unido por el mAb 131-2A). Los epítomos reconocidos por los anticuerpos de la invención en la proteína F del RSV son también diferentes a los reconocidos por mAb D25, un anticuerpo específico únicamente para RSV. Además, los epítomos reconocidos por los anticuerpos de la invención en la proteína F del MPV son diferentes a los reconocidos por el mAb 234 (que reconoce un epítomo en la proteína F del MPV que corresponde al sitio antigénico II en la proteína F del RSV). En general, los anticuerpos de la invención reconocen un epítomo conformacional. En una realización, el epítomo conformacional está presente únicamente bajo condiciones no reductoras. En otra realización, el epítomo conformacional depende de la presencia de enlaces disulfuro entre residuos aminoácidos en la proteína F.

Tal como se muestra aquí, los anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno de la invención se unen específicamente a diversas cepas diferentes tanto de RSV como de MPV y neutralizan tanto RSV como MPV. Además, los anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno de la invención se unen específicamente al RSV tanto del grupo A como del grupo B, así como al MPV tanto del grupo A como del grupo B, incluyendo todos los subgrupos del MPV correspondientes (es decir, A1, A2, B1 y B2), y los neutralizan de forma cruzada.

El anticuerpo y el fragmento de unión de antígeno de la invención tienen una alta potencia de neutralización. La concentración del anticuerpo de la invención requerida para un 50% de neutralización de RSV, MPV y PVM es, por ejemplo, de aproximadamente 500 ng/ml o inferior. En una realización, la concentración del anticuerpo de la invención requerida para un 50% de neutralización de RSV, MPV y PVM es de aproximadamente 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60 o aproximadamente 50 ng/ml o inferior. Esto significa que, para lograr un 50% de neutralización de RSV, MPV y PVM, solo se requieren bajas concentraciones de anticuerpo. La especificidad y la potencia se pueden medir utilizando ensayos estándar conocidos por los expertos en la técnica.

Los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales y pueden ser anticuerpos humanos, recombinantes o purificados. La invención también proporciona fragmentos de los anticuerpos de la invención que conservan la actividad de unión de antígeno de los anticuerpos. Estos fragmentos incluyen, de forma no exclusiva, anticuerpos de cadena simple, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv. Aunque la especificación, incluyendo las reivindicaciones, se puede referir en algunos lugares explícitamente a fragmento(s) de unión de antígeno, fragmento(s) de anticuerpo, variante(s) y/o derivado(s) de anticuerpos, se entiende que la expresión "anticuerpo" o "anticuerpo de la invención" incluye todas las categorías de anticuerpos, en concreto fragmento(s) de unión de antígeno, fragmento(s) de anticuerpo, variante(s) y/o derivado(s) de anticuerpos.

Se han determinado las secuencias de las cadenas pesadas y cadenas ligeras de diversos anticuerpos de la invención, que comprenden cada una tres CDR en la cadena pesada y tres CDR en la cadena ligera. La posición de los aminoácidos de CDR se define de acuerdo con el sistema de numeración IMGT. Las secuencias de las CDR, cadenas pesadas, cadenas ligeras, así como las secuencias de las moléculas de ácido nucleico que codifican las CDR, cadenas pesadas, cadenas ligeras de los anticuerpos de la invención se dan a conocer en el listado de secuencias. Las CDR de las cadenas pesadas de anticuerpo se denominan CDRH1 (o HCDR1), CDRH2 (o HCDR2) y CDRH3 (o HCDR3), respectivamente. Similarmente, las CDR de las cadenas ligeras de anticuerpo se denominan CDRL1 (o LCDR1), CDRL2 (o LCDR2) y CDRL3 (o LCDR3), respectivamente. La Tabla 1 proporciona los números SEQ ID de las secuencias de aminoácidos de las seis CDR de las cadenas pesadas y ligeras, respectivamente, de los ejemplos de anticuerpos de la invención.

Tabla 1. Números SEQ ID de polipéptidos CDR de anticuerpos que neutralizan RSV, MPV y PVM

	SEQ ID N° para polipéptidos CDR					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
3210 variante 1	1	2	3	4	5	6
3210 variante 2	1	2	3	4	5	6
3210 variante 3	1	2	3	4	5	35
3210 variante 4	1	39	40	4	41	42
3210 variante 5	1	39	40	4	5	6
3210 variante 6	1	2	3	4	41	42
2430 variante 1	19	20	21	4	22	23
2430 variante 2	19	20	21	4	22	23
2430 variante 3	1	39	53	4	41	54
2430 variante 4	1	39	53	4	22	23
2430 variante 5	19	20	21	4	41	54

En una realización, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención comprende al menos un CDR con una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95% con una cualquiera de las SEQ

ID N°: 1-6, 19-23, 35, 39-42, o 53-54. Las CDR de las variantes del anticuerpo 3210 y el anticuerpo 2430 se proporcionan en las Figuras 24 y 25, respectivamente (las CDR están destacadas en negrita).

5 En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno que comprende una cadena pesada que incluye una o más (es decir, una, dos o las tres) CDR de cadena pesada de 3210 variante 1, 3210 variante 2, 3210 variante 3, 3210 variante 4, 3210 variante 5, 3210 variante 6, 2430 variante 1, 2430 variante 2, 2430 variante 3, 2430 variante 4 o 2430 variante 5.

10 En otra realización más, el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de la invención comprende una CDR1 de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 o SEQ ID N°: 19; una CDR2 de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 20 o SEQ ID N°: 39; y una CDR3 de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 40 o SEQ ID N°: 53. En determinadas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo tal como se proporciona aquí comprende una cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de (i) SEQ ID N°: 1 para CDRH1, SEQ ID N°: 2 para CDRH2 y SEQ ID N°: 3 para CDRH3, (ii) SEQ ID N°: 1 para CDRH1, SEQ ID N°: 39 para CDRH2 y SEQ ID N°: 40 para CDRH3, (iii) SEQ ID N°: 19 para CDRH1, SEQ ID N°: 20 para CDRH2 y SEQ ID N°: 21 para CDRH3, o (iv) SEQ ID N°: 1 para CDRH1, SEQ ID N°: 39 para CDRH2 y SEQ ID N°: 53 para CDRH3.

20 También se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno que comprende una cadena ligera que incluye una o más (es decir, una, dos o las tres) CDR de cadena ligera de 3210 variante 1, 3210 variante 2, 3210 variante 3, 3210 variante 4, 3210 variante 5, 3210 variante 6, 2430 variante 1, 2430 variante 2, 2430 variante 3, 2430 variante 4 o 2430 variante 5. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de la invención comprende una CDR1 de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 4; una CDR2 de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 22 o SEQ ID N°: 41; y una CDR3 de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 35, SEQ ID N°: 42 o SEQ ID N°: 54. En determinadas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo tal como se proporciona aquí comprende una cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos de (i) SEQ ID N°: 4 para CDRL1, SEQ ID N°: 5 para CDRL2 y SEQ ID N°: 6 para CDRL3; (ii) SEQ ID N°: 4 para CDRL1, SEQ ID N°: 5 para CDRL2 y SEQ ID N°: 35 para CDRL3; (iii) SEQ ID N°: 4 para CDRL1, SEQ ID N°: 41 para CDRL2 y SEQ ID N°: 42 para CDRL3; (iv) SEQ ID N°: 4 para CDRL1, SEQ ID N°: 22 para CDRL2 y SEQ ID N°: 23 para CDRL3; o (v) SEQ ID N°: 4 para CDRL1, SEQ ID N°: 41 para CDRL2 y SEQ ID N°: 54 para CDRL3.

35 En una realización, un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, comprende todas las CDR de anticuerpo 3210 variante 1 enumeradas en la Tabla 1 y neutraliza la infección por RSV, MPV y PVM. En otra realización, un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, comprende todas las CDR de anticuerpo 3210 variante 2 enumeradas en la Tabla 1 y neutraliza la infección por RSV, MPV y PVM. En otra realización, un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, comprende todas las CDR de anticuerpo 3210 variante 3 enumeradas en la Tabla 1 y neutraliza la infección por RSV, MPV y PVM. En otra realización, un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, comprende todas las CDR de anticuerpo 3210 variante 4 enumeradas en la Tabla 1 y neutraliza la infección por RSV, MPV y PVM. En otra realización, un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, comprende todas las CDR de anticuerpo 3210 variante 5 enumeradas en la Tabla 1 y neutraliza la infección por RSV, MPV y PVM. En otra realización, un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, comprende todas las CDR de anticuerpo 3210 variante 6 enumeradas en la Tabla 1 y neutraliza la infección por RSV, MPV y PVM.

45 En otra realización más, un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, comprende todas las CDR de anticuerpo 2430 variante 1 enumeradas en la Tabla 1 y neutraliza la infección por RSV, MPV y PVM. En otra realización, un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, comprende todas las CDR de anticuerpo 2430 variante 2 enumeradas en la Tabla 1 y neutraliza la infección por RSV, MPV y PVM. En otra realización, un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, comprende todas las CDR de anticuerpo 2430 variante 3 enumeradas en la Tabla 1 y neutraliza la infección por RSV, MPV y PVM. En otra realización, un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, comprende todas las CDR de anticuerpo 2430 variante 4 enumeradas en la Tabla 1 y neutraliza la infección por RSV, MPV y PVM. En otra realización, un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, comprende todas las CDR de anticuerpo 2430 variante 5 enumeradas en la Tabla 1 y neutraliza la infección por RSV, MPV y PVM.

55 En la Tabla 2 están enumerados los números SEQ ID de las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) y la región variable de cadena ligera (VL) de ejemplos de anticuerpos de la invención, así como los números SEQ ID de las secuencias de ácidos nucleicos que los codifican.

Tabla 2 Números SEQ ID de residuos de aminoácidos y ácidos nucleicos V_H y V_L para anticuerpos que neutralizan RSV, MPV y PVM.

	SEQ ID N° de residuos de aminoácidos y ácidos nucleicos V _H y V _L					
	V _H cadena	V _L cadena	V _H aminoácido	V _L aminoácido	V _H ácido nucleico	V _L ácido nucleico
3210 variante 1	VH.1	VL	13	14	15	16
3210 variante 2	VH.2	VL	17	14	18	16
3210 variante 3	VH.2	VL.3	17	37	18	38
3210 variante 4	VH.3	VL.4	49	50	51	52
3210 variante 5	VH.3	VL	49	14	51	16
3210 variante 6	VH.2	VL.4	17	50	18	52
2430 variante 1	VH.1	VL	29	30	31	32
2430 variante 2	VH.2	VL	33	30	34	32
2430 variante 3	VH.3	VL.2	59	60	61	62
2430 variante 4	VH.3	VL	59	30	61	32
2430 variante 5	VH.2	VL.2	33	60	34	62

5 En una realización, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID N°: 13, 17, 29, 33, 49 o 59. En otra realización, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia mostrada en las SEQ ID N°: 14, 30, 37, 50 o 60. En otra realización más, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a las secuencias mostradas en las Figuras 24 y 25.

15 En otra realización de la invención, la invención comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, que neutraliza la infección por RSV, MPV y PVM y comprende una región variable de cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 14; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 37; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 50; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 17 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 14; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 17 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 37; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 49 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 50; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 49 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 14; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 49 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 37; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 17 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 50.

35 En otra realización más de la invención, la invención comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, que neutraliza la infección por RSV, MPV y PVM y comprende una región variable de cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 29 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 30; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 29 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 60; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 33 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 30; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 59 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 60; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 59 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 30; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 33 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 60.

Ejemplos de anticuerpos de la invención incluyen, de forma no exclusiva, HMB3210 variante 1, HMB3210 variante 2, HMB3210 variante 3, HMB3210 variante 4, HMB3210 variante 5, HMB3210 variante 6, HMB2430 variante 1, HMB2430 variante 2, HMB2430 variante 3, HMB2430 variante 4 o HMB2430 variante 5.

5 Como se puede ver en las Tablas 1 y 2, las CDR, las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de los anticuerpos dados a conocer se pueden intercambiar para obtener nuevos anticuerpos que conservan sus capacidades de unión y neutralización. Por tanto, los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos y fragmentos de unión de antígeno que comprenden cualquier combinación de las CDR mostradas en la Tabla 1 o de las cadenas pesadas y ligeras mostradas en la Tabla 2.

10 Los anticuerpos de la invención también incluyen moléculas de anticuerpos híbridos que comprenden una o más CDR de un anticuerpo de la invención y una o más CDR de otro anticuerpo para el mismo epítipo. En una realización, dichos anticuerpos híbridos comprenden tres CDR de un anticuerpo de la invención y tres CDR de otro anticuerpo para el mismo epítipo. Ejemplos de anticuerpos híbridos comprenden (i) las tres CDR de cadena ligera de un anticuerpo de la invención y las tres CDR de cadena pesada de otro anticuerpo para el mismo epítipo, o (ii) las tres CDR de cadena pesada de un anticuerpo de la invención y las tres CDR de cadena ligera de otro anticuerpo para el mismo epítipo.

15 El alcance de la invención también incluye variantes de anticuerpos. Por tanto, dentro del alcance de la descripción también están incluidas variantes de las secuencias mostradas en la solicitud. Dichas variantes incluyen variantes naturales generadas por mutación somática *in vivo* durante la respuesta inmune o *in vitro* después del cultivo de clones de células B inmortalizados. Alternativamente, las variantes pueden surgir a causa de la degeneración del código genético o se pueden producir debido a errores de transcripción o traducción.

20 Otras variantes de las secuencias de anticuerpos que tienen mejor afinidad y/o potencia se pueden obtener utilizando métodos conocidos en la técnica y están incluidas dentro del alcance de la descripción. Por ejemplo, se pueden utilizar sustituciones de aminoácidos para obtener anticuerpos con una afinidad mejorada adicionalmente. Alternativamente se puede utilizar una optimización de codones de la secuencia de nucleótidos para mejorar la eficiencia de traducción en sistemas de expresión para la producción del anticuerpo. Además, el alcance de la invención también incluye polinucleótidos que comprenden una secuencia optimizada para especificidad de anticuerpos o actividad neutralizadora mediante la aplicación de un método de evolución dirigida a cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención.

25 En una realización, las variantes de secuencias de anticuerpos pueden compartir un 70% o más (es decir, un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más) de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias mostradas en la solicitud. En algunas realizaciones, dicha identidad de secuencia se calcula con respecto a la longitud total de la secuencia de referencia (es decir, la secuencia mostrada en la solicitud). En otras realizaciones, el porcentaje de identidad, tal como se menciona aquí, es tal como se determina utilizando BLAST versión 2.1.3 utilizando los parámetros por defecto especificados por el NCBI (el National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosum 62 matrix; gap open penalty=11 and gap extension penalty=1].

30 En otro aspecto, la invención también incluye secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la presente invención o un fragmento de unión de antígeno de los mismos. Aquí se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos que codifican parte de las cadenas ligeras y pesadas y CDR, o todas ellas, de ejemplos de anticuerpos de la invención. La Tabla 2 muestra los números de SEQ ID de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de algunos ejemplos de anticuerpos de la invención. La Tabla 3 muestra los números de SEQ ID de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las CDR de los ejemplos de anticuerpos de la invención. Debido a la redundancia del código genético, existirán variantes de estas secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen las mismas secuencias de aminoácidos.

Tabla 3 Números SEQ ID de polinucleótidos CDR de anticuerpos que neutralizan RSV, MPV y PVM.

	SEQ ID N° de polinucleótidos CDR					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
3210 variante 1	7	8	9	10	11	12
3210 variante 2	7	8	9	10	11	12
3210 variante 3	7	8	9	10	11	36
3210 variante 4	43	44	45	46	47	48
3210 variante 5	43	44	45	10	11	12

	SEQ ID N° de polinucleótidos CDR					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
3210 variante 6	7	8	9	46	47	48
2430 variante 1	24	25	26	10	27	28
2430 variante 2	24	25	26	10	27	28
2430 variante 3	55	44	56	57	47	58
2430 variante 4	55	44	56	10	27	28
2430 variante 5	24	25	26	57	47	58

En una realización de la presente descripción que comprende la invención, las secuencias de ácidos nucleicos incluyen secuencias de ácidos nucleicos que tienen al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad con el ácido nucleico que codifica una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención. En otra realización de la presente descripción que comprende la invención, una secuencia de ácidos nucleicos tiene la secuencia de un ácido nucleico que codifica una CDR de cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos comprende una secuencia que es al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% idéntica a las secuencias de ácidos nucleicos de las SEQ ID N°: 7-12, 15, 16, 18, 24-28, 31-32, 34, 36, 38, 43-48, 51-52, 55-58 o 61-62.

En otra realización más de la presente descripción que comprende la invención, las secuencias de ácidos nucleicos incluyen secuencias de ácidos nucleicos que tienen al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad con el ácido nucleico que codifica una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención tal como se muestra en las Figuras 24 y 25.

El alcance de la invención también incluye vectores, por ejemplo vectores de expresión, que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención. Las células transformadas con dichos vectores también están incluidas dentro del alcance de la invención. Ejemplos de estas células incluyen, de forma no exclusiva, células eucariotas, por ejemplo células de levadura, células animales o células vegetales. En una realización, las células son células de mamífero, por ejemplo humanas, CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, de mieloma o de hibridoma.

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

Los anticuerpos de la invención se pueden acoplar con un fármaco para su administración en un sitio de tratamiento o con un marcador detectable para facilitar la formación de imágenes de un sitio que comprende células de interés, tales como células infectadas por RSV o MPV, o tanto por RSV como por MPV. En la técnica se conocen bien los métodos para acoplar anticuerpos con fármacos y marcadores detectables, al igual que métodos para la formación de imágenes utilizando marcadores detectables. Los anticuerpos marcados se pueden utilizar en una gran variedad de ensayos, empleado una gran variedad de marcadores. La detección de la formación de un complejo anticuerpo-antígeno entre un anticuerpo de la invención y un epítomo de interés (un epítomo o RSV o MPV o ambos) se puede facilitar uniendo al anticuerpo una sustancia detectable. Los medios de detección adecuados incluyen el uso de marcadores tales como radionúclidos, enzimas, coenzimas, sustancias fluorescentes, sustancias quimioluminiscentes, cromógenos, sustratos o cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, complejos de grupos prostéticos, radicales libres, partículas, colorantes y similares. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de material luminescente es luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S o ³H. Estos reactivos marcados pueden ser utilizados en una variedad de ensayos bien conocidos, tales como radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo ELISA, inmunoensayos fluorescentes y similares. (Véanse los documentos US 3.766.162; US 3.791.932; US 3.817.837; y US 4.233.402, por ejemplo.)

Un anticuerpo de acuerdo con la invención se puede conjugar con una fracción terapéutica tal como una citoxina, un agente terapéutico o un ion metálico radioactivo o radioisótopo. Ejemplos de radioisótopos

incluyen, de forma no exclusiva, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111 y similares. Dichos conjugados de anticuerpo pueden emplearse para modificar una respuesta biológica dada; la fracción de fármaco no debe ser interpretada como limitada a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que
5 posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricino A, exotoxina de pseudomonas o toxina de difteria.

Las técnicas para conjugar dicha fracción terapéutica con anticuerpos son bien conocidas. Véase, por ejemplo, Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), pp. 243-256; ed. Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery," en Controlled Drug Delivery, ed. Robinson et al. (2ª ed; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, ed. Pinchera et al. pp. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, ed. Baldwin et al. (Academic Press, New York, 1985), pp. 303-316; y Thorpe et al. (1982) Immunol. Rev. 62:119-158.
10
15

Alternativamente, un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, puede conjugarse con un segundo anticuerpo, o fragmento de anticuerpo del mismo, para formar un heteroconjugado de anticuerpos tal como se describe en el documento US 4.676.980. Además se pueden utilizar enlazadores entre los marcadores y los anticuerpos de la invención (por ejemplo US 4.831.175). Los anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno de los mismos se pueden marcar directamente con yodo radiactivo, indio, itrio u otra partícula radiactiva conocida en la técnica (por ejemplo US 5.595.721). El tratamiento puede consistir en una combinación de tratamiento con anticuerpos conjugados y no conjugados administrados de forma simultánea o secuencial (por ejemplo WO00/52031; WO00/52473).
20

También es posible unir los anticuerpos de la invención a un soporte sólido. Adicionalmente, los anticuerpos de la invención, o fragmentos de anticuerpos funcionales de los mismos, se pueden modificar químicamente mediante conjugación covalente con un polímero, por ejemplo para aumentar su vida media en circulación. En los documentos US 4.766.106, US 4.179.337, US 4.495.285 y US 4.609.546 se indican ejemplos de polímeros y métodos de unión a péptidos. En algunas realizaciones, los polímeros se pueden seleccionar entre polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG) El PEG es soluble en agua a temperatura ambiente y tiene la fórmula general: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, donde R puede ser hidrógeno o un grupo protector tal como un grupo alquilo o alcohol. En una realización, el grupo protector puede tener entre 1 y 8 carbonos. En otra realización, el grupo protector es metilo. El símbolo n es un número entero positivo. En una realización, n tiene un valor entre 1 y 1.000. En otra realización, n tiene un valor entre 2 y 500. En una realización, el PEG tiene un peso molecular medio entre 1.000 y 40.000. En otra realización, el PEG tiene un peso molecular medio entre 2.000 y 20.000. En otra realización más, el PEG tiene un peso molecular medio entre 3.000 y 12.000. En una realización, el PEG tiene al menos un grupo hidroxilo. En otra realización, el PEG tiene un grupo hidroxilo terminal. En otra realización más, se trata de un grupo hidroxilo terminal que se activa para reaccionar con un grupo amino libre en el inhibidor. No obstante, se entenderá que el tipo y la cantidad de grupos reactivos puede variar para obtener un PEG/anticuerpo conjugado covalente de la presente invención.
25
30
35
40

En la presente invención también son útiles polioles polioxietilados solubles en agua. Éstos incluyen sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG) y similares. En una realización se utiliza POG. Sin establecer una vinculación con ninguna teoría en concreto, dado que la cadena principal glicerol del glicerol polioxietilado es la misma cadena principal que está presente naturalmente por ejemplo en mono-, di- y triglicéridos animales y humanos, esta ramificación no tendría que ser considerada necesariamente como un agente extraño en el cuerpo. En algunas realizaciones, el POG tiene un peso molecular en el mismo intervalo que el PEG. Otro sistema de administración de fármacos que puede emplearse para aumentar la vida media en circulación es el liposoma. Los expertos en la técnica conocen métodos para preparar sistemas de administración por liposoma. En la técnica se conocen otros sistemas de administración de fármacos, que se describen, por ejemplo, las referencias de en Poznansky et al. (1980) y Poznansky (1984).
45
50

Los anticuerpos de la invención se pueden preparar en forma purificada. Normalmente, el anticuerpo estará presente en una composición que está esencialmente libre de otros polipéptidos, por ejemplo donde menos de un 90% (en peso), habitualmente menos de un 60% y de forma más habitual menos de un 50% de la composición está formada por otros polipéptidos.

Los anticuerpos de la invención pueden ser inmunógenos en huéspedes no humanos (o heterólogos), por ejemplo en ratones. En particular, los anticuerpos pueden tener un ideotipo que sea inmunógeno en huéspedes no humanos, pero que no lo sea en huéspedes humanos. Los anticuerpos de la invención para uso humano incluyen aquellos que no se pueden aislar fácilmente de huéspedes tales como ratones, cabras,
55

conejos, ratas, mamíferos no primates, etc., y que generalmente no se pueden obtener mediante humanización de xeno-ratones.

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

Producción de anticuerpos

10 Los anticuerpos de la invención se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la metodología general para producir anticuerpos monoclonales utilizando tecnología de hibridoma es bien conocida (Kohler, G. y Milstein, C., 1975; Kozbar et al. 1983). En una realización se utiliza el método alternativo de inmortalización por EBV descrito en el documento WO2004/076677.

15 Utilizando el método descrito en el documento WO 2004/076677, las células B que producen el anticuerpo de la invención se pueden transformar con EBV y un activador de células B policlona. Durante la etapa de transformación se pueden añadir opcionalmente estimulantes adicionales de crecimiento y diferenciación celular para aumentar todavía más la eficiencia. Estos estimulantes pueden ser citoquinas tales como IL-2 e IL-5. En un aspecto, durante la etapa de inmortalización se añade IL-2 para mejorar adicionalmente la eficiencia de la inmortalización, pero su uso no es esencial. Las células B inmortalizadas producidas utilizando estos métodos se pueden cultivar después utilizando métodos conocidos en la técnica y anticuerpos aislados de las mismas.

20 Utilizando el método descrito en el documento WO 2010/0467752 se pueden cultivar células plasmáticas en cantidades limitadas, o como células plasmáticas individuales en placas de cultivo en micropocillos. Luego se pueden aislar anticuerpos de los cultivos de células plasmáticas. Además, a partir de los cultivos de células plasmáticas se puede extraer ARN y se puede realizar PCR utilizando métodos conocidos en la técnica. Las regiones VH y VL de los anticuerpos se pueden amplificar mediante RT-PCR, secuenciar y clonar en un vector de expresión, que después se transfecta en células HEK293T u otras células huésped. La clonación de ácido nucleico en vectores de expresión, la transfección de células huésped, el cultivo de las células huésped transfectadas y el aislamiento del anticuerpo producido se pueden realizar utilizando cualquier método conocido por los expertos.

25 Los anticuerpos se pueden purificar adicionalmente, si así se desea, utilizando filtración, centrifugación y diversos métodos cromatográficos, como HPLC o cromatografía de afinidad. En este campo se conocen técnicas para la purificación de anticuerpos, por ejemplo anticuerpos monoclonales, incluyendo técnicas para producir anticuerpos de calidad farmacéutica.

35 Se pueden obtener fragmentos de los anticuerpos de la invención a partir de los anticuerpos mediante métodos que incluyen digestión con enzimas como pepsina o papaína y/o mediante escisión de enlaces disulfuro por reducción química. Alternativamente, se pueden obtener fragmentos de anticuerpos mediante clonación y expresión de parte de las secuencias de las cadenas pesadas o ligeras. Los "fragmentos" de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. La invención también abarca fragmentos Fv de cadena simple (scFv) derivados de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, la invención incluye un scFv que comprende las CDR de un anticuerpo de la invención. También están incluidos monómeros y dímeros de cadena pesada o ligera, anticuerpos de cadena pesada de dominio simple, anticuerpos de cadena ligera de dominio simple, así como anticuerpos de cadena simple, por ejemplo Fv de cadena simple en el que los dominios variables de cadena pesada y ligera están unidos por un enlazador peptídico.

45 Los fragmentos de anticuerpos de la invención pueden impartir interacciones monovalentes o multivalentes y pueden estar contenidos en una variedad de estructuras tal como se describe más arriba. Por ejemplo, se pueden sintetizar moléculas de scFv para crear un "triacuerpo" trivalente o un "tetracuerpo" tetravalente. Las moléculas de scFv pueden incluir un dominio de la región Fc que resulta en minicuerpos bivalentes. Además, las secuencias de la invención pueden ser un componente de moléculas multiespecíficas en las que las secuencias de la invención están dirigidas a los epítopos de la invención y otras regiones de la molécula se unen a otras dianas. Ejemplos de moléculas incluyen, de forma no exclusiva, Fab₂ biespecífico, Fab₃ trispecífico, scFv biespecífico, y diacuerpos (Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotechnology 9: 1126-1136).

50 Para preparar secuencias de ADN que codifican los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar técnicas estándar de biología molecular. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar por completo o parcialmente utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Es posible utilizar técnicas de mutagénesis dirigida y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), según proceda.

- Para la expresión de las secuencias de ADN que codifican las moléculas de anticuerpo de la presente invención o fragmentos de las mismas se puede utilizar cualquier sistema célula huésped/vector adecuado. Es posible utilizar, en parte, sistemas bacterianos, por ejemplo E. coli y otros sistemas microbianos para la expresión de fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, y en especial fragmentos Fv, y fragmentos de anticuerpos de cadena simple, por ejemplo Fvs de cadena simple. Para la producción de moléculas de anticuerpo más grandes, incluyendo moléculas de anticuerpo completas, se pueden utilizar sistemas de expresión de células huésped eucariotas, por ejemplo de mamífero. Células huésped de mamífero adecuadas incluyen, de forma no exclusiva, células CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, de mieloma o de hibridoma.
- 5
- 10 La presente solicitud también describe un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención, que comprende cultivar una célula huésped que incluye un vector que codifica un ácido nucleico de la presente invención bajo condiciones adecuadas para la expresión de proteína de ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.
- 15 La molécula de anticuerpo puede comprender un único polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solo es necesario utilizar una secuencia codificadora de polipéptido de cadena pesada o de cadena ligera para transfectar las células huésped. Para obtener productos que comprenden tanto cadenas pesadas como cadenas ligeras, la línea celular se puede transfectar con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente se puede utilizar un solo vector, incluyendo el vector secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada.
- 20 Alternativamente, se pueden producir anticuerpos de acuerdo con la invención (i) expresando una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención en una célula huésped y (ii) aislando el producto de anticuerpo expresado. Adicionalmente, el método puede incluir (iii) la purificación del anticuerpo aislado.
- 25 Las células B transformadas y las células plasmáticas cultivadas pueden ser sometidas a cribado para seleccionar aquellas que producen anticuerpos con la especificidad o función deseada.
- La etapa de cribado se puede llevar a cabo mediante cualquier inmunoensayo, por ejemplo ELISA, mediante tinción de tejidos o células (incluyendo células transfectadas), mediante ensayo de neutralización o mediante diversos métodos conocidos en la técnica para identificar una especificidad o función deseada. El ensayo se puede elegir en base a un reconocimiento simple de uno o más antígenos, o además en base a una función deseada, por ejemplo seleccionar anticuerpos neutralizadores más que solo anticuerpos de unión a antígeno, seleccionar anticuerpos que pueden cambiar características de células diana, tales como sus cascadas de señalización, su forma, su tasa de crecimiento, su capacidad de influir en otras células, su respuesta a la influencia de otras células o de otros reactivos o de un cambio de las condiciones, su estado de diferenciación, etc.
- 30 Después se pueden producir clones de células B transformadas individuales a partir del cultivo de células B transformadas positivas. La etapa de clonación para separar clones individuales de la mezcla de células positivas se puede llevar a cabo utilizando dilución limitativa, micromanipulación, deposición de células simples mediante clasificación celular u otro método conocido en la técnica.
- 35 El ácido nucleico de las células plasmáticas cultivadas se puede aislar, clonar y expresar en células HEK293T u otras células huésped conocidas utilizando métodos conocidos en la técnica.
- 40 Los clones de células B inmortalizadas o las células huésped transfectadas de la invención pueden emplearse de diversos modos, por ejemplo como fuente de anticuerpos monoclonales, como fuente de ácido nucleico (ADN o ARNm) codificador de un anticuerpo monoclonal de interés, para investigación, etc.
- 45 La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende células de memoria B inmortalizadas o células huésped transfectadas que producen anticuerpos que neutralizan la infección por RSV, MPV y PVM, y un diluyente o vehículo.
- El clon de célula B inmortalizada o las células plasmáticas cultivadas de la invención también pueden utilizarse como fuente de ácido nucleico para la clonación de genes de anticuerpos para una posterior expresión recombinante. La expresión de fuentes recombinantes es más común para fines farmacéuticos que la expresión de células B o hibridomas, por ejemplo por motivos de estabilidad, reproducibilidad, facilidad de cultivo, etc.
- 50 Por tanto, la presente descripción proporciona un método para preparar una célula recombinante, que comprende las etapas de: (i) obtener uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo ARNm de cadena pesada y/o ligera) a partir del clon de célula B o las células plasmáticas cultivadas que codifican el anticuerpo de interés;

(ii) insertar el ácido nucleico en un vector de expresión; y (iii) transfectar el vector en una célula huésped con el fin de permitir la expresión del anticuerpo de interés en dicha célula huésped.

De modo similar, la presente descripción proporciona un método para preparar una célula recombinante, que comprende las etapas de: (i) secuenciar uno o más ácidos nucleicos a partir del clon de célula B o las células plasmáticas cultivadas que codifican el anticuerpo de interés; y (ii) utilizar la información de secuencia de la etapa (i) para preparar uno o más ácidos nucleicos para su inserción en una célula huésped con el fin de permitir la expresión del anticuerpo de interés en dicha célula huésped. El ácido nucleico puede, pero no necesita, ser manipulado entre las etapas (i) y (ii) para introducir sitios de restricción, para cambiar el uso de codones y/o para optimizar secuencias reguladoras de transcripción y/o traducción.

La presente descripción también proporciona un método para preparar una célula huésped transfectada, que comprende la etapa de transfectar una célula huésped con uno o más ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de interés, siendo los ácidos nucleicos ácidos nucleicos que han sido derivados de un clon de célula B inmortalizada o de una célula plasmática cultivada de la invención. Por tanto, los procedimientos para preparar primero el o los ácidos nucleicos y después utilizar éstos para transfectar una célula huésped pueden llevarse a cabo en tiempos diferentes, por personas diferentes, en lugares diferentes (por ejemplo en países diferentes).

Estas células recombinantes de la invención pueden emplearse después con fines de expresión y cultivo. Son particularmente útiles para la expresión de anticuerpos en la producción farmacéutica a gran escala. También pueden ser utilizadas como ingredientes activos de una composición farmacéutica. Se puede utilizar cualquier técnica de cultivo adecuada, incluyendo, de forma no exclusiva, cultivo estático, cultivo en frascos sobre rodillos, líquido ascítico, cartucho de biorreactor de tipo fibra hueca, minifermentador modular, depósito agitado, cultivo en microportadores, perfusión de núcleo cerámico, etc.

Los métodos para obtener y secuenciar genes de inmunoglobulina a partir de células B o células plasmáticas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el capítulo 4 de Kuby Immunology, 4ª edición, 2000).

La célula huésped transfectada puede ser una célula eucariota, incluyendo células de levadura y animales, en particular células de mamífero (por ejemplo células CHO, células NS0, células humanas tales como PER.C6 o células HKB-11, células de mieloma), así como células vegetales. Los huéspedes de expresión preferentes pueden glicosilar el anticuerpo de la invención, en particular con estructuras carbohidrato que no son por sí mismas inmunógenas en humanos. En una realización, la célula huésped transfectada puede ser capaz de crecer en medios libres de suero. En otra realización, la célula huésped transfectada puede ser capaz de crecer en cultivo en ausencia de productos derivados de animales. La célula huésped transfectada también puede ser cultivada para obtener una línea celular.

La presente descripción también proporciona un método para preparar una o más moléculas de ácido nucleico (por ejemplo genes de cadena pesada y ligera) que codifican un anticuerpo de interés, que comprende las etapas de: (i) preparar un clon de célula B inmortalizada o cultivar células plasmáticas de acuerdo con la invención; (ii) obtener a partir del clon de célula B o de las células plasmáticas cultivadas un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de interés. Además, la presente descripción proporciona un método para obtener una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo de interés, que comprende las etapas de: (i) preparar un clon de célula B inmortalizada o cultivar células plasmáticas de acuerdo con la invención; (ii) secuenciar ácido nucleico a partir del clon de célula B o de las células plasmáticas cultivadas, que codifica el anticuerpo de interés.

La presente descripción también proporciona un método para preparar una o más moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de interés, que comprende la etapa de obtener el ácido nucleico que ha sido obtenido a partir de un clon de célula B transformada o de células plasmáticas cultivadas de la invención. Por tanto, los procedimientos para obtener primero el clon de célula B o la célula plasmática cultivada y obtener después uno o más ácidos nucleicos a partir del clon de célula B o de las células plasmáticas cultivadas pueden llevarse a cabo en tiempos diferentes, por personas diferentes, en lugares diferentes (por ejemplo en países diferentes).

La presente descripción proporciona un método para preparar un anticuerpo (por ejemplo para uso farmacéutico), que comprende las etapas de: (i) obtener y/o secuenciar uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo genes de cadena pesada y ligera) a partir del clon de célula B o de las células plasmáticas cultivadas, que expresan el anticuerpo de interés; (ii) insertar el o los ácidos nucleicos en un vector de expresión o utilizar la o las secuencias de ácidos nucleicos para preparar un vector de expresión; (iii) transfectar una célula huésped que puede expresar el anticuerpo de interés; (iv) cultivar o subcultivar las células huésped transfectadas bajo condiciones en las que se produce la expresión del anticuerpo de interés; y, opcionalmente, (v) purificar el anticuerpo de interés.

La presente descripción también proporciona un método para preparar un anticuerpo que comprende las etapas de: cultivar o subcultivar una población de células huésped transfectadas bajo condiciones en las que se produce la expresión del anticuerpo de interés y, opcionalmente, purificar el anticuerpo de interés, habiendo sido preparada dicha población de células huésped transfectadas mediante (i) preparación de uno o más ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo seleccionado de interés que es producido por un clon de célula B o células plasmáticas cultivadas preparadas tal como se describe más arriba; (ii) inserción del o de los ácidos nucleicos en un vector de expresión; (iii) transfección del vector en una célula huésped que puede expresar el anticuerpo de interés; y (iv) cultivo o subcultivo de la célula huésped transfectada que comprende los ácidos nucleicos insertados para producir el anticuerpo de interés. Por tanto, los procedimientos para preparar primero la célula huésped recombinante y después cultivarla para expresar un anticuerpo pueden llevarse a cabo en tiempos muy diferentes, por personas diferentes, en lugares diferentes (por ejemplo en países diferentes).

Epítopos

Tal como se menciona más arriba, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para mapear los epítopos a los que se unen. Los inventores han descubierto que los anticuerpos neutralizadores de la invención están dirigidos a epítopos que se encuentran en la proteína F prefusión, pero no en la proteína F postfusión. En una realización, los anticuerpos, o los fragmentos de unión de antígeno de los mismos, se unen a proteína F prefusión del RSV y no a proteína F postfusión del RSV. En otra realización, los anticuerpos, o los fragmentos de unión de antígeno de los mismos, se unen a la proteína F prefusión y no a la proteína F postfusión del RSV y el MPV. En otra realización más, los anticuerpos, o los fragmentos de unión de antígeno de los mismos, se unen a la proteína F prefusión pero no a la proteína F postfusión del RSV, el MPV y el PVM.

Los epítopos a los que se unen los anticuerpos de la invención pueden ser lineales (continuos) o conformacionales (discontinuos). En una realización, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se unen con un epítipo conformacional. En otra realización, el epítipo conformacional solo está presente bajo condiciones no reductoras. Sin establecer una vinculación a ninguna teoría en concreto, el epítipo conformacional unido por los anticuerpos de la invención depende de la presencia de enlaces disulfuro entre residuos aminoácidos en la proteína F.

El epítipo al que se unen los anticuerpos de la invención es diferente de un sitio antigénico I, un sitio antigénico II, un sitio antigénico IV tal como se define en la proteína F postfusión del RSV y sitios correspondientes en la proteína F del MPV. En otra realización más, los anticuerpos y los fragmentos de unión de antígeno de la invención no entran en competencia cruzada con palivizumab, motavizumab, mAb 101F, mAb 131-2A o mAb D25 por la unión con la proteína F del RSV, ni entran en competencia cruzada con mAb 234 por la unión con la proteína F del MPV.

En otra realización, la región a la que se unen los anticuerpos de la invención comprende un polipéptido situado en la parte N-terminal de la proteína F del RSV, abarcando los residuos SAVSKGYLSALRTGWYTSVIT (SEQ ID N°: 63). La parte de núcleo de este polipéptido está formada por los residuos Y(x1)S(x2)LRGTW, que están altamente conservados entre RSV, MPV y PVM, y donde el aminoácido en la posición (x1) puede ser, de forma no exclusiva, L, F, o K, y donde el aminoácido en la posición (x2) puede ser, de forma no exclusiva, A o V. El anticuerpo de la invención o el fragmento de unión de antígeno del mismo se unen a una región conservada en la parte amino terminal de la proteína F del RSDV, del MPV o del PVM que comprende la secuencia de aminoácidos según cualquiera de YLSALRTGW (SEQ ID N°: 64), YLSVLRTGW (SEQ ID N°: 65), YFSALRTGW (SEQ ID N°: 66), YFSVLRTGW (SEQ ID N°: 67), YKSALRTGW (SEQ ID N°: 68), e YKSVLRTGW (SEQ ID N°: 69).

Los polipéptidos que se unen a los anticuerpos de la presente invención pueden tener diversos usos. Los polipéptidos y variantes de polipéptido de los mismos en forma purificada o sintética pueden utilizarse para provocar respuestas inmunes (es decir, como vacunas, o para la producción de anticuerpos para otros usos) o para cribar sueros para anticuerpos que reaccionan de forma inmune con el epítipo o mimótopos del mismo. En una realización, dichos polipéptidos o variantes de polipéptido, o antígeno que comprende dichos polipéptidos o variantes de polipéptido, pueden ser utilizados como vacuna para provocar una respuesta inmune que comprende anticuerpos de la misma calidad que los descritos en la presente invención. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención pueden ser utilizados también en un método de control de calidad de vacunas. En particular, los anticuerpos pueden ser utilizados para comprobar que el antígeno en una vacuna contiene el epítipo inmunógeno correcto en la conformación correcta. El uso de un anticuerpo de la invención, o de un fragmento de unión de antígeno del mismo, para controlar la calidad de una vacuna contra RSV o MPV, o tanto contra RSV como contra MPV, por ejemplo comprobando que el antígeno de dicha vacuna contiene el epítipo específico en la conformación correcta, también se considera dentro del alcance de la invención.

Los polipéptidos que se unen a los anticuerpos de la presente invención pueden ser útiles también en el cribado de ligandos que se unen a dichos polipéptidos. Dichos ligandos, incluyendo, de forma no exclusiva, anticuerpos, incluyendo aquellos de camello, tiburón y otras especies, fragmentos de anticuerpos, péptidos, productos de tecnología de presentación sobre fagos, aptámeros, adnectinas o fragmentos de otras proteínas virales o celulares, pueden bloquear el epítipo y prevenir así la infección.

Composiciones farmacéuticas

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más de los siguientes componentes: los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención; ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos o fragmentos; o vectores que codifican los ácidos nucleicos. La composición farmacéutica también contiene un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Aunque el vehículo o excipiente puede facilitar la administración, no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos nocivos para el individuo que recibe la composición. Tampoco debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, de metabolización lenta, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas virales inactivas.

Es posible utilizar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácidos inorgánicos, tales como clorhidratos, bromhidratos, 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, dichas composiciones pueden incluir sustancias auxiliares, como humectantes o emulsionantes, o sustancias tampón de pH. Dichos vehículos permiten formular las composiciones farmacéuticas como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas y suspensiones, para su ingestión por el individuo.

El alcance de la invención incluye composiciones presentes en diversas formas de administración. Estas formas incluyen, de forma no exclusiva, formas adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo por inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección de bolo o infusión continua. Cuando el producto está previsto para inyección o infusión, puede adoptar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso, y puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizadores y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca para reconstituirla antes de su uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden ser administradas directamente al individuo. En una realización, las composiciones están adaptadas para su administración a un mamífero, por ejemplo a seres humanos.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser administradas por cualquier número de vías, incluyendo, de forma no exclusiva, las vías oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea, tópica, subcutánea, intranasal, enteral, sublingual, intravaginal o rectal. También es posible utilizar hipo-espráis para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Normalmente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como inyectables, bien como soluciones líquidas, bien como suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

La administración directa de las composiciones se realizará generalmente por inyección, vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o mediante administración al espacio intersticial en un tejido. Las composiciones también pueden ser administradas en una lesión. El tratamiento de dosificación puede consistir en un programa de dosis simple o en un programa multi-dosis. Algunos productos farmacéuticos conocidos basados en anticuerpos proporcionan una guía en relación con la frecuencia de administración, por ejemplo si un producto farmacéutico debe administrarse diaria, semanal, mensualmente, etc. La frecuencia y la dosificación también pueden depender de la gravedad de los síntomas.

Las composiciones de la invención se pueden preparar de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar como inyectables, bien como soluciones líquidas, bien como suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección (por ejemplo una composición liofilizada, como SynagisTM y HerceptinTM, para reconstitución con agua estéril que contiene un conservante). La composición se puede preparar para la administración tópica, por ejemplo como un ungüento, crema o polvo. La composición se puede preparar para la administración oral, por ejemplo como un comprimido o cápsula, como un spray, como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición se puede preparar para la administración pulmonar, por ejemplo como un inhalador, utilizando un polvo fino o un spray. La composición se puede preparar como un

supositorio o pesario. La composición se puede preparar para la administración nasal, auricular u ocular, por ejemplo en forma de gotas. La composición puede estar en forma de un *kit* diseñado de modo que una composición combinada se reconstituye justo antes de la administración a un individuo. Por ejemplo, se puede proporcionar un anticuerpo liofilizado en forma de *kit* con agua estéril o un tampón estéril.

- 5 Se ha de entender que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o variantes y derivados de los mismos. Como tal, será susceptible de degradación en el tracto gastrointestinal. Por tanto, si la composición está prevista para ser administrada por una vía que emplea el tracto gastrointestinal, no será necesario que la composición contenga agentes que protejan el anticuerpo frente a la degradación, sino que liberen el anticuerpo una vez que éste ha sido absorbido desde el tracto gastrointestinal.

10 En Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, edición 20, ISBN: 0683306472 está disponible un debate exhaustivo sobre vehículos farmacéuticamente aceptables.

- 15 Las composiciones farmacéuticas de la invención tienen generalmente un pH entre 5,5 y 8,5, en algunas realizaciones puede estar entre 6 y 8, y en otras puede ser de aproximadamente 7. El pH se puede mantener mediante el uso de un tampón. La composición puede ser estéril y/o estar libre de pirógenos. La composición puede ser isotónica con respecto a los humanos. En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención se suministran en recipientes cerrados herméticamente.

- 20 Las composiciones farmacéuticas incluirán una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la invención y/o un polipéptido que comprende un epítipo que se une a un anticuerpo de la invención, es decir, una cantidad suficiente para tratar, mejorar, atenuar o prevenir una enfermedad o estado deseado, o para mostrar un efecto terapéutico detectable. Los efectos terapéuticos también incluyen la reducción o atenuación de la potencia patógena o los síntomas físicos. La cantidad eficaz precisa para un individuo particular dependerá del tamaño, el peso y la salud de éste, la naturaleza y extensión de dicho estado, y la terapéutica o combinación de terapéuticas seleccionada para la administración. La cantidad eficaz para un estado dado se determina mediante experimentación rutinaria y entra dentro del criterio del médico. Para los fines de la presente invención, una dosis eficaz oscilará en general entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg, o entre aproximadamente 0,05 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg de las composiciones de la presente invención en el individuo al que es administrada. Algunos productos farmacéuticos conocidos basados en anticuerpos proporcionan orientación a este respecto, por ejemplo el Herceptin™ se administra por infusión intravenosa de una solución de 21 mg/ml, con una dosis de carga inicial de 4 mg/kg de peso corporal y una dosis de mantenimiento semanal de 2 mg/kg de peso corporal; el Rituxan™ se administra semanalmente en una dosis de 375 mg/m²; etc.

- 35 En una realización, las composiciones pueden incluir más de un (por ejemplo 2, 3, etc.) anticuerpo de la invención para proporcionar un efecto terapéutico aditivo o sinérgico. En otra realización, la composición puede comprender uno o más (por ejemplo 2, 3, etc.) anticuerpos de la invención y uno o más (por ejemplo 2, 3, etc.) anticuerpos adicionales contra el RSV o el MPV, o contra ambos, el RSV y el MPV. Además, la administración de anticuerpos de la invención junto con anticuerpos específicos para otros patógenos, por ejemplo el virus de la gripe A o de la gripe B, también entra dentro del alcance de la invención. Los anticuerpos de la invención pueden ser administrados de forma combinada/simultánea o en momentos independientes con respecto a anticuerpos específicos para patógenos diferentes a RSV y MPV.

40 En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos, siendo el primer anticuerpo un anticuerpo de la invención tal como se describe aquí y siendo el segundo anticuerpo específico para RSV o MPV o para ambos, RSV y MPV, o para un patógeno diferente que puede haber coinfestado al individuo al que se le está administrando la composición farmacéutica.

- 45 Ejemplos de anticuerpos de la invención específicos para RSV, MPV y PVM, y que neutralizan los mismos, incluyen, de forma no exclusiva, HMB3210 variante 3, HMB3210 variante 1, HMB3210 variante 2, HMB3210 variante 4, HMB3210 variante 5, HMB3210 variante 6, HMB2430 variante 1, HMB2430 variante 2, HMB2430 variante 3, HMB2430 variante 4 o HMB2430 variante 5.

- 50 En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo HMB3210 variante 1 o un fragmento de unión de antígeno del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo HMB3210 variante 2 o un fragmento de unión de antígeno del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo HMB3210 variante 3 o un fragmento de unión de antígeno del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo HMB3210 variante 4 o un fragmento de unión de antígeno del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona una

composición farmacéutica que comprende el anticuerpo HMB3210 variante 5 o un fragmento de unión de antígeno del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo HMB3210 variante 6 o un fragmento de unión de antígeno del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 En otra realización más, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo HMB2430 variante 1 o un fragmento de unión de antígeno del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo HMB2430 variante 2 o un fragmento de unión de antígeno del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo HMB2430 variante 3 o un fragmento de unión de antígeno del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo HMB2430 variante 4 o un fragmento de unión de antígeno del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo HMB2430 variante 5 o un fragmento de unión de antígeno del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 20 Los anticuerpos de la invención pueden ser administrados (de forma combinada o por separado) con otras terapias, por ejemplo con compuestos quimioterapéuticos, con radioterapia, etc. En una realización, los compuestos terapéuticos incluyen compuestos antivirales tales como Tamiflu™. Esta terapia de combinación proporciona una mejora aditiva o sinérgica de la eficacia terapéutica en relación con los agentes terapéuticos individuales cuando son administrados solos. El término "sinergia" se utiliza para describir un efecto combinado de dos o más agentes activos que es mayor que la suma de los efectos individuales de cada agente activo respectivo. Por tanto, cuando el efecto combinado de dos o más agentes conduce a una "inhibición sinérgica" de una actividad o proceso, esto significa que la inhibición de la actividad o proceso es mayor que la suma de los efectos inhibidores de cada agente activo respectivo. La expresión "efecto terapéutico sinérgico" se refiere a un efecto terapéutico observado con una combinación de dos o más terapias, siendo el efecto terapéutico (medido mediante cualquiera de una serie de parámetros) superior a la suma de los efectos terapéuticos individuales observados con las respectivas terapias individuales.

- 30 Los anticuerpos pueden ser administrados a aquellos individuos que previamente no han mostrado ninguna respuesta, es decir, que han mostrado ser refractarios al tratamiento de la infección por RSV o MPV. Dicho tratamiento puede incluir tratamiento previo con un agente antiviral. Esto se puede deber, por ejemplo, a una infección con una cepa del RSV, del MPV o tanto del RSV como del MPV, resistente a los antivirales.

- 35 En una realización, una composición de la invención puede incluir anticuerpos de la invención, pudiendo corresponder los anticuerpos al menos a un 50% en peso (por ejemplo un 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más) e la proteína total en la composición. En una composición de este tipo, los anticuerpos están en forma purificada.

La presente descripción proporciona un método para preparar una composición farmacéutica que comprende las etapas de: (i) preparar un anticuerpo de la invención; y (ii) mezclar el anticuerpo purificado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

- 40 En otra realización, un método para preparar una composición farmacéutica comprende la etapa de: mezclar un anticuerpo con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, siendo el anticuerpo un anticuerpo monoclonal obtenido a partir de una célula B transformada o una célula plasmática cultivada de la invención. Por tanto, los procedimientos para obtener primero el anticuerpo monoclonal y después preparar el producto farmacéutico pueden llevarse a cabo en tiempos muy diferentes, por personas diferentes, en lugares diferentes (por ejemplo en países diferentes).

- 45 Como una alternativa para administrar anticuerpos o células B con fines terapéuticos, es posible administrar a un individuo un ácido nucleico (normalmente ADN) que codifica el anticuerpo monoclonal (o fragmento activo del mismo) de interés derivado de la célula B o las células plasmáticas cultivadas, de modo que el ácido nucleico puede ser expresado en el individuo *in situ* para proporcionar un efecto terapéutico deseado. En la técnica se conocen terapias génicas y vectores de administración de ácido nucleico adecuados.

- 50 Las composiciones de la descripción pueden ser composiciones inmunógenas, y en algunas realizaciones pueden ser composiciones de vacuna que comprenden un antígeno que incluye un epítipo reconocido por un anticuerpo de la invención o un fragmento de unión de antígeno del mismo. Las vacunas de acuerdo con la descripción pueden ser profilácticas (es decir, que previenen la infección) o terapéuticas (es decir, que tratan o mejoran la infección).

- 55 Las composiciones pueden incluir un agente antimicrobiano, en particular si están envasadas en un formato multi-dosis. Pueden comprender un detergente, por ejemplo Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los

detergentes están presentes normalmente en niveles bajos, por ejemplo inferiores al 0,01%. Las composiciones también pueden incluir sales de sodio (por ejemplo cloruro de sodio) para otorgar tonicidad. Una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl es una concentración habitual.

5 Además, las composiciones pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo manitol) o un disacárido (por ejemplo sacarosa o trehalosa), por ejemplo en una cantidad de aproximadamente 15-30 mg/ml (por ejemplo 25 mg/ml), en particular si deben ser liofilizadas o si incluyen material que ha sido reconstituido a partir de material liofilizado. El pH de una composición para liofilización se puede ajustar entre 5 y 8, o entre 5,5 y 7, o aproximadamente en 6,1, antes de la liofilización.

10 Las composiciones de la descripción pueden incluir también uno o más agentes inmunorreguladores. En una realización, uno o más de los agentes inmunorreguladores incluyen un adyuvante.

15 Las composiciones de epítipo de la descripción pueden provocar tanto una respuesta inmune con mediación celular como una respuesta inmune humoral para abordar eficazmente la infección por RSV y MPV. Esta respuesta inmune puede inducir anticuerpos de larga duración (por ejemplo neutralizadores) y una inmunidad con mediación celular que puede responder rápidamente a la exposición al RSV o al MPV o tanto al RSV como al MPV.

Tratamientos médicos y usos

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención, o derivados y variantes de los mismos, pueden ser utilizados para el tratamiento de la infección por RSV o MPV o tanto por RSV como por MPV; o para el diagnóstico de infección por RSV o MPV.

20 Los métodos de diagnóstico pueden incluir la puesta en contacto de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo con una muestra. Estas muestras pueden consistir en muestras de tejido tomadas, por ejemplo, de fosas nasales, cavidades de senos, glándulas salivares, pulmón, hígado, páncreas, riñón, oreja, ojo, placenta, tracto alimentario, corazón, ovarios, hipófisis, glándulas suprarrenales, tiroides, cerebro o piel. Los métodos de diagnóstico también pueden incluir la detección de un complejo antígeno/anticuerpo.

25 Por consiguiente, la presente descripción que comprende la presente invención proporciona (i) un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o variantes y derivados de los mismos de acuerdo con la invención, (ii) un clon de célula B inmortalizada de acuerdo con la invención, (iii) un epítipo que se puede unir a un anticuerpo de la invención, o (iv) un ligando, preferiblemente un anticuerpo, que se puede unir a un epítipo que se une a un anticuerpo de la invención para su uso en terapia.

30 La invención también proporciona un método para tratar a un individuo, que comprende la administración a dicho individuo de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con la invención. En una realización, el método resulta en una reducción de la infección por RSV o MPV en el individuo. En otra realización, el método previene, reduce el riesgo o retrasa la infección por RSV o MPV en el individuo.

35 La invención también proporciona el uso de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o variantes y derivados de los mismos de acuerdo con la invención, un clon de célula B inmortalizada de acuerdo con la invención, o una composición farmacéutica de la invención para (i) la producción de un medicamento para el tratamiento o la atenuación de la infección por RSV o MPV o tanto por RSV como por MPV, (ii) una vacuna, o (iii) el diagnóstico de la infección por RSV y MPV.

40 La invención proporciona una composición de la invención para su uso como medicamento para la prevención o el tratamiento de la infección por RSV o MPV. También proporciona el uso de un anticuerpo de la invención y/o de una proteína que comprende un epítipo con el que se une un anticuerpo en la producción de un medicamento para el tratamiento y/o el diagnóstico en un individuo. También proporciona un método para tratar a un individuo, que comprende la etapa de administrar al individuo una composición de la invención. En algunas realizaciones, el individuo puede ser un humano. Un modo de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica el control de los síntomas de la enfermedad después de la administración de la composición de la invención. El tratamiento puede consistir en un programa de dosis simple o en un programa multi-dosis.

50 En una realización se administra un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, clon de célula B inmortalizada, epítipo o composición de acuerdo con la invención a un individuo que necesita este tratamiento. Dicho individuo puede ser, de forma no exclusiva, un individuo con riesgo o susceptibilidad particular a infección por RSV o MPV, incluyendo, por ejemplo, un individuo inmunocomprometido. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la invención también pueden emplearse en la inmunización pasiva o la vacunación activa.

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos tal como se describen en la presente invención también pueden ser utilizados en un *kit* para el diagnóstico de la infección por RSV o MPV. Además se pueden utilizar

epítomos que se pueden unir a un anticuerpo de la invención en un *kit* para controlar la eficacia de los procedimientos de vacunación mediante la detección de la presencia de anticuerpos protectores anti-RSV o anti-MPV. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o variantes y derivados de los mismos tal como se describen en la presente invención también pueden ser utilizados en un *kit* para controlar la producción de vacunas con la inmunogenicidad deseada.

La presente descripción también proporciona un epítomo que se une específicamente a un anticuerpo de la invención o a un fragmento de unión de antígeno del mismo para su uso (i) en terapia, (ii) en la producción de un medicamento para el tratamiento o la atenuación de la infección por RSV o MPV o tanto por RSV como por MPV, (iii) como una vacuna, o (iv) en el rastreo de ligandos que pueden neutralizar la infección por RSV o MPV o tanto por RSV como por MPV.

La presente descripción también proporciona un método para preparar un producto farmacéutico, que comprende la etapa de mezclar un anticuerpo monoclonal con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, siendo el anticuerpo monoclonal un anticuerpo monoclonal obtenido a partir de una célula huésped transfectada de la invención. Por consiguiente, los procedimientos para obtener primero el anticuerpo monoclonal (por ejemplo expresando y/o purificando el mismo) y mezclarlo después con el o los vehículos farmacéuticos pueden ser llevados a cabo en tiempos muy diferentes, por personas diferentes, en lugares diferentes (por ejemplo en países diferentes).

A partir de una célula B transformada o una célula plasmática cultivada de la invención se pueden llevar a cabo diversas etapas de cultivo, subcultivo, clonación, subclonación, secuenciación, preparación de ácido nucleico, etc. con el fin de perpetuar el anticuerpo expresado por la célula B transformada o la célula plasmática cultivada, con optimización opcional en cada etapa. En una realización, los métodos arriba indicados comprenden además técnicas de optimización (por ejemplo maduración u optimización por afinidad) aplicadas a los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo.

En todos estos métodos, el ácido nucleico utilizado en el huésped de expresión puede ser manipulado para la inserción, delección o alteración de determinadas secuencias de ácidos nucleicos. Los cambios de dicha manipulación incluyen, de forma no exclusiva, cambios para introducir sitios de restricción, para corregir el uso de codones, para añadir u optimizar secuencias reguladoras de transcripción y/o traducción, etc. También es posible cambiar el ácido nucleico para alterar los aminoácidos codificados. Por ejemplo, puede resultar útil introducir una o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Estas mutaciones puntuales pueden modificar funciones de efector, afinidad de unión de antígeno, modificaciones postraduccion, inmunogenicidad, etc., pueden introducir aminoácidos para la unión de grupos covalentes (por ejemplo marcadores) o pueden introducir marcas (por ejemplo, con fines de purificación). Las mutaciones se pueden introducir en sitios específicos o se pueden introducir de forma aleatoria, seguidas de selección (por ejemplo, evolución molecular). Por ejemplo, uno o más ácidos nucleicos codificadores de cualquiera de las regiones CDR, regiones variables de cadena pesada o regiones variables de cadena ligera de anticuerpos de la invención se pueden someter a mutación aleatoria o direccional para introducir diferentes propiedades en los aminoácidos codificados. Estos cambios pueden ser resultado de un proceso iterativo en el que se conservan cambios iniciales y se introducen nuevos cambios en otras posiciones de nucleótido. Además se pueden combinar cambios obtenidos en etapas independientes. Las diferentes propiedades introducidas en los aminoácidos codificados pueden incluir, de forma no exclusiva, una mayor afinidad.

General

Tal como se utilizan aquí, las expresiones "fragmento de unión de antígeno", "fragmento" y "fragmento de anticuerpo" se utilizan indistintamente para hacer referencia a cualquier fragmento de un anticuerpo de la invención que conserve la actividad de unión de antígeno del anticuerpo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, de forma no exclusiva, un anticuerpo de cadena simple, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv. Además, el término "anticuerpo" tal como se utiliza aquí incluye tanto anticuerpos como fragmentos de unión de antígeno de los mismos.

Tal como se utiliza aquí, un "anticuerpo neutralizador" es un anticuerpo que puede neutralizar, es decir, prevenir, inhibir, reducir, impedir o interferir con la capacidad de un patógeno para iniciar y/o perpetuar una infección en un huésped. Las expresiones "anticuerpo neutralizador" y "un anticuerpo que neutraliza" o "anticuerpos que neutralizan" se utilizan aquí indistintamente. Estos anticuerpos se pueden utilizar solos o en combinación, como agentes profilácticos o terapéuticos en una formulación apropiada, en asociación con una vacunación activa, como una herramienta de diagnóstico, o como una herramienta de producción tal como se describe aquí.

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

- 5 La palabra "esencialmente" no excluye "completamente", por ejemplo una composición que está "esencialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. En caso necesario, la palabra "esencialmente" se puede omitir de la definición de la invención.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 5\%$, o $x \pm 7\%$, o $x \pm 10\%$, o $x \pm 12\%$, o $x \pm 15\%$, o $x \pm 20\%$.

- 10 El término "enfermedad" tal como se utiliza aquí es generalmente sinónimo y se utiliza indistintamente con los términos "afección" y "estado" (como un estado de salud), ya que todos estos términos reflejan un estado anómalo del cuerpo humano o animal o de una de sus partes que afecta al funcionamiento normal, se manifiestan normalmente por signos y síntomas distintivos, y provocan una reducción de la duración o la calidad de vida del humano o animal.

- 15 Tal como se utiliza aquí, la referencia a un "tratamiento" de un individuo o paciente incluye la prevención, profilaxis, atenuación, mejoría y terapia. Los términos "individuo" o "paciente" se utilizan aquí indistintamente para hacer referencia a todos los mamíferos, incluyendo humanos. Los ejemplos de individuos incluyen humanos, vacas, perros, gatos, caballos, cabras, ovejas, cerdos y conejos. En una realización, el paciente es un humano.

Ejemplos

- 20 En los siguientes ejemplos se proporcionan ejemplos de realización de la presente invención.

Ejemplo 1. Aislamiento y caracterización de anticuerpos monoclonales a partir de células B de memoria humanas que pueden neutralizar de forma cruzada tanto RSV como MPV

- 25 A partir de un conjunto de 125 donantes de sangre se seleccionaron 7 donantes que mostraban títulos altos de anticuerpos séricos contra el RSV y el MPV. A partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) criopreservadas se clasificaron células CD22 + IgG + B, que se inmortalizaron a razón de 3 a 5 células/pocillo utilizando el virus Epstein Barr (EBV) y CpG oligodesoxinucleótido 2006 y PBMC alogénicas irradiadas como células alimentadoras. Después de 14 días se recogieron sobrenadantes de cultivo, que se analizaron en cuanto a la presencia de anticuerpos neutralizadores utilizando un ensayo de microneutralización basado en la infección de células Hep-2 por el RSV cepa A2 o de células LLC-MK2 por el
- 30 MPV cepa A1 I-PV-03/01-6621. Los sobrenadantes puros se incubaron con 50-100 TCID₅₀ de virus durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición de células diana Hep-2 o LLC-MK2, que se incubaron durante 6 y 8 días, respectivamente. Después se detectaron células viables con un espectrofotómetro añadiendo a los cultivos el reactivo WST-1 (Roche) durante 3 a 4 horas.

- 35 De tres experimentos independientes se aislaron 36 anticuerpos monoclonales (mAb) que neutralizaban el MPV (Figura 1, serie izquierda); y de cinco experimentos independientes se aislaron 136 mAb que neutralizaban el RSV (Figura 1, serie derecha). Después se llevó a cabo un rastreo secundario para analizar si los mAb aislados podían neutralizar tanto MPV como RSV. Utilizando esta estrategia se comprobó que dos mAb aislados del mismo donante (Don. 5) neutralizaban de forma cruzada tanto RSV como MPV: (i) HMB2430, que se seleccionó inicialmente sobre la base de la neutralización del RSV, y (ii) HMB3210, que se
- 40 seleccionó inicialmente sobre la base de la neutralización del MPV.

- Los genes VH y VL del HMB2430 y el HMB3210 se clonaron en vectores de expresión de IgG1 y se produjeron mAb recombinantes mediante transfección transitoria de células 293 Freestyle (293F). Después de 10 días de cultivo se recogieron sobrenadantes de células transfectadas y se purificaron IgG por afinidad mediante cromatografía de proteína A. Los dos mAb compartían la mayor parte de los fragmentos génicos V
- 45 y J (IGHV3-21*01, IGHJ4*02, IGLV1-40*01 e IGLJ1*01), de acuerdo con el análisis de homología realizado utilizando la base de datos IMG, pero se diferenciaban en las regiones N en el uso de IGHD (D3-10*01 y D5-24*01 para el HMB2430 y el HMB3210, respectivamente) y en el patrón de mutaciones somáticas y, por tanto, no se consideraron relacionados de forma clónica.

- 50 La concentración que producía la mitad de la inhibición máxima (IC₅₀) del HMB2430 y el HMB3210 se determinó utilizando el ensayo de microneutralización arriba descrito con 100 dosis infecciosas en cultivo celular 50 (TCID₅₀) de virus. Los valores IC₅₀ se calcularon por interpolación de curvas de neutralización dotadas de una regresión no lineal de 4 parámetros con una pendiente variable. Los resultados de los análisis se muestran en la Figura 2 y en la Tabla 4.

Tabla 4

Virus (grupo)	mAb IC50 (ng/ml)			
	HMB2430	HMB3210	Palivizumab	234
RSV A2 (A)	146	86	524	> 20.000
MPV 1-PV 03/01-6621 (A1)	393	52	> 20.000	7

Ejemplo 2. Amplitud de reactividad a todos los grupos y subgrupos de RSV y MPV

Con el fin de evaluar la amplitud de reactividad del HMB2430 y el HMB3210, se analizaron mAb purificados mediante FACS en cuanto a la unión con células Hep-2 infectadas por RSV o con células LLC-MK2 infectadas por MPV utilizando las siguientes cepas de RSV y MPV: RSV A2 (A, 1961 Australia; A/A2/61), RSV Long (A, Maryland EE.UU., 1956; A/Long/56), RSV Randall (A, Chicago EE.UU., 1958; A/Randall/58), RSV 9320 (B, Massachusetts EE.UU., 1977; B/9320/77), WV/14617/85 (B, Huntington West Virginia, 1985; B/14617/85), 18537 (B, Washington District of Columbia EE.UU., 1962; B/18537/62), MPV I-PV-03/01-6621 (A1, Pavia IT, 2001; A1/6621/01), MPV I-PV-02/06-8938 (A2, Pavia IT, 2006; A2/8938/06), I-PV-03/04-4702 (B1, Pavia IT, 2004; B1/4702/04) e I-PV-02/04-3817 (B2, Pavia IT, 2004; B2/3817/04). Paralelamente se analizaron tres mAb previamente descritos: (i) motavizumab, específico del RSV; (ii) mAb 234, específico del MPV; y (iii) FO32, específico de la influenza A (utilizado como control negativo). Todos los mAb se analizaron en cuanto a la unión con células infectadas o no infectadas a razón de 10 µg/ml. El HMB2430 y el HMB3210 reaccionaron con las 6 cepas del RSV y las 4 cepas del MPV analizadas, representativas de los grupos y subgrupos conocidos del RSV y el MPV (Tabla 5). En cambio, el motavizumab reaccionó con las 6 cepas del RSV analizadas, pero no reaccionó con ninguna de las 4 cepas del MPV analizadas. Por el contrario, el mAb 234 reaccionó con las cuatro cepas del MPV analizadas pero no reaccionó con ninguna de las 6 cepas del RSV analizadas.

Tabla 5 Tinción de células Hep-2 o LLC-MK2 infectadas con diferentes cepas del RSV o el MPV, respectivamente, mediante FO32 (control negativo), motavizumab, 234, HMB 2430 y HMB3210, según medida por citometría de flujo.

	Anticuerpo monoclonal (10 µg/ml)				
	FO32	Motavizumab	mAb 234	HMB2430	HMB3210
RSV A/A2/61	-	+	-	+	+
RSV A/Long/56	-	+	-	+	+
RSV A/Randall/58	-	+	-	+	+
RSV B/18537/62	-	+	-	+	+
RSV B/14617/85	-	+	-	+	+
RSV B/9320/77	-	+	-	+	+
MPV A1/6621/01	-	-	+	+	+
MPV A2/8938/06	-	-	+	+	+
MPV B1/4702/04	-	-	+	+	+
MPV B2/3817/04	-	-	+	+	+
Mock LLC-MK2	-	-	-	-	-
Mock Hep-2	-	-	-	-	-

(-) <5% de células teñidas; (+) > 50% de células teñidas

Ejemplo 3. Unión de proteína F recombinante de RSV y MPV mediante ELISA y mediante tinción de células transfectadas

Con el fin de identificar el antígeno diana reconocido por HMB2430 y HMB3210 en virus RSV y MPV, los dos mAb se analizaron, en paralelo con motavizumab y mAb 234, en cuanto a su capacidad para unirse a proteína F soluble homotrímica del RSV (cepa A2) producida a partir de células 293F transfectadas transitoriamente. Tal como se muestra en la Figura 3, tanto HMB2430 como HMB3210 reaccionaron específicamente con proteína F del RSV mediante ELISA y mostraron un perfil de unión distinto en comparación con el motavizumab. Además, el HMB2430 y el HMB3210 produjeron una tinción intracelular de células 293F transfectadas transitoriamente con vectores de expresión de mamífero que codifican la longitud completa de la proteína F bien del RSV (cepa A2), bien del MPV (cepa NL/1/99 B1) (Tabla 6), lo que indica que el HMB2430 y el HMB3210 reconocen un epítipo compartido presente en proteínas F tanto de RSV como de MPV. Este descubrimiento es particularmente llamativo teniendo en cuenta que las proteínas F de RSV y MPV solo tienen un 33-35% de identidad de la secuencia de aminoácidos. Como era de esperar, el palivizumab y el motavizumab se unen a células que expresan la proteína F de RSV, pero no a aquellas que expresan la proteína F de MPV (Tabla 6). Por lo contrario, el mAb 234 se une a células que expresan la proteína F de MPV, pero no a células que expresan la proteína F de RSV (Tabla 6).

Tabla 6 Tinción de células 293F no transfectadas o de células 293F transfectadas con proteína F de RSV o MPV, según medida por citometría de flujo

Anticuerpo (10 µg/ml)	293F + RSV F (A/A2/61; A)	293F + MPV F (NL/1/99; B1)	293F no transfectadas
HMB3210	+	+	-
HMB2410	+	+	-
Palivizumab	+	-	-
Motavizumab	+	-	-
234	-	+	-
(-) <5% de células teñidas; (+) > 50% de células teñidas			

Ejemplo 4. Mapeo de epítomos utilizando un ensayo de unión de inhibición en células infectadas por RSV

Con el fin de comprender mejor el epítipo de proteína F reconocido por el HMB2430 y el HMB3210, se estableció una inhibición del ensayo de unión utilizando células Hep-2 infectadas por RSV cepa A2. El siguiente conjunto de mAb específicos de proteína F de RSV se compraron o produjeron mediante síntesis genética: (i) motavizumab, específico para el sitio antigénico II; (ii) 101F, específico para el sitio antigénico IV; (iii) D25 de especificidad indefinida; (iv) 131-2a, específico para el sitio antigénico I. Los mAb se marcaron con biotina y se analizaron en cuanto a la unión con células Hep-2 infectadas para determinar la concentración óptima de mAb requerida para alcanzar un 70-80% de unión máxima. Después, los mAb marcados con biotina se utilizaron como sondas para evaluar si su unión (medida utilizando estreptavidina conjugada con fluoróforo) se inhibía mediante la preincubación de células infectadas por RSV A2 con un factor 50 de exceso de mAb no marcados homólogos u heterólogos. Como era de esperar, la unión de HMB2430 marcado con biotina se bloqueó mediante la preincubación de las células con HMB2430 no marcado, pero también se bloqueó parcialmente mediante HMB3210 no marcado (Figura 4). En cambio, la unión de todos los demás mAb marcados con biotina analizados no se impidió mediante la preincubación con HMB2430 o con HMB3210 (Figura 4). En conjunto, estos resultados indican que el HMB2430 y el HMB3210 reconocen epítomos parcialmente solapados en la proteína F compartidos en RSV y MPV, y que estos epítomos son diferentes a los epítomos en el sitio antigénico II de la proteína F (reconocido por motavizumab y palivizumab), el sitio antigénico IV (reconocido por mAb 101F), y el sitio antigénico I (reconocido por mAb 131-2A). Además, los epítomos reconocidos por los mAb HMB2430 y HMB3210 en la proteína F de RSV son diferentes al epítipo desconocido reconocido por el mAb D25.

Ejemplo 5. Reactividad de anticuerpos monoclonales con las proteínas F de RSV y de MPV bajo condiciones reductoras y no reductoras

Con el fin de confirmar adicionalmente el descubrimiento de que el HMB2430 y el HMB3210 reconocen la proteína F tanto de RSV como de MPV, los dos mAb se analizaron en cuanto a su capacidad para teñir proteínas F de RSV y MPV en Western blot. Unas células Hep-2 se infectaron con RSV y unas células LLC-MK2 se infectaron con MPV, se sometieron a lisis con un detergente suave y se pasaron sobre gel SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras. Las proteínas se transfirieron después sobre una membrana de PVDF, que luego se incubó con HMB2430, HMB3210, motavizumab o mAb 234. La unión de mAb se detectó con un anticuerpo conjugado de HRP antihumano en combinación con el reactivo de detección Western Blot ECL. El HMB2430 y el HMB3210 se unieron a proteína F derivada de células infectadas por el RSV (Figura 5) y células infectadas por MPV (Figura 6) bajo condiciones no reductoras. El mAb 234 específico de MPV (que reconoce un epítipo en la proteína F de MPV que corresponde al sitio antigénico II en proteína F de RSV) se unió a la proteína F de MPV bajo condiciones no reductoras, pero no se unió a la proteína F de RSV. En cambio, el mAb específico del RSV motavizumab se unió a la proteína F de RSV tanto bajo condiciones reductoras como bajo condiciones no reductoras, confirmando el reconocimiento de un epítipo lineal en gran medida. Estos resultados sugieren que, a diferencia del motavizumab y el palivizumab, el HMB2430 y el HMB3210 reconocen epítomos conformacionales que también dependen de la presencia de enlaces de disulfuro entre residuos de aminoácidos en las proteínas F de RSV y de MPV.

Ejemplo 6. Neutralización de todos los grupos y subgrupos de RSV y MPV mediante HMB2430 y HMB3210

Se analizaron mAb HMB2430 y HMB3210 purificados en cuanto a su capacidad para neutralizar la infección por RSV o MPV de células Hep-2 o LLC-MK2, respectivamente. Se analizaron las siguientes cepas del RSV y el MPV: RSV A2 (A, 1961 Australia; A/A2/61), RSV Long (A, Maryland EE.UU., 1956; A/Long/56), RSV Randall (A, Chicago EE.UU., 1958; A/Randall/58), RSV 9320 (B, Massachusetts EE.UU., 1977; B/9320/77), WV/14617/85 (B, Huntington West Virginia, 1985; B/14617/85), 18537 (B, Washington District of Columbia EE.UU., 1962; B/18537/62), RSV 9727/2009 (B, Pavia IT, 2009; B/9727/09), RSV 9736/2009 (B, Pavia IT, 2009; B/9736/09), RSV 9847/2009 (B, Pavia IT, 2009; B/9847/09), MPV I-PV-03/01-6621 (A1, Pavia IT, 2001; A1/6621/01), MPV I-PV-02/06-8938 (A2, Pavia IT, 2006; A2/8938/06), I-PV-02/06-8908 (A2, Pavia IT, 2006;

A2/8908/06), I-PV-02/06-8909 (A2, Pavia IT, 2006; A2/8909/06), I-PV-03/04-4702 (B1, Pavia IT, 2004; B1/4702/04) e I-PV-02/04-3817 (B2, Pavia IT, 2004; B2/3817/04).

- 5 En el mismo experimento, el HMB2430 y el HMB3210 se compararon con palivizumab (específico de RSV) y mAb 234 (específico de MPV). El HMB3210 neutralizó las 11 cepas de RSV y las 6 cepas de MPV analizadas, representativas de los grupos y subgrupos conocidos del RSV y el MPV (Tabla 7). El HMB2430 neutralizó las 11 cepas de RSV analizadas y todas las cepas de MPV A1 y A2 analizadas, pero no las cepas de MPV B1 o B2 analizadas. Como era de esperar, el palivizumab neutralizó las 11 cepas de RSV analizadas, pero ninguna de las 6 cepas de MPV analizadas, mientras que el mAb 234 neutralizó las 6 cepas de MPV analizadas, pero ninguna de las 11 cepas de RSV analizadas.
- 10 El HMB3210 y el HMB2430 neutralizaron potentemente las 11 cepas de RSV analizadas (valores IC50 medios, 0,070 y 0,133 µg/ml, respectivamente). Estos valores eran de promedio 5,4 y 2,6 veces mayores que el valor IC50 del palivizumab (0,284 µg/ml). El HMB3210 neutralizó potentemente las 6 cepas de MPV analizadas (valor IC50 medio 0,113 µg/ml), que es de promedio 1,7 veces menor que el valor IC50 del 234 (0,046 µg/ml).

15 **Tabla 7 Neutralización de cepas de RSV y MPV**

Virus	Neutralización IC50 (µg/ml)			
	Palivizumab	mAb 234	HMB2430	HMB3210
RSV A/A2/61	0,617	-	0,350	0,184
RSV A/Long/56	0,599	-	0,361	0,187
RSV A/Randall/58	0,440	-	0,179	0,116
RSV A/9846/09	0,283	-	0,123	0,06
RSV A/9835/09	0,284	-	0,076	0,063
RSV B/18537/62	0,143	-	0,094	0,034
RSV B/14617/85	0,129	-	0,096	0,038
RSV B/9727/09	0,275	-	0,084	0,051
RSV B/9320/77	0,069	-	0,021	0,012
RSV B/9736/09	0,092	-	0,027	0,007
RSV B/9847/09	0,209	-	0,053	0,026
MPV A1/6621/01	-	0,040	0,744	0,071
MPV A2/8938/06	-	0,044	1,049	0,045
MPV A2/8908/06	-	0,057	2,795	0,066
MPV A2/8909/06	-	0,012	0,161	0,007
MPV B1/4702/04	-	0,019	-	0,029
MPV B2/3817/04	-	0,106	-	0,465

Ejemplo 7. Falta de selección de mutantes de escape virales de RSV y MPV

- Se analizaron el HMB3210, el palivizumab y el mAb 234 en cuanto a su capacidad para seleccionar mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales (MARM) de RSV y de MPV *in vitro*. A pesar de varios intentos, el HMB3210 no logró seleccionar ninguno de los MARM de RSV o de MPV cuando se analizó contra 32x10⁶ RSV A/Long/58 TCID50 y contra 16x10⁶ MPV A1/6621/01 TCID50. Por lo contrario, el palivizumab seleccionó MARM con alta frecuencia (se aislaron en total 85 MARM de palivizumab independientes a partir de una entrada de 16x-10⁶ RSV A/Long/58 TCID50, que correspondían a una frecuencia de 1 en 185.000 TCID50). Bajo las mismas condiciones experimentales, el mAb 234 no seleccionó ningún MARM del MPV. La dificultad para aislar MARM de mAb 234 es coherente con el informe de Ulbrandt et al. (J General Virol 2008), que mostraba que se requería un alto nivel de virus para aislar una pequeña cantidad de MARM. Los virus escapados se mapearon en una mutación K242N utilizando la cepa clínica NL/1/99 MPV B1. Se recogieron MARM de palivizumab (PZ-MARM) independientes y se secuenció por completo la proteína F de 10 de ellos (Tabla 8). PZ-MARM2, PZ-MARM3, PZ-MARM4, PZ-MARM5, PZ-MARM6, PZ-MARM8 y PZ-MARM10 compartían las mismas dos mutaciones de aminoácidos (P101S/K272T); el PZ-MARM1 también tenía dos mutaciones de aminoácidos en la misma posición, pero con un cambio de aminoácidos diferentes (P101S/K272Q); el PZ-MARM7 tenía una mutación de aminoácidos simple (K272N), de nuevo en la posición 272; por último, el PZ-MARM9 tenía una mutación en común con otros PZ-MARM y una sola mutación en la posición 262 (P101S/N262Y). Ya se habían descrito mutaciones puntuales en esta región (posiciones de nucleótido 827 y 828) (Zhao et al. Virology 2004), que resultaban en dos cambios de aminoácidos diferentes en la posición 272 (K272Q y K272M). La primera mutación (es decir K272Q) también estaba presente en el PZ-MARM1 aquí descrito. Los virus que portaban estas mutaciones puntuales eran completamente resistentes a los efectos profilácticos del palivizumab en ratas alodóneras (Zhao et al. Virology 2004), y ya se habían descrito las mismas mutaciones junto con otras en ratas alodóneras inmunosuprimidas infectadas por el RSV y tratadas profilácticamente con palivizumab.

Después se analizaron el HMB3210, el HMB2430 y el palivizumab en cuanto a su capacidad para neutralizar la infección por PZ-MARM6 de células Hep-2. Mientras que el palivizumab no neutralizaba el PZ-MARM6, el HMB3210 y el HMB2430 neutralizaban potencialmente este virus hasta niveles comparables a los observados con el virus correspondiente de tipo silvestre (Figura 7).

- 5 En conjunto, estos resultados demuestran que el HMB3210 y el HMB2430 no seleccionaban MARM de RSV o MPV *in vitro*. Estos resultados son coherentes con la noción de que los epítodos diana reconocidos por el HMB3210 y el HMB2430 están extremadamente conservados y que las mutaciones que anulan la unión de anticuerpos son extremadamente raras o pueden estar asociadas con una pérdida de capacidad de replicación viral.

10 **Tabla 8 Variaciones de aminoácidos en MARM de RSV seleccionados con palivizumab**

	Posición de aa (posición de nucleótido)				
	101 (314)	262 (797)	272 (827)	272 (828)	272 (829)
RSV A/Long/56	P	N	K	K	K
PZ-MARM1	S (C a T)		Q (A a C)		
PZ-MARM2	S (C a T)			T (A a C)	
PZ-MARM3	S (C a T)			T (A a C)	
PZ-MARM4	S (C a T)			T (A a C)	
PZ-MARM5	S (C a T)			T (A a C)	
PZ-MARM6	S (C a T)			T (A a C)	
PZ-MARM7	P				N (G a T)
PZ-MARM8	S (C a T)			T (A a C)	
PZ-MARM9	S (C a T)	Y (A a T)			
PZ-MARM10	S (C a T)			T (A a C)	

Ejemplo 8. La supresión de un sitio de glicosilación en la LCDR3 no afecta a la actividad del HMB3210

Una cadena ligera variable del HMB3210 tiene un motivo de N-glicosilación (NxS/T, donde x puede ser cualquier aminoácido excepto prolina) en la LCDR3 de la posición 113 (numeración IMGT). La asparagina en la posición 113 (N113) sustituye a una serina presente en la secuencia de la línea germinal. La presencia de motivos de glicosilación en la región variable puede tener un impacto positivo o negativo en la actividad de anticuerpos y se reconoce como una causa de heterogeneidad de anticuerpos. La presencia de un glicano en la cadena ligera del HMB3210 se evaluó en un gel SDS-PAGE reductor después de una incubación en presencia o ausencia de la N-glicosidasa PNG-asa F (Figura 8). Este análisis indicaba que de hecho una parte minoritaria de la cadena ligera está glicosilada. Después se suprimió el residuo N113 y se restauró el residuo de serina codificado de línea germinal correspondiente. En paralelo, también se suprimió otra mutación somática en la región de marco -1 de la cadena ligera (P7T) para restaurar el residuo de prolina codificado de línea germinal en la posición 7 (numeración IMGT en el gen IGLV1 -40*02 g correspondiente). Después se produjo una nueva variante del HMB3210 (denominada HMB3210v3) formada por una cadena pesada de HMB3210 VH.2 (SEQ ID 17) y una cadena ligera de HMB3210 VL.3, que se analizó en cuanto a su actividad neutralizadora contra cepas RSV A2 y MPV I-PV 03/01-6621 en paralelo con el HMB3210v2 (formado por una cadena pesada de HMB3210 VH.2 (SEQ ID N°: 17) y una cadena ligera VL SEQ ID N°: 14). Esta variante (HMB3210v3) mostraba una neutralización ligeramente mejorada tanto contra las cepas de RSV como contra las cepas de MPV analizadas (Figura 9), demostrando de este modo que la supresión del sitio de glicosilación de cadena ligera no afecta a la unión con epítodos diana del RSV y MPV. Después, las dos variantes de anticuerpo se analizaron en paralelo contra un conjunto de virus RSV y MPV y demostraron tener actividades comparables contra todos los virus analizados (Figura 10). En conclusión, el HMB3210v3 no está glicosilado en la cadena ligera variable y en general está poco mutado en comparación con los genes de cadena pesada y ligera de la línea germinal que solo tienen 8 mutaciones somáticas de aminoácidos en la cadena pesada y 4 en la cadena ligera: S58A (HCDR2), I65S (HCDR2), Y66D (HFR3), V71A (HFR3), N85T (HFR3), Y88F (HFR3), V101I (HFR3), Y103F (HFR3), G56D (LCDR2), S65N (LCDR2), G78A (LFR3) y S109R (LCDR3) (todas las posiciones se indican de acuerdo con la numeración IMGT).

Ejemplo 9. La reactividad cruzada del HMB3210 y el HMB2430 con MPV depende de mutaciones somáticas

Con el fin de comprender mejor el papel de mutaciones somáticas en la reactividad cruzada del HMB2430 y el HMB3210 contra RSV y MPV, se sintetizaron las versiones de línea germinal de los dos mAb y se analizaron en cuanto a su capacidad para neutralizar las cepas RSV A2 y MPV I-PV 03/01-6621. Los dos mAb de línea germinal del HMB2430 y del HMB3210 (HMB2430-GL y HMB3210-GL, respectivamente) se produjeron de VH.3 y VL.2 en el caso del HMB2430-GL y de VH.3 y VL.4 en el caso del HMB3210-GL. Las dos formas de línea germinal de los mAb neutralizaron eficientemente el RSV hasta niveles comparables a los observados con el HMB3210 y el HMB2430 mutados somáticamente originales (Figura 11). Sin embargo, el HMB3210-GL y el HMB2430-GL no neutralizaron el MPV, lo que indica que para la neutralización del MPV

son indispensables mutaciones somáticas. Para entender además si tanto las mutaciones somáticas de cadena pesada como las de cadena ligera son responsables de la neutralización del MPV, se produjeron anticuerpos que portaban bien la cadena pesada, bien la cadena ligera, en la configuración de línea germinal: HMB2430-VHGL-VLSM formado por VH.3 y VL; HMB2430- VHSM-VLGL formado por VH.2 y VL.2; HMB3210-VHGL-VLSM formado por VH.3 y VL; HMB3210-VHSM-VLGL formado por VH.2 y VL.4. La supresión de mutaciones somáticas en la cadena pesada del HMB3210 no afectó a la neutralización de virus RSV o MPV, mientras que la supresión de mutaciones somáticas en la cadena pesada del HMB2430 afectó a la neutralización del MPV, aunque manteniendo la neutralización del RSV. La supresión de mutaciones somáticas en la cadena ligera tanto del HMB2430 como del HMB3210 anuló la neutralización del MPV, mientras que no afectaron a la neutralización del RSV (Figura 11). En conjunto, estos resultados indican que el HMB3210 y el HMB2430 fueron seleccionados inicialmente por el RSV y posteriormente desarrollaron, a través de la acumulación de mutaciones somáticas, reactividad cruzada contra el MPV. En total solo 3 mutaciones somáticas en las CDR de cadena ligera responde de la adquisición de reactividad cruzada contra el MPV en un anticuerpo de línea germinal específico del RSV. Se ha de señalar que el HMB2430 y el HMB3210 (no relacionados de forma clónica) comparten la misma mutación somática en las LCDR3 S a R en la posición 109.

Ejemplo 10. Reconocimiento de HMB3210 de conformaciones de proteína F prefusión y postfusión

Un constructo de ADN codificador de residuos F del RSV 26-136 y 147-512 (correspondiente al ectodominio F sin el péptido de fusión de la cepa A2 del RSV) con una marca de histidina C-terminal se optimizó en codones y se sintetizó. Se expresó F recombinante utilizando un vector de expresión de baculovirus en células Sf21 y se purificó a partir del sobrenadante mediante afinidad de níquel y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Una construcción similar ya había sido utilizada por otros (Swanson et al. PNAS 2011 y McLellan et al. J Virol 2011) para resolver la estructura cristalina de la proteína F postfusión. La proteína se analizó bajo condiciones no reductoras sobre un gel SDS-PAGE y dio como resultado una banda a \approx 65-70 kDa y, cuando se analizó mediante SEC en una columna S200, la proteína F del RSV "postfusión" se eluyó como un pico simétrico con un peso molecular aparente de \approx 150 kDa, que corresponde al peso molecular de la proteína F trimérica y se solapa con el volumen de elución de anticuerpos de IgG1 humana. La proteína F "postfusión" se incubó bien con HMB3210, bien con palivizumab, y las dos mezclas se pasaron por una columna S200. La incubación de la proteína F "postfusión" con palivizumab cambió el pico de elución a un volumen de elución menor (correspondiente a un peso molecular aparente de \approx 300 kDa) en comparación con la proteína F sola, lo que indica que el palivizumab se unió a la proteína F "postfusión", tal como ya se ha indicado. Se ha de señalar que la incubación del HMB3210 con proteína F "postfusión" no produjo ningún cambio del volumen de elución (Figura 12). El hecho de que el HMB3210 y la proteína F "postfusión" se eluyan como moléculas independientes indican que el HMB3210, a diferencia del palivizumab, no se une a la proteína F "postfusión".

Después se sintetizó una forma estabilizada de la proteína F del RSV prefusión de longitud completa siguiendo la estrategia adoptada por Magro et al. PNAS 2012 mediante sustitución de los 4 residuos de aminoácidos (L481, D489, S509 y D510) con cisteínas y sustitución de los 9 residuos de aminoácidos básicos (R106, R108, R109, K131, K132, R133, K134, R135 y R136) en los dos sitios de escisión de la proteína F con residuos N para cortar los sitios de escisión de furina. La secuencia de la proteína F se modificó adicionalmente mediante la inserción de un sitio de escisión TEV detrás de la región transmembrana, seguido de GFP y marca 6-His en el extremo C para facilitar la purificación. Las 4 cisteínas introducidas se posicionaron, de acuerdo con la estructura F prefusión PIV-5, de un modo que la formación de enlaces de disulfuro intermonoméricos solo era posible cuando la proteína F estaba en la conformación prefusión, pero no cuando estaba plegada en la estructura postfusión, posibilitando así la estabilización de la proteína F prefusión. La proteína F prefusión estabilizada fue descrita por Magro et al. como heterogénea, ya que también contiene una proporción de moléculas en las que los residuos de cisteína adicionales no presentaban enlaces de disulfuro. La construcción de proteína F aquí descrita se produjo utilizando un vector de expresión baculovirus en células Sf21, solubilizado a partir de membranas celulares con un detergente suave y purificado mediante afinidad de níquel y cromatografía de exclusión por tamaño. La proteína F prefusión purificada se analizó mediante SEC en una columna S200 y se eluyó como un pico simétrico de un peso molecular aparente de \approx 150 kDa que corresponde al peso molecular de la proteína F trimérica y se solapa con el volumen de elución de la IgG1 humana. La incubación de la proteína F prefusión con palivizumab cambió el pico de elución a un volumen de elución menor (correspondiente a un peso molecular aparente de \approx 300 kDa) en comparación con la proteína F sola y también indujo la formación de un complejo de alto peso molecular que se eluyó en el volumen vacío de la columna que podría estar relacionado con la formación de agregados más grandes. También se observó un cambio similar en el volumen de elución cuando el HMB3210v2 se incubó con la proteína prefusión (Figura 13). Estos resultados indican que el palivizumab se une tanto a la forma prefusión como a la forma postfusión de la proteína F, mientras que el HMB3210 reconoce selectivamente la forma prefusión de la proteína F. Las dos proteínas F (formas prefusión y postfusión) también se analizaron mediante resonancia en plasmón de superficie (SPR). El palivizumab se unió tanto a la proteína prefusión como a la proteína postfusión con afinidades similares, mientras que el

HMB3210v3 se unió selectivamente a la proteína F prefusión con alta afinidad (constante Kd de 0,1 nM en comparación con la Kd del palivizumab de 2 nM) (Figura 14).

Ejemplo 11. El HMB3210v3 neutraliza de forma cruzada dos paramixovirus animales, el virus respiratorio sincitial bovino (BRSV) y el virus de la neumonía del ratón (PVM)

- 5 La amplitud de la reactividad del HMB3210 se evaluó también en otros dos paramixovirus animales: BRSV y PVM, dos virus que comparten con el RSV un 81% y un 40% de identidad de aminoácidos en la proteína F, respectivamente. El HMB3210 se analizó en cuanto a su capacidad para neutralizar la cepa 15 del PVM y la cepa RB94 del BRSV y demostró ser eficaz contra estos virus con valores IC50 de 100 ng/ml y 10 ng/ml, respectivamente. Estos resultados indican que, además de los paramixovirus humanos RSV y MPV, el
10 HMB3210 es también eficaz contra otros dos virus de la familia *paramyxoviridae*.

Ejemplo 12. Inhibición de la propagación viral por HMB3210

- También se midió la capacidad del HMB3210 y del anticuerpo D25 específico del RSV para prevenir la propagación viral célula a célula, que había sido descrita como una propiedad distinta de anticuerpos anti-RSV independiente de la actividad neutralizadora. Se infectaron células Hep-2 con cepas A o B de RSV.
15 Veinte horas después se añadieron diferentes concentraciones de anticuerpos y el día 3 se examinó la formación de sincitios para determinar el 50% de concentración de anticuerpos que inhibe la propagación viral, definida aquí como IS50. Los dos anticuerpos fueron capaces de inhibir la propagación viral, pero en concentraciones más altas. De manera interesante, en este ensayo el HMB3210 mostró una IS50 comparable a la del anticuerpo neutralizador más potente D25 (Figura 15).

20 Ejemplo 13. Eficacia profiláctica y terapéutica del HMB3210 contra RSV, MPV y PVM

- En los modelos de RSV en ratones, el HMB3210 fue de promedio de cinco a diez veces más potente que el palivizumab en la reducción de los títulos de RSV en pulmón y fue eficaz en concentraciones tan bajas como 0,12 mg/kg (Figura 16a). En el modelo de MPV en ratones, el HMB3210 tuvo una eficacia comparable (Figura 16b). Con el fin de analizar el potencial terapéutico del HMB3210, a unos ratones con deficiencia de STAT1
25 se les infectó con RSV y se les administró HMB3210 el día 1, 2 o 3 después de la infección. A pesar de la limitación de este modelo, debido a la mala replicación del virus, el HMB3210 mostró eficacia terapéutica en todos los momentos y redujo los títulos virales y las citoquinas inflamatorias en los pulmones (Figura 17).

- Con el fin de analizar el HMB3210 en un modelo animal más pertinente de infección aguda del tracto respiratorio inferior, se aprovechó su reactividad cruzada con el PVM, un virus que causa una enfermedad
30 letal en ratones después de un inóculo muy bajo y resume las características de la infección grave por el RSV y el MPV en humanos. En un entorno profiláctico, el HMB3210 proporcionó una protección completa de los ratones contra la letalidad en una dosis de 0,12 mg/kg y contra la pérdida de peso en una dosis de 0,6 mg/kg (Figura 18a). Además, en un entorno terapéutico, el HMB3210 proporcionó una protección completa contra la letalidad al ser administrado hasta 3 días después de la infección, tanto en una dosis de 30 mg/kg como en una dosis de 5 mg/kg, y confirió una protección significativa al ser administrado el día 4 o 5 en una dosis de 30 mg/kg (Figuras 18b-d). En este sistema, la ribavirina, que es el único patrón de atención aprobado para
35 terapia en humanos, tal como se ha descrito anteriormente (Bonville et al., 2004, Journal of Virology 78: 7984-7989), fue ineficaz. De forma importante, la administración terapéutica de HMB3210 bloqueó eficientemente el aumento del ARN viral en el pulmón (Figura 19). Para evaluar la función de mecanismos de efector *in vivo*, se comparó el HMB3210 de IgG1 con un mutante que carece de complemento y de unión de receptor de Fc (HMB3210-LALA). Los dos anticuerpos se compararon en cuanto a la actividad neutralizadora *in vitro* y demostraron ser equivalentes. Cuando se administró en cantidades limitativas en un entorno profiláctico (0,12 mg/kg), el HMB3210-LALA mostró una eficacia muy reducida (Figura 20a). En cambio, cuando se utilizó en un entorno terapéutico, el HMB3210-LALA fue tan eficaz como el HMB3210 en todas las dosis analizadas
40 (Figura 20b). La eficacia terapéutica del HMB3210 en el modelo de infección por PVM, en el que la ribavirina no es eficaz, se puede deber a una combinación de factores, tales como la potente actividad de neutralización e inhibición de la propagación, el reconocimiento selectivo de la proteína de fusión que evita el consumo del anticuerpo por las abundantes proteínas postfusión que actúan como señuelos, y el fallo en la selección de mutantes de escape. Sorprendentemente, la eficacia terapéutica del HMB3210 en el modelo de
45 PVM en ratones no requiere funciones de efector, lo que sugiere que la actividad de anticuerpo *in vivo* depende principalmente de la neutralización viral y de la inhibición de la propagación viral.

Ejemplo 14. El HMB3210 se une a una cadena beta altamente conservada en la proteína F prefusión, que no es accesible en la proteína F postfusión.

- 55 Para identificar el epítipo reconocido por el HMB3210, se rastreó una biblioteca de 7.095 péptidos estructurados que cubre la secuencia completa de la proteína F de RSV humano. Los experimentos presentados en el ejemplo 5 mostraron que el HMB3210 reaccionaba en Western blot con proteínas F de

RSV y MPV bajo condiciones no reductoras, sugiriendo que el HMB3210 se dirige a un epítipo cuya conformación es estable en presencia del detergente aniónico SDS (Figuras 5 y 6). La estrategia de rastreo de biblioteca condujo a la identificación de un epítipo de HMB3210 putativo en la región N-terminal de F2, que abarca los residuos SAVSKGYLSALRTGWYTSVIT (SEQ ID N°: 63). La secuencia de núcleo en esta región, YLSALRTGW (SEQ ID N°: 64), está altamente conservada entre RSV, MPV, BRSV y PVM (Figura 21), donde las variantes YLSVLRTGW (SEQ ID N°: 65), YF- SALRTGW (SEQ ID N°: 66), YFSLVLRGW (SEQ ID N°: 67), YKSALRTGW (SEQ ID N°: 68) e YKSVLRTGW (SEQ ID N°: 69) también son reconocidas por el HMB3210. Esta secuencia no está expuesta sobre la superficie de la proteína F postfusión del RSV, pero, en un modelo de la proteína F prefusión del RSV construido alrededor de la estructura de proteína F del PIV5 (Yin, et al., 2006, Nature 439: 38-44), se espera que se sitúe en una cadena beta expuesta cerca de la región de bucle a la que se dirige el palivizumab (Figura 22). Este mapeo es coherente con la especificidad del HMB3210 para la proteína F prefusión mostrada en el ejemplo 10. Este epítipo es cercano, pero diferente al reconocido por el palivizumab, y está centrado alrededor de la secuencia YLSVLRTGW, que está altamente conservada entre 551 cepas víricas, incluyendo las cepas 364 HRSV, 162 HMPV, 8 BRSV y 5 PVM (Figura 23).

Tabla de secuencias y números de SEQ

SEQ ID N°	Descripción Description	Secuencia Sequence
1	CDRH1 aa	GFTFSSYS
2	CDRH2 aa	ISASSSYS
3	CDRH3 aa	ARARATGYSSITPYFDI
4	CDRL1 aa	SSNIGAGYD
5	CDRL2 aa	DNN
6	CDRL3 aa	QSYDRNLSGV
7	CDRH1 nuc	ggattcaccttcagtagttatagc
8	CDRH2 nuc	attagtcaagtagcagttacagc
9	CDRH3 nuc	gcgagagctcgggcaactggctacagttccattaccccctactttgacatt
10	CDRL1 nuc	agctccaacatcggggcaggttatgat
11	CDRL2 nuc	gataacaac
12	CDRL3 nuc	cagtcctatgacaggaacctgagtggtgc
13	cadena pesada aa	EEQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP GKGLEWVSSISASSYSYADSAKGRFTISRDNAKTSLFLQM NSLRAEDTAIFYCARARATGYSSITPYFDIWGQGLVTVSS
14	cadena ligera aa	QSVVTQTPSVSGAPGQRVTISCTGSSNIGAGYDVHWYQQLP GTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSASKSGTSASLAITGLQAEDE ADYYCQSYDRNLSGVFVGTGKVTVL
15	cadena pesada nuc	gaggaaacagctgctagagctcggggaggcctggcgaagcctgggggctcctgagactctcctgtgagcctcctggattcaccttcagtagttatagcatgaactgggtccgccaggtccagggaa ggggctggagtggtctcatcattagtcgaagtagcagttacagcgattacgcagactcagcg aagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagacctcactgtttctgcaaatgaacagcct gagagccgaggacagcgtatctattctgtgcgagagctcgggcaactggctacagttccatta cccctactttgacattggggccagggcaacctggcaccgtctcctcag

16	cadena ligera nuc	cagtctgtcgtgacgcagacgccctcagtgtctggggccccagggcagagggtcaccatctctgcactgggagcagctccaacatcggggcaggttatgatgtacactgggtaccagcaactccagg aacagccccaaactcctcatctatgataacaacaatcgacctcaggggtcccggaccgattctctgcctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcaccgggctccaggctgaggatgaggctgattactgccagtcctatgacaggaacctgagtgggtgtcttcggaactgggaccaaggtcac cgtcctag
17	cadena pesada aa	EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFSSYS MNWVRQAP GKGLEWVSSISASSSYSDYADSAKGRFTISRDN AKTSLFLQM NSLRAEDTAIFYCARARATGYSSITPYFDI WGQGLTVSS
18	cadena pesada nuc	gaggtgcagctggaggagtctgggggagggcctggcaagcctggggggtccctgagactctctgtgcagcctctggattcacctcagtagttatagcatgaactgggtccggcaggctccagggaa ggggctggagtgggtctcatccattagtgcaagtagcagttacagcgattacgcagactcagcg aagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagacctcactgtttctgcaaatgaacagcct gagagccgaggacagggctatctattctgtgcgagagctcgggcaactggctacagttcatta cccctacttgacattggggccagggaacctggtcaccgtctcctag
19	CDRH1 aa	GFAFTGYG
20	CDRH2 aa	ITAGSSYI
21	CDRH3 aa	ARVASPLVRGLHLDY
22	CDRL2 aa	AND
23	CDRL3 aa	QSYDRTL SVV
24	CDRH1 nuc	ggattcgattcactggttatggt
25	CDRH2 nuc	atcactgctggaagctcatacatc
26	CDRH3 nuc	gcgagagttgcgtctcctctgggtcggggactccacttagactac
27	CDRL2 nuc	gctaacgac
28	CDRL3 nuc	cagtcctatgaccgcacctgagttagtg
29	cadena pesada aa	EVH L VESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFAFTGYGLN WVRQVP GKGLEWVSSITAGSSYIDYAESVKGRFTISRDN GNKNTLFLQM SDLRADDTA VYYCARVASPLVRGLHLDYWGQ GALVTVSS
30	cadena ligera aa	QSVLTQPPSMGAPGQRVTISCTGGSSNIGAGYDVQWYQQL PGAAPKLLIYANDNRPSGVPDRFSGSKSGTSGSLVIAGLRAE DEADYYCQSYDRTL SVVFGGGTKLTVL

31	cadena pesada nuc	gagggtgcacctgggtggagtctgggggaggcctggcaagcctggggggtccctgagactctcc tgtgcagcctctggattcgcattcactggttatggtctaaattgggtccgccaggtccaggggag ggcctggagtgggtttcatccatcactgctggaagctcatacatcgactacgcagagtcagtga gggccgattcaccatctccagagacaacggcaagaatacactgttctgcaaatgagcgacctg agagccgacgacacggctgtctattactgtgagagagttgctctctctggttcggggactcca cttagactactggggccaggagccctggtcaccgtctctctag
32	cadena ligera nuc	cagtctgtgctgacgcagccgcctcaatgtccggggccccagggcagagggtcaccatctcc tgactgggggagctccaacatcggggcagggtatgatgtgcagtggtaccagcaactccag gagcagccccaaactcctcatctatgtaacgacaatcggcctcaggggtccctgaccgattc tctggctcaagtctggcacctcaggctcctagtcacgctggcctccgggctgaggatgagg ctgattactgcccagtcctatgaccgcacctgagtgtagtgcggcggaggaccagctg accgtctctgg
33	cadena pesada aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFTGYGLNWVRQVP GKGLEWVSSITAGSSYIDYAESVKGRFTISRDNKNTLFLQM SDLRADDTA VYYCARVASPLVRGLHLDYWGQALVTVSS
34	cadena pesada nuc	gagggtgcagctgggtggagtctgggggaggcctggcaagcctggggggtccctgagactctcc tgtgcagcctctggattcgcattcactggttatggtctaaattgggtccgccaggtccaggggag ggcctggagtgggtttcatccatcactgctggaagctcatacatcgactacgcagagtcagtga gggccgattcaccatctccagagacaacggcaagaatacactgttctgcaaatgagcgacctg agagccgacgacacggctgtctattactgtgagagagttgctctctctggttcggggactcca cttagactactggggccaggagccctggtcaccgtctctctag
35	CDRL3 aa	QSYDRSLSGV
36	CDRL3 nuc	cagtcctatgacaggagcctgagtggtgc
37	cadena ligera aa	QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLP GTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSASKSGTSASLAITGLQAEDE ADYYCQSYDRSLSGVFGTGTKVTVL
38	cadena ligera nuc	cagtctgtcgtgacgcagccgcctcagtgtctggggccccagggcagagggtcaccatctct gcactgggagcagctccaacatcggggcagggtatgatgtacactggtaccagcaactccagg aacagccccaaactcctcatctatgataacaacaatcaccctcaggggtcccggaccgattct ctgctccaagtctggcacctcagcctcctggccatcaccgggctccaggctgaggatgagge tgattactgcccagtcctatgacaggagcctgagtggtgtcttcggaactgggaccaaggtcac cgtctctag
39	CDRH2 aa	ISSSSSYI
40	CDRH3 aa	ARARATGYNSITPYFDI
41	CDRL2 aa	GNS
42	CDRL3 aa	QSYDSSLSGV
43	CDRH1 nuc	ggcttcacattcagctctactct

44	CDRH2 nuc	atctcaagctcctctagttacatc
45	CDRH3 nuc	gcccgggctagagcaacaggctataacagcattactccttactttgacatc
46	CDRL1 nuc	tcaccaacatcggc
47	CDRL2 nuc	gggaacagc
48	CDRL3 nuc	cagtcttatgattcttctctgtctggagtc
49	cadena pesada aa	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP GKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARARATGYNISITPYFDIWGQGLTVTVSS
50	cadena ligera aa	QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLP GTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDE ADYYCQSYDSSLSGVFGTGTKVTVL
51	cadena pesada nuc	gaggtgcagctggaggagagcggaggcggactgggtcaaacctggcgggtcactgagactgtc atgcgcagcaagcggcttcacattcagctcctactctatgaactgggtgcgacaggctcctggca agggactggagtggtctctagatctcaagctcctctagttacatctactatgcagactccgtgaa gggaaggttaccatctcagcgcataacgccaaaaatagcctgtatctgcagatgaattcctgga gagccgaagacaccgctgtctactattgcgccgggctagagcaacaggctataacagcattac tccttactttgacatctggggacagggcacactggtagaccgtctctca
52	cadena ligera nuc	cagtcgctcgtcactcagcctccaagcgtcagcggggcacctgggcagcgggtcacaatctcat gcaactgggtcctcatccaacatcggcgctgggtacgacgtgactggatcagcagctgcctgg aacagcacctaagctgctgatctacgggaacagcaatcggccatctggagtccccgatagattc agcggatccaaatctggcaccagtgctcactggctattacagggctgcaggcagaggacgaa gccgattactattgccagcttatgattctctctgtctggagtcttcggcaccggcacaaaagtcac cgtcctg
53	CDRH3 aa	ARVASPMVRGLHFDY
54	CDRL3 aa	QSYDSSLSVV
55	CDRH1 nuc	ggctttacctttagctcctactct
56	CDRH3 nuc	gcccgcgtcgtagccctatggtgcgggggctgcattttgattat
57	CDRL1 nuc	tcttcaaacatcggcgctgggtacgac
58	CDRL3 nuc	cagagctacgattcatcctgagcgtggtc
59	cadena pesada aa	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP GKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARVASPMVRGLHFDYWGQGLTVTVSS

60	cadena ligera aa	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLP GTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDE ADYYCQSYDSSLSVVFSGGKLTVL
61	heavy chain nuc	gaagtgcagctgggtggaatctggggcgggctggcacaacctggcgaagtctgaggctgtcc tgtgctgtagtggctttaccttagctcctactctatgaactgggtgcgacaggcacctggcaag ggactggagtggtctctagatctcaagctcctctagtacatctactatgctgactccgtgaagg gccggttcaccatctcaagagataacgcaaaaaatagcctgtatctgcagatgaattccctgagg gcagaagacacagccgtgtactattgcgcccgctcgctagccctatgggtgcggggctgcatt ttgattattggggacagggactctgggtgaccgtctcatcc
62	cadena ligera nuc	cagagcgtcctgaccagccaccatccgtgagcggcgcaccggccagcagtgactattcc tgtaccggcagttcttcaaacatcggcgtgggtacgacgtgactggtatcagcagctgcctgg aacagcacctaagctgctgatctacgggaacagcaatcggccatctggagtccccgatagattc agcggatcctcaaatctggcaccagtgcctcactggctattacagggtgcaggcagaggacgaa gccgattactattgccagagctacgattcatccctgagcgtggtcttcggaggcggcacaaaact gactgtcctg
63	aa	SAVSKGYLSALRTGWYTSVIT
64	aa	YLSALRTGW
65	aa	YLSVLRTGW
66	aa	YFSALRTGW
67	aa	YFSVLRTGW
68	aa	YKSALRTGW
69	aa	YKSVLRTGW

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Humabs BioMed SA
 <120> ANTICUERPOS QUE NEUTRALIZAN TANTO RSV COMO MPV Y USOS DE LOS MISMOS
 <130> HMB0014-401-PC
 <150> 61/613,197
 10 <151> 2012-03-20
 <150> 61/655,310
 <151> 2012-06-04
 15 <160> 69
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 20 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser
 25 1 5
 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Ile Ser Ala Ser Ser Ser Tyr Ser
 1 5
 35 <210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 3
 Ala Arg Ala Arg Ala Thr Gly Tyr Ser Ser Ile Thr Pro Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Ile
 <210> 4
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp
 50 1 5
 <210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Asp Asn Asn
 1

ES 2 657 470 T3

	<210>	6		
	<211>	10		
	<212>	PRT		
	<213>	Homo sapiens		
5	<400>	6		
		Gln Ser Tyr Asp Arg Asn Leu Ser Gly Val		
		1 5 10		
	<210>	7		
10	<211>	24		
	<212>	ADN		
	<213>	Homo sapiens		
	<400>	7		
15		ggattcacct tcagtagtta tagc		24
	<210>	8		
	<211>	24		
	<212>	ADN		
20	<213>	Homo sapiens		
	<400>	8		
		attagtgcaa gtagcagtta cagc		24
25	<210>	9		
	<211>	51		
	<212>	ADN		
	<213>	Homo sapiens		
30	<400>	9		
		gcgagagctc gggcaactgg ctacagttcc attaccccct actttgacat t		51
	<210>	10		
	<211>	27		
35	<212>	ADN		
	<213>	Homo sapiens		
	<400>	10		
40		agctccaaca tcggggcagg ttatgat		27
	<210>	11		
	<211>	9		
	<212>	ADN		
	<213>	Homo sapiens		
45	<400>	11		
		gataacaac		9
	<210>	12		
50	<211>	30		
	<212>	ADN		
	<213>	Homo sapiens		
	<400>	12		
55		cagtcctatg acaggaacct gagtgggtgc		30
	<210>	13		
	<211>	124		
	<212>	PRT		
60	<213>	Homo sapiens		
	<400>	13		

ES 2 657 470 T3

Glu Glu Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ala Ser Ser Ser Tyr Ser Asp Tyr Ala Asp Ser Ala
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Ser Leu Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ala Arg Ala Thr Gly Tyr Ser Ser Ile Thr Pro Tyr Phe Asp
 100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Gln Ser Val Val Thr Gln Thr Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln

ES 2 657 470 T3

1		5		10		15													
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Gly				
			20					25					30						
Tyr	Asp	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu				
		35					40					45							
Leu	Ile	Tyr	Asp	Asn	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe				
	50					55					60								
Ser	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Leu				
65					70					75					80				
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr	Asp	Arg	Asn				
				85					90					95					
Leu	Ser	Gly	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu						
			100					105					110						

	<210>	15																	
	<211>	373																	
5	<212>	ADN																	
	<213>	Homo sapiens																	
	<400>	15																	
		gaggaacagc	tgctagagtc	tgggggaggc	ctggtcaagc	ctggggggtc	cctgagactc												60
		tctctgtcag	cctctggatt	caccttcagt	agttatagca	tgaactgggt	ccgccaggct												120
		ccaggggaagg	ggctggagtg	ggtctcatcc	attagtgcaa	gtagcagtta	cagcgattac												180
		gcagactcag	cgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	acgccaagac	ctcactgttt												240
		ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggctatct	atctctgtgc	gagagctcgg												300
		gcaactggct	acagttccat	tacccctac	tttgacattt	ggggccaggg	aaccctggtc												360
		accgtctcct	cag																373
10	<210>	16																	
	<211>	331																	
	<212>	ADN																	
	<213>	Homo sapiens																	
15	<400>	16																	
		cagtctgtcg	tgacgcagac	gccctcagtg	tctggggccc	cagggcagag	ggtcaccatc												60
		tctgactg	ggagcagctc	caacatcggg	gcaggttatg	atgtacactg	gtaccagcaa												120
		cttccaggaa	cagcccccaa	actcctcatc	tatgataaca	acaatcgacc	ctcaggggtc												180
		ccggaccgat	tctctgcctc	caagtctggc	acctcagcct	ccctggccat	caccgggtc												240
		caggctgagg	atgaggctga	ttattactgc	cagtcctatg	acaggaacct	gagtggtgtc												300
		ttcgggaactg	ggaccaaggt	cacogtcta	g														331

ES 2 657 470 T3

<210> 17
 <211> 124
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Ser Ile Ser Ala Ser Ser Ser Tyr Ser Asp Tyr Ala Asp Ser Ala
 50 55 60

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Ser Leu Phe
 65 70 75 80

 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys
 85 90 95

 Ala Arg Ala Arg Ala Thr Gly Tyr Ser Ser Ile Thr Pro Tyr Phe Asp
 100 105 110

 Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 18
 <211> 373
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 18
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatagca tgaactgggt cgcaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtcaa gtagcagtta cagcgattac 180
 gcagactcag cgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagac ctcaactgtt 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctatct atttctgtgc gagagctcgg 300
 gcaactggct acagttccat taccocctac tttgacattt ggggccaggg aaccctggtc 360
 15 accgtctcct cag 373

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens

 <400> 19

Gly Phe Ala Phe Thr Gly Tyr Gly
1 5

5 <210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
Ile Thr Ala Gly Ser Ser Tyr Ile
1 5

10 <210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 21
Ala Arg Val Ala Ser Pro Leu Val Arg Gly Leu His Leu Asp Tyr
1 5 10 15

20 <210> 22
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 22
Ala Asn Asp
1

30 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
Gln Ser Tyr Asp Arg Thr Leu Ser Val Val
1 5 10

35 <210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 24
 ggattcgcat tcaactggta tggg 24

45 <210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 25
 atcactgctg gaagctcata catc 24

55 <210> 26
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 gcgagagttg cgtctcctct ggttcgggga ctccacttag actac 45

60 <210> 27
 <211> 9
 <212> ADN

ES 2 657 470 T3

<213> Homo sapiens
 <400> 27
 gctaacgac 9
 5
 <210> 28
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 28
 cagtctatg accgcacct gagttagtg 30
 15
 <210> 29
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Leu Asn Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Thr Ala Gly Ser Ser Tyr Ile Asp Tyr Ala Glu Ser Val
 50 55 60
 20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Asp Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Ala Ser Pro Leu Val Arg Gly Leu His Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 25 <210> 30
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30

ES 2 657 470 T3

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Met Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val Gln Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Asn Asp Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Val Ile Ala Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Thr
 85 90 95

Leu Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

- <210> 31
- <211> 367
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens

gaggtgcacc tgggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgcattcact ggttatggtc taaattgggt ccgccaggtt 120
 ccaggggaagg gcctggagtg ggtttcatcc atcactgctg gaagctcata catcgactac 180
 gcagagtcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acggcaagaa tacactgttc 240
 ctgcaaatga gcgacctgag agccgacgac acggctgtct attactgtgc gagagttgcg 300
 tctcctctgg ttcggggact ccacttagac tactggggcc agggagccct ggtcaccgtc 360
 tcctcag 367

- 10 <210> 32
- <211> 331
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

15 <400> 32
 cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcaatg tccggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgcactg ggggcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtgcagtg gtaccagcaa 120
 cttccaggag cagcccccaa actcctcadc tatgctaacg acaatcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcaggct ccctagtcac cgctggcctc 240
 cgggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg accgcaccct gagtgtagt 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctg g 331

ES 2 657 470 T3

<210> 33
 <211> 122
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Leu Asn Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Thr Ala Gly Ser Ser Tyr Ile Asp Tyr Ala Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Asp Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Ala Ser Pro Leu Val Arg Gly Leu His Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 34
 <211> 367
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 34
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgcattcact ggttatggtc taaattgggt cgcagcaggtt 120
 ccaggggaagg gcctggagtg ggtttcatcc atcactgctg gaagctcata catcgactac 180
 gcagagtcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acggcaagaa tacactgttc 240
 ctgcaaatga gcgacctgag agccgacgac acggctgtct attactgtgc gagagttgcg 300
 tctcctctgg ttcggggact ccacttagac tactggggcc agggagccct ggtcaccgtc 360
 tcctcag 367

20 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 657 470 T3

```

<400> 35
Gln Ser Tyr Asp Arg Ser Leu Ser Gly Val
1 5 10

5 <210> 36
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 36
10 cagtctatg acaggagcct gagtgggtgc 30

<210> 37
<211> 110
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens

<400> 37
Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Ser
85 90 95

20 Leu Ser Gly Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

25 <210> 38
<211> 331
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 38
cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgcaactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcaa 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcadc tatgataaca acaatcgacc ctcaggggtc 180
ccggaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccttggccat caccgggctc 240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acaggagcct gagtgggtgc 300
ttcggaactg ggaccaaggt caccgtccta g 331

```

ES 2 657 470 T3

<210> 39
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 39
 Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile
 1 5

 10 <210> 40
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 15 <400> 40
 Ala Arg Ala Arg Ala Thr Gly Tyr Asn Ser Ile Thr Pro Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

 Ile

 20 <210> 41
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 41
 Gly Asn Ser
 1
 25
 <210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 42
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Val
 1 5 10

 35 <210> 43
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 40 <400> 43
 ggcttcacat tcagctccta ctct 24

 45 <210> 44
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 44
 atctcaagct cctctagtta catc 24

 50 <210> 45
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 55 <400> 45
 gcccgggcta gagcaacagg ctataacagc attactcctt actttgacat c 51
 <210> 46

ES 2 657 470 T3

```

<211> 15
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5 <400> 46
   tcatccaaca tcggc                                15

   <210> 47
   <211> 9
10 <212> ADN
   <213> Homo sapiens

   <400> 47
   gggaacagc                                        9

   <210> 48
   <211> 30
   <212> ADN
   <213> Homo sapiens

20 <400> 48
   cagtctatg attcttctct gtctggagtc                30

   <210> 49
   <211> 124
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

   <400> 49
   Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
   1          5          10          15

   Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
   20          25          30

   Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
   35          40          45

   Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
   50          55          60

   Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
   65          70          75          80

   Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
   85          90          95

   Ala Arg Ala Arg Ala Thr Gly Tyr Asn Ser Ile Thr Pro Tyr Phe Asp
   100         105         110

   Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
30          115          120

   <210> 50
   <211> 110
   <212> PRT
35 <213> Homo sapiens

```

ES 2 657 470 T3

<400> 50

Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

5 Leu Ser Gly Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 51

<211> 372

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 51

gaggtgcagc tgggtggagag cggaggcgga ctggtcaaac ctggcgggctc actgagactg 60

tcatgcgcag caagcggctt cacattcagc tcctactcta tgaactgggt gcgacaggct 120

cctggcaagg gactggagtg ggtctctagt atctcaagct cctctagtta catctactat 180

gcagactccg tgaagggag gttcaccatc tcacgcgata acgcaaaaa tagcctgtat 240

ctgcagatga attccctgag agccgaagac accgctgtct actattgcgc ccgggctaga 300

gcaacaggct ataacagcat tactccttac tttgacatct ggggacaggg cacactgggtg 360

accgtctcct ca 372

15 <210> 52

<211> 330

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 52

ES 2 657 470 T3

```

cagtccgtcg tcaactcagcc tccaagcgtc agcggggcac ctgggcagcg ggtcacaatc      60
tcatgcaactg ggtcctcatc caacatcggc gctgggtacg acgtgcaactg gtatcagcag    120
ctgcctggaa cagcacctaa gctgctgac tacgggaaca gcaatcggcc atctggagtc      180
cccgatagat tcagcggatc caaatctggc accagtgctt cactggctat tacagggctg     240
caggcagagg acgaagccga ttactattgc cagtcttatg attcttctct gtctggagtc     300
ttcggcaccg gcacaaaagt caccgtcctg                                       330

<210> 53
<211> 15
5 <212> PRT
   <213> Homo sapiens

<400> 53
Ala Arg Val Ala Ser Pro Met Val Arg Gly Leu His Phe Asp Tyr
1           5           10           15

<210> 54
<211> 10
15 <212> PRT
   <213> Homo sapiens

<400> 54
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Val Val
1           5           10

<210> 55
20 <211> 24
   <212> ADN
   <213> Homo sapiens

<400> 55
25 ggctttacct ttagctccta ctct                                     24

<210> 56
<211> 45
30 <212> ADN
   <213> Homo sapiens

<400> 56
gcccgcgtcg ctagccctat ggtgcggggg ctgcatttg attat                       45

35 <210> 57
   <211> 27
   <212> ADN
   <213> Homo sapiens

40 <400> 57
tcttcaaaca tcggcgctgg gtacgac                                       27

<210> 58
45 <211> 30
   <212> ADN
   <213> Homo sapiens

<400> 58
50 cagagctacg attcatccct gagcgtggtc                                   30

<210> 59
<211> 122
<212> PRT

```

ES 2 657 470 T3

<213> Homo sapiens

<400> 59

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Ala Ser Pro Met Val Arg Gly Leu His Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 60

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 60

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

ES 2 657 470 T3

Leu Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

5 <210> 61
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 gaagtgcagc tgggtggaatc tggggggcggg ctggtcaaac ctggcggaag tctgaggctg 60
 tcctgtgctg ctagtggctt taccttttagc tcctactcta tgaactgggt gcgacaggca 120
 cctggcaagg gactggagtg ggtctctagt atctcaagct cctctagtta catctactat 180
 gctgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcaagagata acgcaaaaaa tagcctgtat 240
 ctgcagatga attccctgag ggcagaagac acagccgtgt actattgcgc ccgctgcgt 300
 agccctatgg tgcgggggct gcattttgat tattggggac agggaactct ggtgaccgtc 360

10 tcatcc 366

<210> 62
 <211> 330
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens

<400> 62
 cagagcgtcc tgaccagcc accatccgtg agcggcgcac ccggccagcg agtgactatt 60
 tcctgtaccg gcagttcttc aaacatcggc gctgggtacg acgtgcaactg gtatcagcag 120
 ctgcctggaa cagcacctaa gctgctgac tacgggaaca gcaatcggcc atctggagtc 180
 cccgatagat tcagcggatc caaatctggc accagtgctt cactggctat tacagggctg 240
 caggcagagg acgaagccga ttactattgc cagagctacg attcatccct gagcgtggtc 300
 ttcggaggcg gcacaaaact gactgtcctg 330

20 <210> 63
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 63
 Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu Arg Thr Gly Trp Tyr
 1 5 10 15

Thr Ser Val Ile Thr
 20

<210> 64
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 64
 Tyr Leu Ser Ala Leu Arg Thr Gly Trp
 1 5

35

<210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 65
 Tyr Leu Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp
 1 5

<210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 66
 15
 Tyr Phe Ser Ala Leu Arg Thr Gly Trp
 1 5

<210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 67
 Tyr Phe Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp
 1 5

<210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 68
 Tyr Lys Ser Ala Leu Arg Thr Gly Trp
 1 5

<210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 69
 Tyr Lys Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp
 1 5

<210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 69
 Tyr Lys Ser Val Leu Arg Thr Gly Trp
 40 1 5

Reivindicaciones

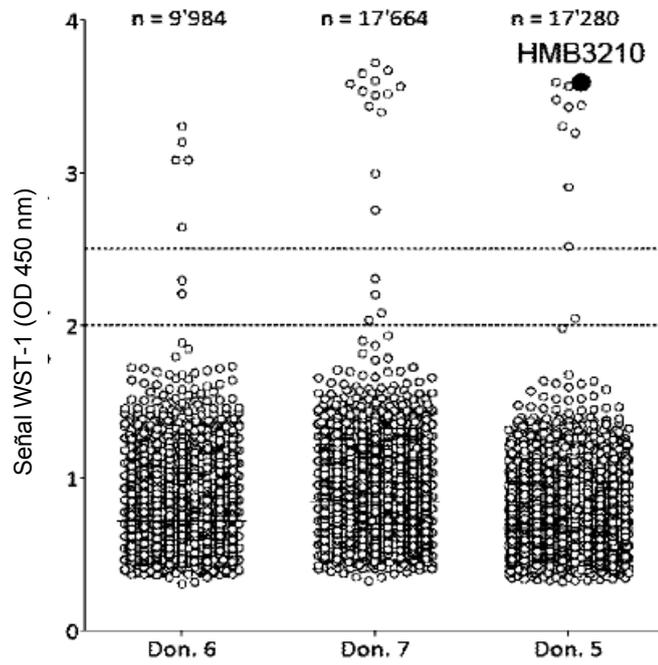
1. Anticuerpo aislado, o fragmento de unión de antígeno del mismo, que neutraliza la infección por RSV, MPV y PVM, siendo el anticuerpo un anticuerpo monoclonal y uniéndose el anticuerpo o el fragmento de unión de antígeno a una región conservada en la parte amino terminal de la proteína F de RSV, de MPV o de PVM que comprende la secuencia de aminoácidos según cualquiera de las SEQ ID N°: 64-69.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, o fragmento de unión de antígeno del mismo, uniéndose el anticuerpo o el fragmento de unión de antígeno específicamente a la proteína F prefusión y no a la proteína F postfusión del RSV y del MPV.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, o fragmento de unión de antígeno del mismo, neutralizando el anticuerpo o el fragmento de unión de antígeno la infección por RSV tanto del grupo A como del grupo B, así como por MPV tanto del grupo A como del grupo B.
4. Anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, o fragmento de unión de antígeno del mismo, neutralizando el anticuerpo o el fragmento de unión de antígeno la infección por MPV de los subgrupos A1, A2, B1 y B2.
5. Anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, o fragmento de unión de antígeno del mismo, siendo la concentración de anticuerpo o de fragmento necesaria para un 50% de neutralización de RSV, MPV o PVM de 500 ng/ml o inferior.
6. Anticuerpo según la reivindicación 1, o fragmento de unión de antígeno del mismo, que comprende al menos una secuencia de región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID N°: 1-6, 19-23, 35, 39-42 o 53-54.
7. Anticuerpo según la reivindicación 1, o fragmento de unión de antígeno del mismo, que comprende una cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 para CDRH1, SEQ ID N°: 2 para CDRH2 y SEQ ID N°: 3 para CDRH3; SEQ ID N°: 1 para CDRH1, SEQ ID N°: 39 para CDRH2 y SEQ ID N°: 40 para CDRH3; SEQ ID N°: 19 para CDRH1, SEQ ID N°: 20 para CDRH2 y SEQ ID N°: 21 para CDRH3; o SEQ ID N°: 1 para CDRH1, SEQ ID N°: 39 para CDRH2 y SEQ ID N°: 53 para CDRH3.
8. El anticuerpo según la reivindicación 1 o 7, o fragmento de unión de antígeno del mismo, que comprende una cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 4 para CDRL1, SEQ ID N°: 5 para CDRL2 y SEQ ID N°: 35 para CDRL3; SEQ ID N°: 4 para CDRL1, SEQ ID N°: 5 para CDRL2 y SEQ ID N°: 6 para CDRL3; SEQ ID N°: 4 para CDRL1, SEQ ID N°: 41 para CDRL2 y SEQ ID N°: 42 para CDRL3; SEQ ID N°: 4 para CDRL1, SEQ ID N°: 22 para CDRL2 y SEQ ID N°: 23 para CDRL3; o SEQ ID N°: 4 para CDRL1, SEQ ID N°: 41 para CDRL2 y SEQ ID N°: 54 para CDRL3.
9. El anticuerpo según la reivindicación 1, o fragmento de unión de antígeno del mismo, que comprende (i) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2 y SEQ ID N°: 3, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 y SEQ ID N°: 35, respectivamente; (ii) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2 y SEQ ID N°: 3, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 y SEQ ID N°: 6, respectivamente; (iii) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 39 y SEQ ID N°: 40, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 41 y SEQ ID N°: 42, respectivamente; (iv) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 39 y SEQ ID N°: 40, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 y SEQ ID N°: 6, respectivamente; (v) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2 y SEQ ID N°: 3, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 41 y SEQ ID N°: 42, respectivamente; (vi) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20 y SEQ ID N°: 21, respectivamente y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 22 y SEQ ID N°: 23, respectivamente; (vii) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 39 y SEQ ID N°: 53, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 41 y SEQ ID N°: 54,

- respectivamente; (viii) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 39 y SEQ ID N°: 53, respectivamente y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 22 y SEQ ID N°: 23, respectivamente; o (ix) las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20 y SEQ ID N°: 21, respectivamente, y las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestran en SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 41 y SEQ ID N°: 54, respectivamente.
- 5
10. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1-9, o fragmento de unión de antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID N°: 13, 17, 29, 33, 49 o 59, y/o que comprende una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 14, 30, 37, 50 o 60.
- 10
11. Anticuerpo según la reivindicación 1, o fragmento de unión de antígeno del mismo, comprendiendo el anticuerpo una región variable de cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 17 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 37; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 13 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 14; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 17 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 14; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 49 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 50; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 49 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 14; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 17 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 50; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 29 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 30; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 33 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 30; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 59 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 60; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 59 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 30; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 33 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 60, neutralizando el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno la infección por RSV, MPV y PVM.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
40. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, o fragmento de unión de antígeno del mismo, siendo el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión de antígeno del mismo un anticuerpo humano, un anticuerpo purificado, un anticuerpo de cadena simple, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv.
- 40
13. Molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo, o el fragmento de unión de antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo la secuencia de polinucleótido preferiblemente al menos un 75% idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de cualquiera de las SEQ ID N°: 7-12, 15, 16, 18, 24-28, 31-32, 34, 36, 38, 43-48, 51-52, 55-58 o 61-62.
- 45
14. Vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 13.
15. Célula que expresa el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o un fragmento de unión de antígeno del mismo; o que comprende el vector según la reivindicación 14.
- 50
16. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, el ácido nucleico según la reivindicación 13, el vector según la reivindicación 14, o la célula según la reivindicación 15, y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55
17. Composición farmacéutica que comprende un primer anticuerpo, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, y un segundo anticuerpo, o un fragmento de unión de antígeno del mismo,

siendo el primer anticuerpo el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, y neutralizando el segundo anticuerpo la infección por RSV o MPV o tanto por RSV como por MPV.

- 5 **18.** Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, ácido nucleico según la reivindicación 13, vector según la reivindicación 14, célula según la reivindicación 15 o composición farmacéutica según la reivindicación 16 o 17, para su uso en el tratamiento o la atenuación de la infección por RSV o MPV o tanto por RSV como por MPV.
- 10 **19.** Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, ácido nucleico según la reivindicación 13, vector según la reivindicación 14, célula según la reivindicación 15 o composición farmacéutica según la reivindicación 16 o 17, para su uso como una vacuna.
- 15 **20.** Uso del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, del ácido nucleico según la reivindicación 13, del vector según la reivindicación 14, de la célula según la reivindicación 15 o de la composición farmacéutica según la reivindicación 16 o 17, para el diagnóstico *in vitro* de la infección por RSV o MPV.
- 15 **21.** Uso del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o un fragmento de unión de antígeno del mismo, para controlar la calidad de vacunas anti-RSV o anti-MPV comprobando que el antígeno de dicha vacuna contiene el epítipo específico en la conformación correcta.

Rastreo primario utilizando un ensayo de microneutralización de MPV



Rastreo primario utilizando un ensayo de microneutralización de MPV

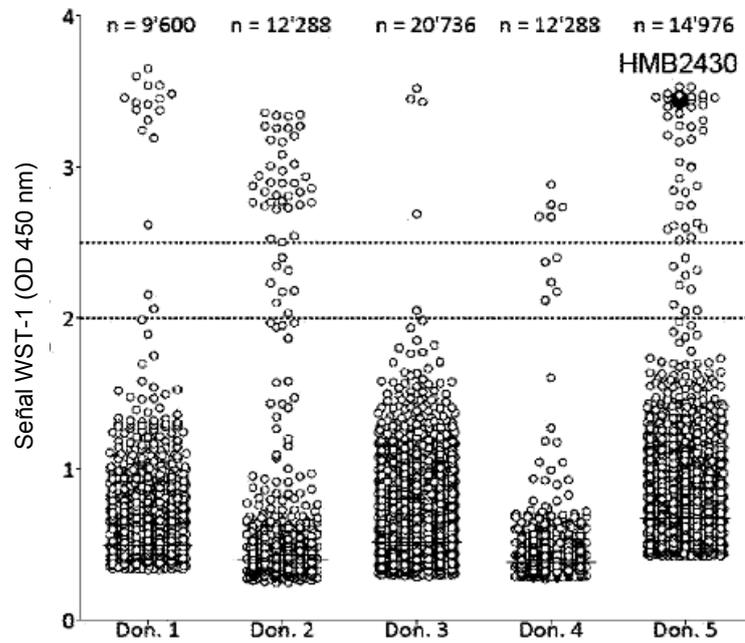
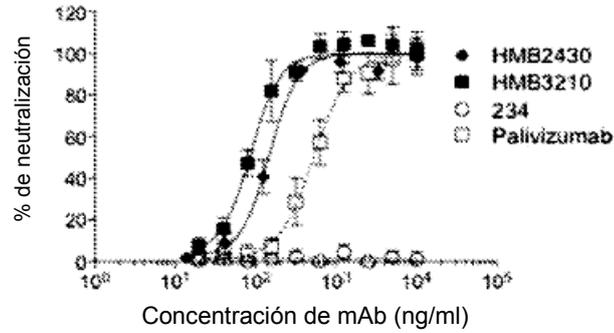


FIGURA 1

El HMB2430 y el HMB3210 neutralizan de forma cruzada la infección por el RSV y el

MPV *in vitro*
RSV A2 (A)



MPV I-PV-03/01-6621 (A1)

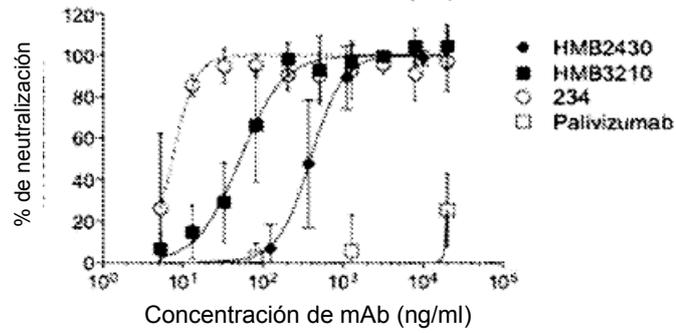


FIGURA 2

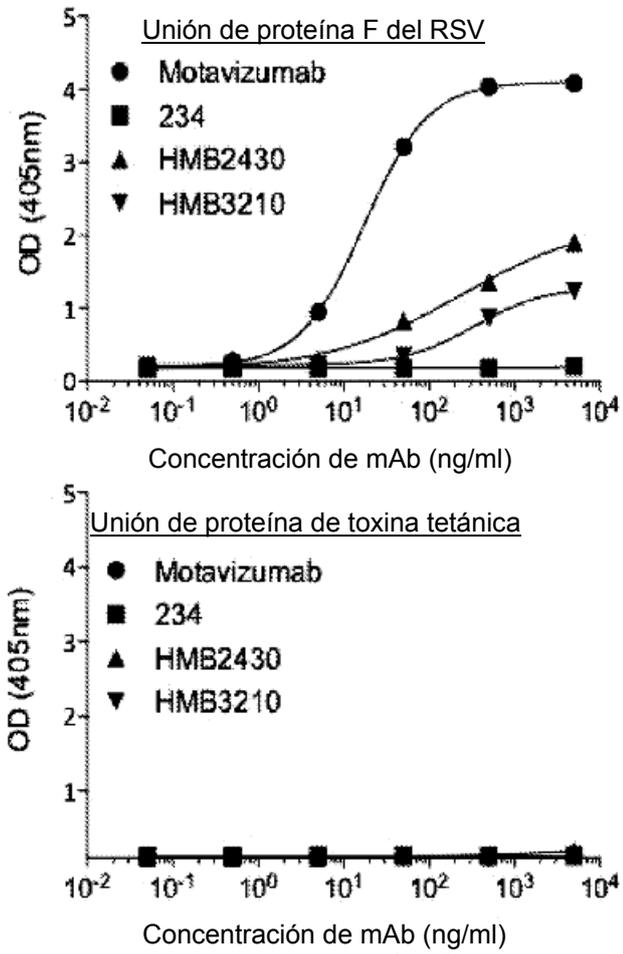


FIGURA 3

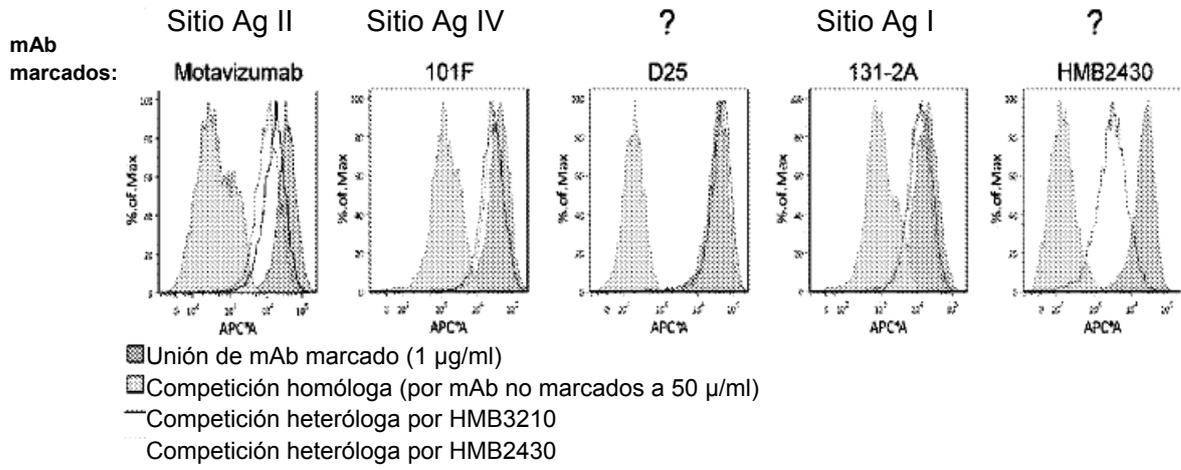


FIGURA 4

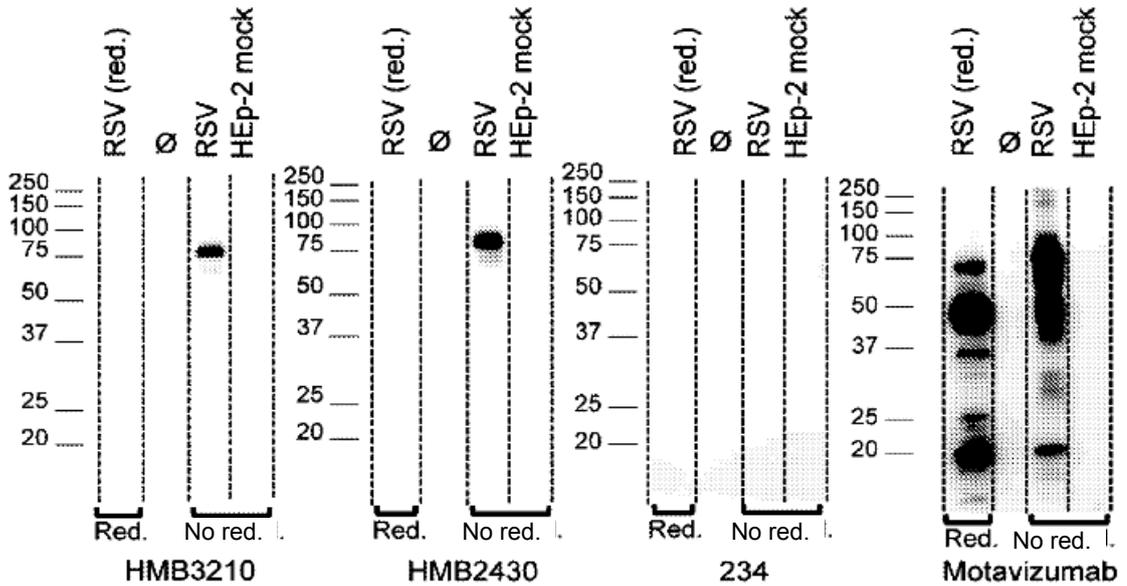


FIGURA 5

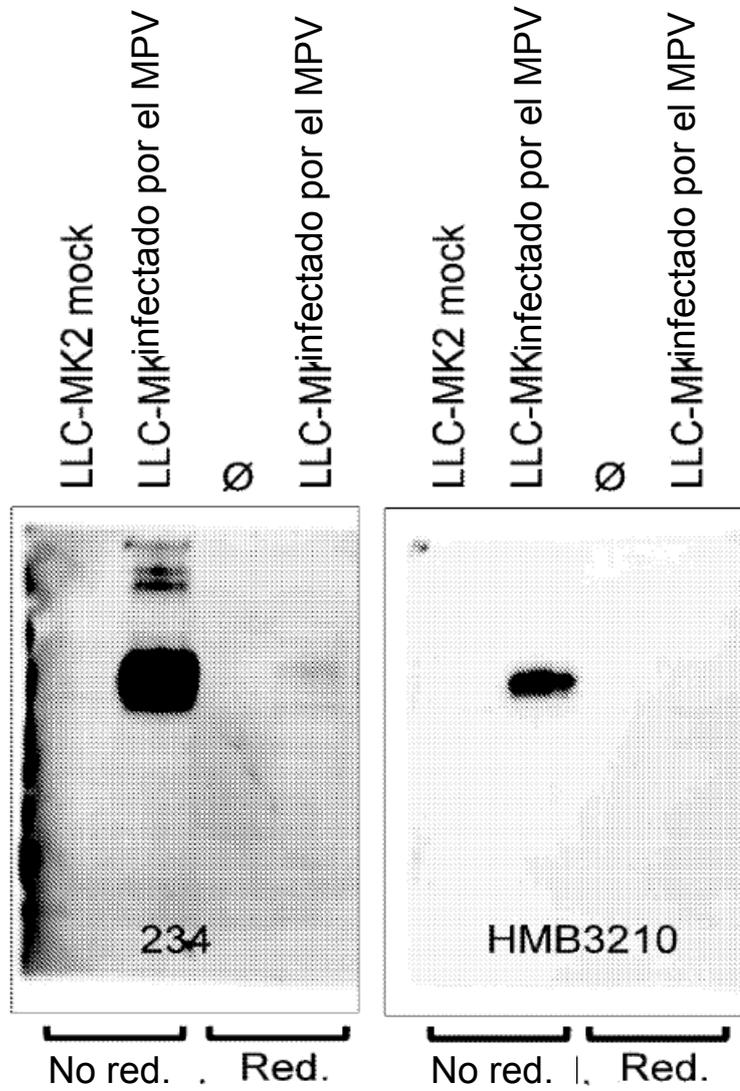


FIGURA 6

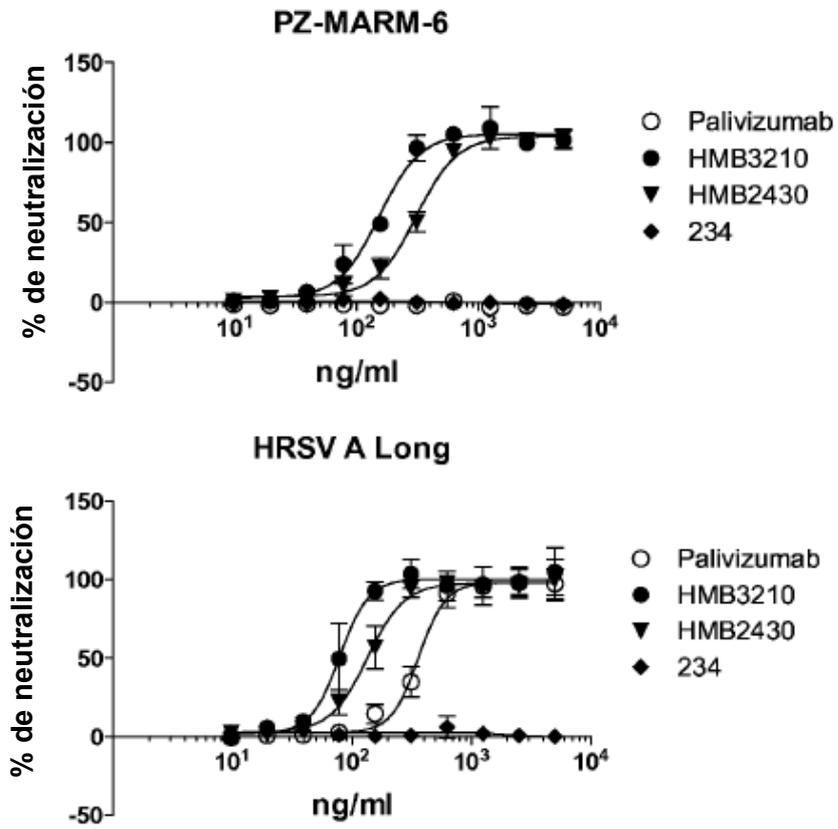


FIGURA 7

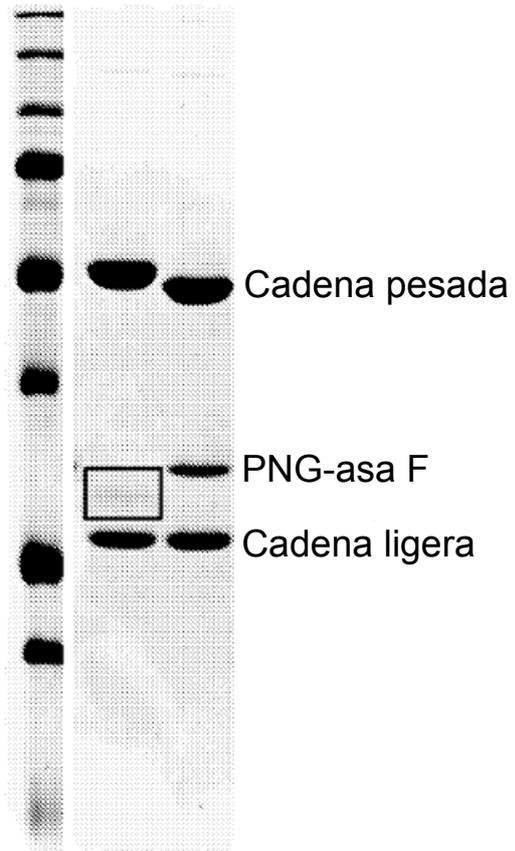


FIGURA 8

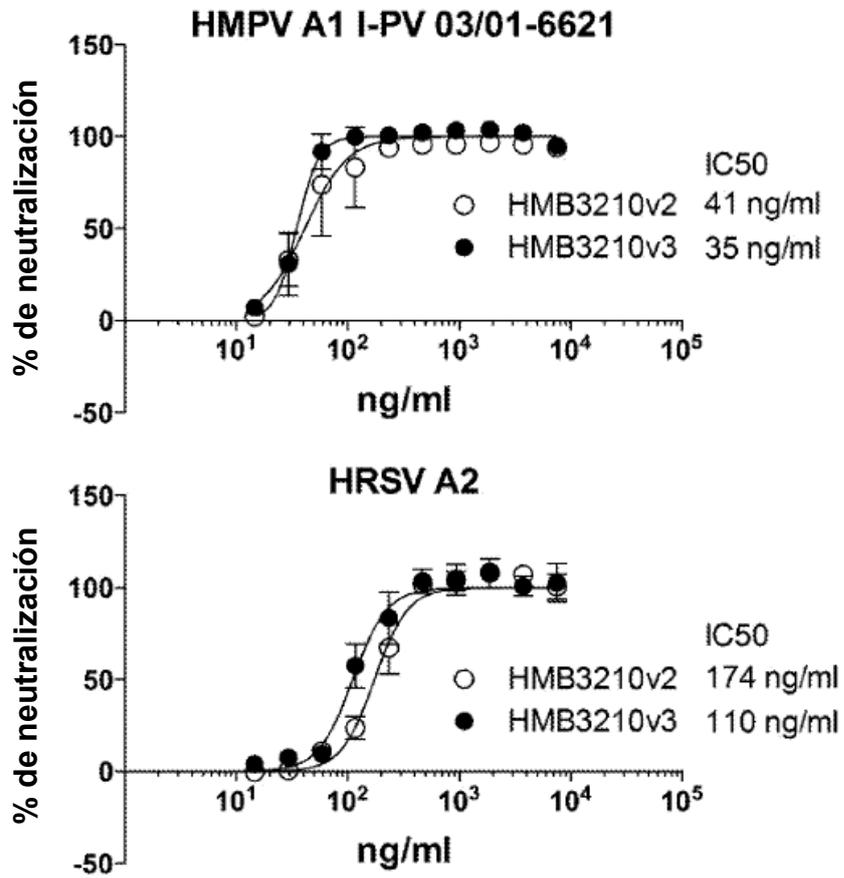


FIGURA 9

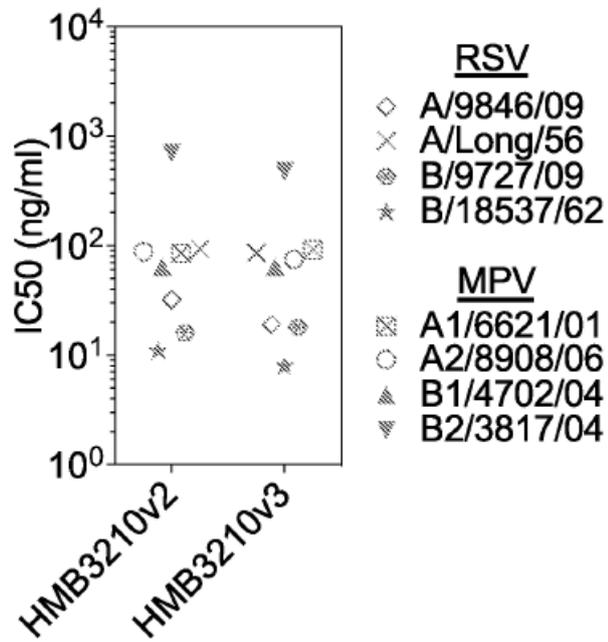


FIGURA 10

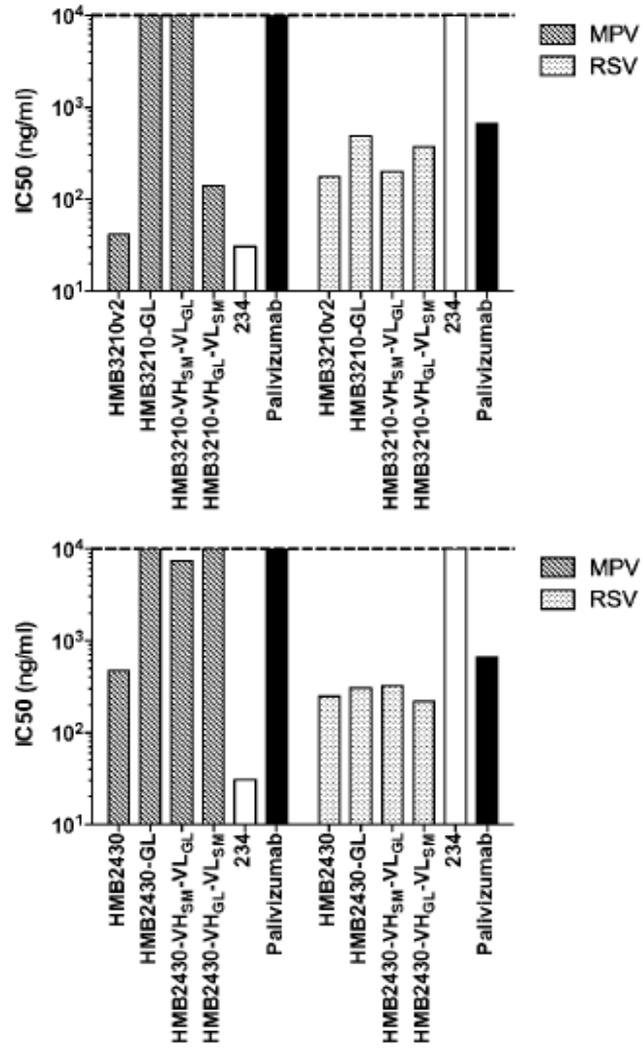


FIGURA 11
]

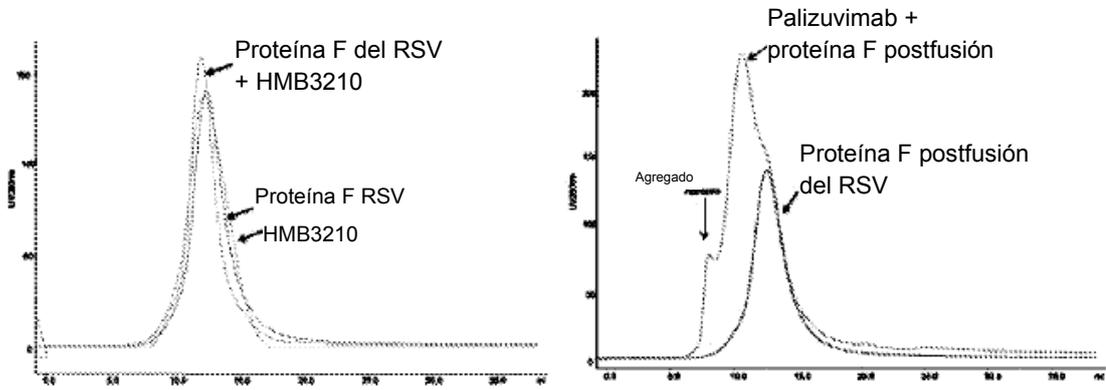


FIGURA 12

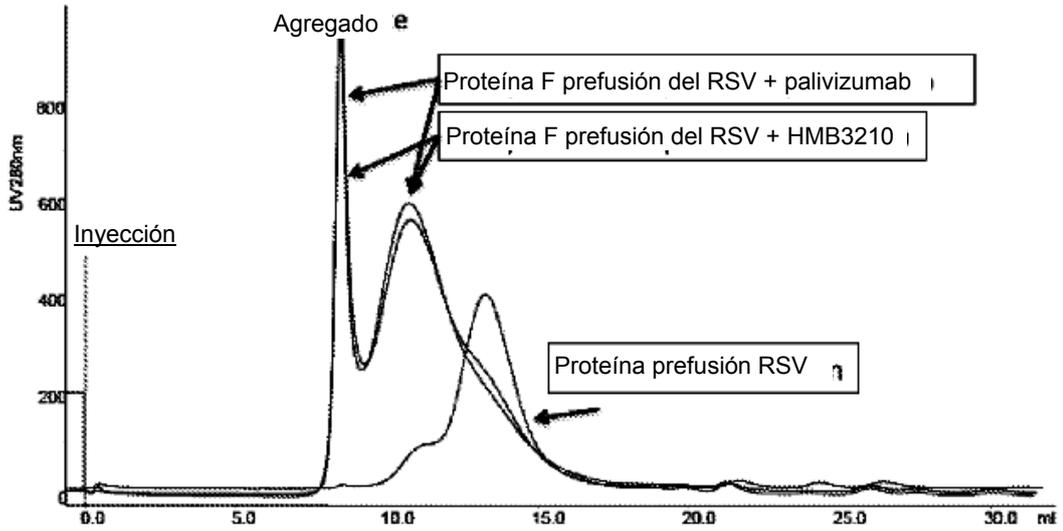


FIGURA 13

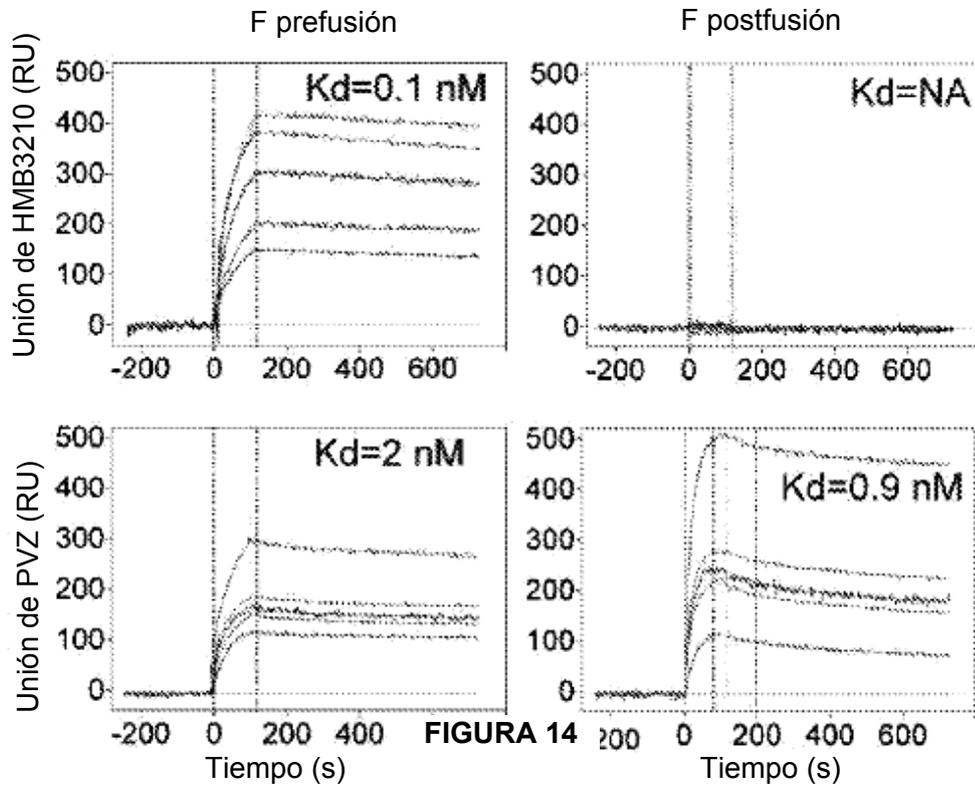


FIGURA 14

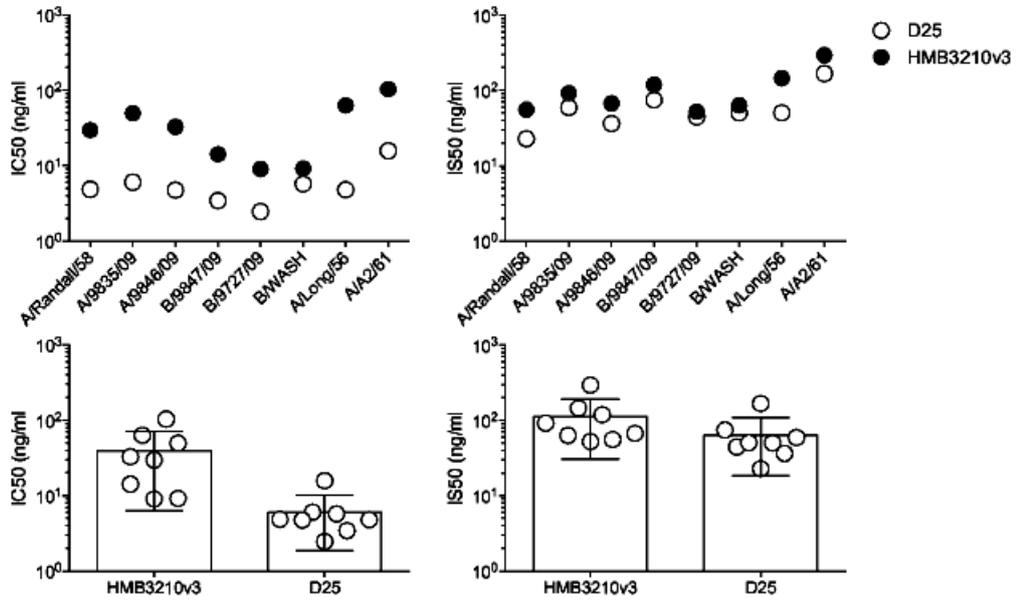


FIGURA 15

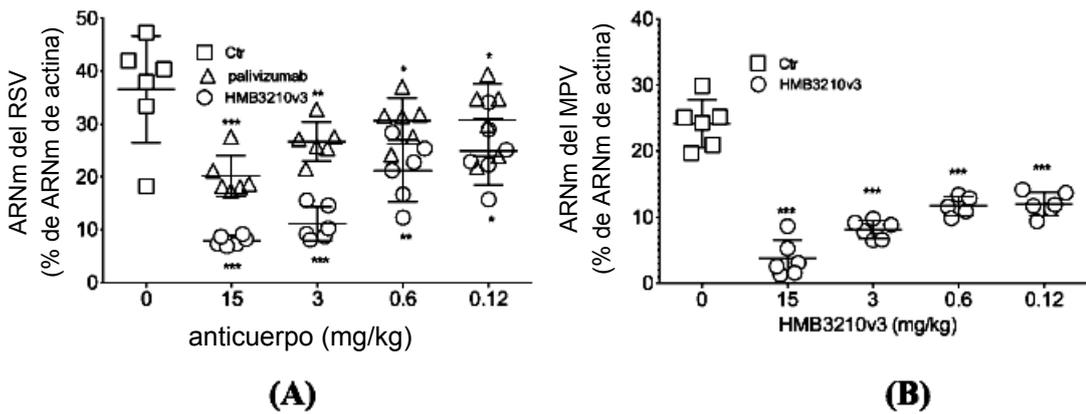


FIGURA 16

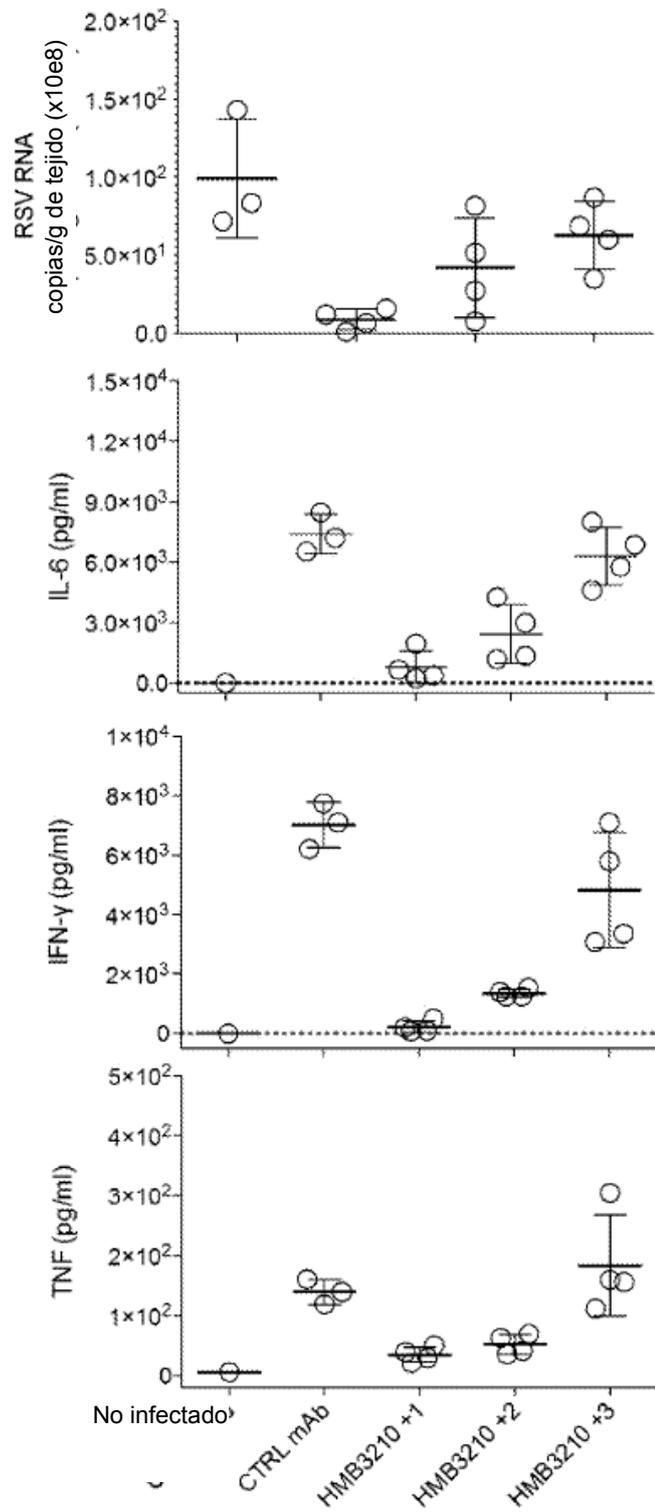


FIGURA 17

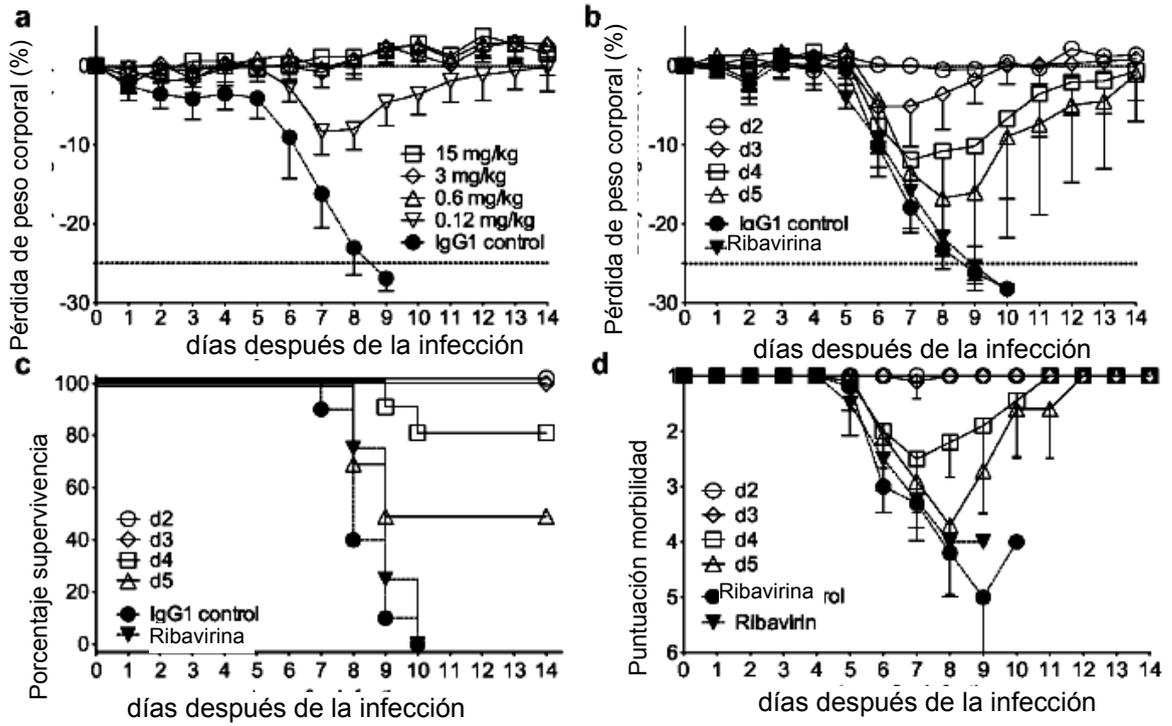


FIGURA 18

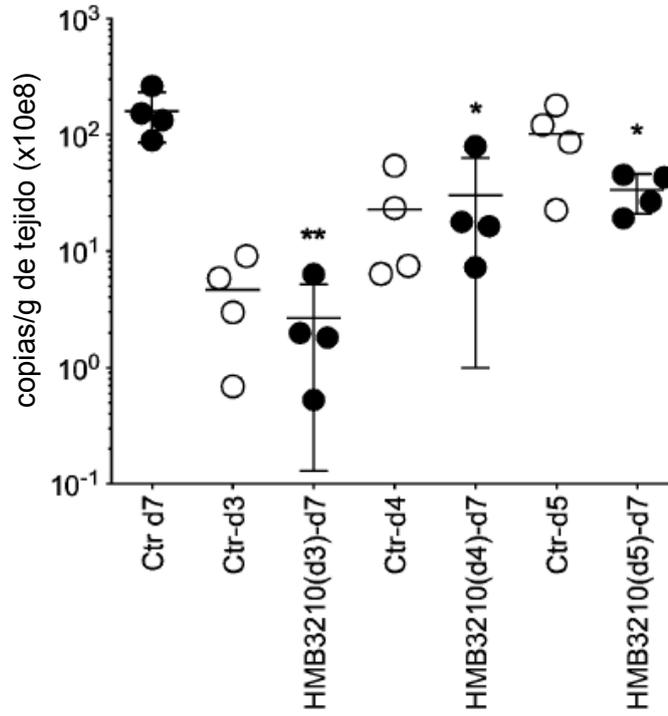


FIGURA 19

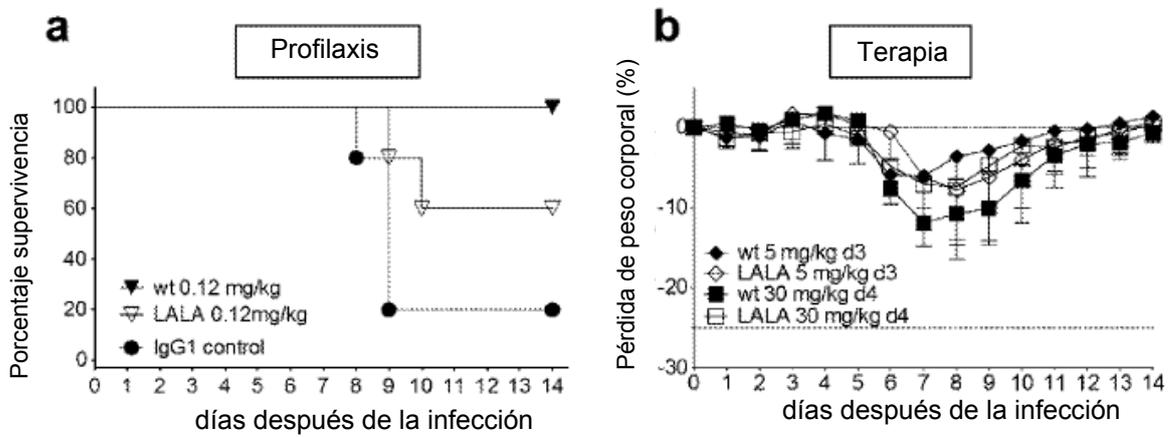


FIGURA 20

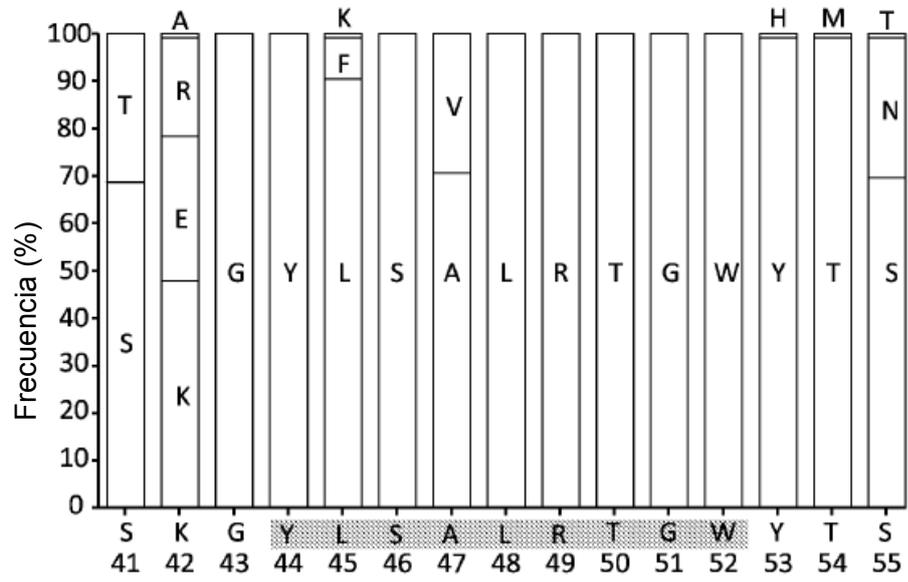


FIGURA 23

FIGURA 24

Secuencias para HMB3210

FIGURA 24A

Nucleótidos VH.1

gaggaacagctgctagagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggggtccctgagactctcct
gtgcagcctct**ggattcaccttcagtagttatagc**atgaactgggtccgccaggctccagggaa
ggggctggagtgggtctcatcc**attagtgcaagtagcagttacagc**gattacgcagactcagcg
aagggccgattcaccatctccagagacaacgccaaagacctcaactgtttctgcaaatgaacagcc
tgagagccgaggacacggctatctatcttctgt**gcgagagctcgggcaactgggtacagttccat**
taccctactttgacatttggggccagggaaacctggtcaccgtctcctcag

Aminoácidos VH.1 ;

EEQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYS**MNWVRQAPGKGLEWVSS**ISASSYS**DYADSA
KGRFTISRDNAKTSLFLQMNSLRAEDTAIYFC**ARARATGYSSITPYFDI**WGQGLTVTVSS

Nucleótidos VH.2 ;

gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggggtccctgagactctcct
gtgcagcctct**ggattcaccttcagtagttatagc**atgaactgggtccgccaggctccagggaa
ggggctggagtgggtctcatcc**attagtgcaagtagcagttacagc**gattacgcagactcagcg
aagggccgattcaccatctccagagacaacgccaaagacctcaactgtttctgcaaatgaacagcc
tgagagccgaggacacggctatctatcttctgt**gcgagagctcgggcaactgggtacagttccat**
taccctactttgacatttggggccagggaaacctggtcaccgtctcctcag

Aminoácidos VH.2 ;

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYS**MNWVRQAPGKGLEWVSS**ISASSYS**DYADSA
KGRFTISRDNAKTSLFLQMNSLRAEDTAIYFC**ARARATGYSSITPYFDI**WGQGLTVTVSS

FIGURA 24B

Nucleótidos VL

cagtctgtcgtgacgcagacgccctcagtgtctggggccccagggcagagggtcaccatctcct
gcactgggagc**agctccaacatcggggcaggttatgat**gtacactggtaccagcaacttccagg
aacagccccaaactcctcatctat**gataacaac**aatcgaccctcaggggtcccgaccgattc
tctgctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcaccgggtccaggctgaggatgagg
ctgattactactgc**cagtcctatgacaggaacctgagtggtgtc**ttcggaactgggaccaaggt
caccgtcctag

Aminoácidos VL

QSVVTQTPSVSGAPGQRVTISCTGSS**SSNIGAGYD**VHWHYQQLPGTAPKLLIY**DNN**NRPSGVPDRF
SASKSGTSASLAIITGLQAEDEADYCY**QSYDRNLSGV**FGTGTKVTVL

Nucleótidos VL.3

cagtctgtcgtgacgcagcgcgccctcagtgtctggggccccagggcagagggtcaccatctcct
gcactgggagc**agctccaacatcggggcaggttatgat**gtacactggtaccagcaacttccagg
aacagccccaaactcctcatctat**gataacaac**aatcgaccctcaggggtcccgaccgattc
tctgctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcaccgggtccaggctgaggatgagg
ctgattactactgc**cagtcctatgacaggagcctgagtggtgtc**ttcggaactgggaccaaggt
caccgtcctag

Aminoácidos VL.3

QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSS**SSNIGAGYD**VHWHYQQLPGTAPKLLIY**DNN**NRPSGVPDRF
SASKSGTSASLAIITGLQAEDEADYCY**QSYDRSLSGV**FGTGTKVTVL

FIGURA 24C

VH.3 (VH-GL)

gaggtgcagctggtggagagcggaggcggactggtcaaacctggcgggtcactgagactgtcat
ggcagcaagc**ggcttcacattcagctcctactct**atgaactgggtgcgacaggctcctggcaa
gggactggagtgggtctctagtag**atctcaagctcctctagttacatc**tactatgcagactccgtg
aagggaaaggttcaccatctcacgcgataacgccaaaaatagcctgtatctgcagatgaattccc
tgagagccgaagacaccgctgtctactattg**gccgggctagagcaacaggctataacagcat**
tactccttactttgacatctggggacagggcacactggtgaccgtctctca

VH.3 (VH-GL)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYS**MNWVRQAPGKGLEWVSS**ISSSSSIYY**ADSV
KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARARATGYN**SIT**PFDI**WGQGLVTVSS

VL.4 (VL-GL)

Cagtccgtcgtcactcagcctccaagcgtcagcggggcacctgggcagcgggtcacaatctcat
gcactgggtcc**tcattcaacatcggc**gctgggtacgacgtgcactggtatcagcagctgcctgg
aacagcacctaagctgctgatctac**gggaacagc**aatcggccatctggagtccccgatagattc
agcggatccaaatctggcaccagtgctcactggctattacagggctgcaggcagaggacgaag
ccgattactattg**cagtcttatgattcttctctgtctggagtc**ttcggcaccggcacaaaagt
caccgtcctg

VL.4 (VL-GL)

QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSS**SNIGAGYD**VHWYQQLPGTAPKLLI**YGNS**NRPSGVPDRF
SGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC**QSYDSSL**SGVFGTGTKVTVL

FIGURA 25

Secuencias para HMB2430

FIGURA 25A

Nucleótidos VH.1

gaggtgcacctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctggggggtccctgagactctcct
gtgcagcctct**ggattcgattcactggttatggt**ctaaattgggtccgccaggttccagggaa
gggcctggagtgggtttcatcc**atcactgctggaagctcatacatc**gactacgcagagtcagtg
aagggccgattcaccatctccagagacaacggcaagaatacactgttcctgcaaatgagcgcacc
tgagagccgacgacacggctgtctattactgt**gcgagagttgctctcctctggttcggggact**
ccacttagactactggggccagggagcctggtcaccgtctcctcag

Aminoácidos VH.1 ;

EVHLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFAFTGYGL**NWVRQVPGKLEWVSS**ITAGSSYI**DYAESV
KGRFTISRDNQKNTLFLQMSDLRADDTAVYYC**ARVASPLVRGLHLDY**WGQALVTVSS

Nucleótidos VH.2

gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctggggggtccctgagactctcct
gtgcagcctct**ggattcgattcactggttatggt**ctaaattgggtccgccaggttccagggaa
gggcctggagtgggtttcatcc**atcactgctggaagctcatacatc**gactacgcagagtcagtg
aagggccgattcaccatctccagagacaacggcaagaatacactgttcctgcaaatgagcgcacc
tgagagccgacgacacggctgtctattactgt**gcgagagttgctctcctctggttcggggact**
ccacttagactactggggccagggagcctggtcaccgtctcctcag

Aminoácidos VH.2 ;

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFAFTGYGL**NWVRQVPGKLEWVSS**ITAGSSYI**DYAESV
KGRFTISRDNQKNTLFLQMSDLRADDTAVYYC**ARVASPLVRGLHLDY**WGQALVTVSS

FIGURA 25B

Nucleótidos VL

cagtctgtgctgacgcagccgccctcaatgtccggggccccagggcagagggtcaccatctcct
 gcaactgggggc**agctccaacatcggggcaggttatgat**gtgcagtggtagcagcaacttcagg
 agcagcccccaaaactcctcatctat**gctaacgaca**atcggccctcaggggtcctgaccgattc
 tctggctccaagtctggcacctcaggctccctagtcacgctggcctccgggctgaggatgagg
 ctgattactactg**cagtcctatgaccgcaccctgagtgtagtg**ttcggcgaggggaccaagct
 gaccgtcctgg

Aminoácidos VL

QSVLTQPPSMSGAPGQRVTISCTGG**SSNIGAGYD**VQWYQQLPGAAPKLLIY**AND**NRPSGVPDRF
 SSKSGTSGSLVIAGLRAEDEADYYC**QSYDRTLSVVF**GGGTKLTVL

Nucleótidos VH.3 (VH-GL)

gaagtgcagctgggtggaatctggggcgggctgggtcaaacctggcggaagtctgaggctgtcct
 gtgctgctagt**ggettttaaccttagctcctactct**atgaaactgggtgcgacaggcacctggcaa
 gggactggagtggtctcttagt**atctcaagctcctctagttacatc**tactatgctgactccgtg
 aagggccggttcaccatctcaagagataacgcaaaaaatagcctgtatctgcagatgaattccc
 tgagggcagaagacacagccgtgtactattg**gccccggtcgctagccctatggtgccccggct**
gcattttgattattggggacaggaactctgggtgaccgtctcatcc

Aminoácidos VH.3 (VH-GL)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYS**MNWVRQAPGKLEWVSS**ISSSSSYI**YADSV
 KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARVASPMVRGLHFDY**WGQTLVTVSS

Nucleótidos VL.2 (VL-GL)

CAGAGCGTCCTGACCCAGCCACCATCCGTGAGCGGCGCACCCGGCCAGCGAGTGACTATTTCCCT
 GTACCGGCAGT**TCTTCAAACATCGGGCCTGGGTACGAC**GTGCACTGGTATCAGCAGCTGCCTGG
 AACAGCACCTAAGCTGCTGATCTAC**GGGAACAGCA**ATCGGCCATCTGGAGTCCCCGATAGATTC
 AGCGGATCCAAATCTGGCACCAGTGCCTCACTGGCTATTACAGGGCTGCAGGCAGAGGACGAAG
 CCGATTACTATTGCC**CAGAGCTACGATTCATCCCTGAGCGTGGTCT**TTCGGAGGCGGCACAAAAC
 TACTGCTGCTG

Aminoácidos VL.2 (VL-GL)

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSS**SNIGAGYD**VHWHYQQLPGTAPKLLIY**GNS**NRPSGVPDRF
 SSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC**QSYDSSLSVVF**GGGTKLTVL