(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 795 727**

(51) Int. CI.:

A61K 39/42 (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2015 PCT/US2015/011391**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15108967**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2015 E 15737068 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 3094353**

(54) Título: **Anticuerpos específicos del vrs y partes funcionales de los mismos**

(30) Prioridad:

15.01.2014 US 201461927819 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.11.2020

(73) Titular/es:

MEDLMMUNE, LLC (100.0%)
One MedImmune Way
Gaithersburg, MD 20878, US

(72) Inventor/es:

ULBRANDT, NANCY;
KALLEWAARD-LELAY, NICOLE;
YUAN, ANDY Q. y
RICHTER, BETTINA

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

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

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 específicos del vrs y partes funcionales de los mismos

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional n.º de serie 61/927.819, presentada el 15 de enero de 2014.

Campo

Esta solicitud está relacionada con el campo de la biotecnología y de la medicina.

Antecedentes

El virus respiratorio sincicial (VRS) es un virus gripal común que pertenece a la familia de los paramixovirus. El VRS es virulento, se transmite fácilmente y es la causa más común de enfermedades del tracto respiratorio inferior en niños menores de 2 años. Hasta el 98% de los niños que asisten a la guardería, se infecta en una sola estación del VRS. Entre el 0,5% y el 3,2% de los niños con infección por VRS requiere hospitalización. En los Estados Unidos se comunicaron aproximadamente 90.000 hospitalizaciones y 4.500 muertes al año. Los principales factores de riesgo de hospitalización por VRS son nacimiento prematuro, enfermedad pulmonar crónica, enfermedad cardíaca congénita, trastornos inmunitarios y, en niños por lo demás sanos, tener menos de 6 semanas de vida. Hay una necesidad de un tratamiento adicional para la bronquiolitis positiva al VRS además de una asistencia complementaria en forma de nutrición y oxigenoterapia adecuadas. Las terapias antivíricas, tales como el tratamiento con Ribavirina, no han demostrado ser eficaces en la infección por VRS. Para la profilaxis contra la infección por el VRS se ha registrado un anticuerpo monoclonal, palivizumab (también denominado Synagis®). Palivizumab es un anticuerpo monoclonal (humanizado) modificado por ingeniería genética contra la proteína de fusión del VRS. Aunque el palivizumab ha sido un profiláctico muy eficaz, sería ventajoso disponer de anticuerpos y de terapias alternativas que proporcionasen una cobertura adicional contra el VRS.

En el documento US 2012/070446 se desvelan anticuerpos anti-VRS subtipo A con una CI50 de 1,15 ng/ml.

En el documento US 2010/239593 se enseña que el anticuerpo murino D25 anti-VRS forma el punto de partida de los presentes anticuerpos.

En los documentos US 2011/008329 y WO 2006/050166 se enseñan más anticuerpos anti-VRS.

Todos estos anticuerpos se han modificado en los restos 252, 254 y/o 256.

Es un objeto proporcionar medios y métodos para contrarrestar y/o prevenir una infección por el VRS. Es un objeto adicional proporcionar anticuerpos alternativos y/o mejorados contra el VRS, o equivalentes funcionales de dichos anticuerpos, y proporcionar células estables que tengan la capacidad de producir anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos contra el VRS.

Sumario

La presente invención se define en referencia a las reivindicaciones adjuntas a la misma. De acuerdo con la descripción, se proporciona un anticuerpo sintético, recombinante, o aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende al menos los siguientes aminoácidos en la región variable de la cadena pesada que difieren de SEQ ID NO: 7:

Posición relativa a la SEQ ID NO: 7	Aminoácido
28	L
30	E
31	D
37	V

(continuación)

Posición relativa a la SEQ ID NO: 7	Aminoácido
61	G
81	M
82	E
84	S

En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende al menos los siguientes aminoácidos en la región variable de la cadena pesada que difieren de SEQ ID NO: 7:

Posición relativa en la SEQ ID NO: 7	Aminoácido
19	K
23	K
28	T
29	F
30	S
37	V
45	L
81	M
82	E
84	S

En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende al menos los siguientes aminoácidos en la región variable de la cadena pesada que difieren de SEQ ID NO: 7:

Posición relativa en la SEQ ID NO: 7	Aminoácido
30	E
31	D
37	V
61	G
81	M
82	E
84	S

(continuación)

Posición relativa en la SEQ ID NO: 7	Aminoácido
109	R

En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende al menos los siguientes aminoácidos en la región variable de la cadena pesada que difieren de SEQ ID NO: 7:

Posición relativa a la SEQ ID NO: 7	Aminoácido
19	K
23	K
28	L
30	E
31	D
37	V
61	G
77	S
81	M
84	S
98	R

En una realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende al menos los siguientes aminoácidos en la región variable de la cadena pesada que difieren de SEQ ID NO: 7:

Posición relativa a la SEQ ID NO: 7	Aminoácido
19	K
23	K
28	L
30	E
31	D
37	V
61	G
81	M
84	S

En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende al menos los siguientes aminoácidos en la región variable de la cadena pesada que difieren de SEQ ID NO: 7:

Posición relativa a la SEQ ID NO: 7	Aminoácido
19	K
23	K
28	L
30	E
31	D
37	V
61	G
77	S
81	M
82	E
84	S

En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende al menos los siguientes aminoácidos en la región variable de la cadena pesada que difieren de SEQ ID NO: 7:

Posición relativa a la SEQ ID NO: 7	Aminoácido
19	K
23	K
28	L
30	E
31	D
37	V
61	G
77	S
81	M
84	S

En una realización más, la secuencia de la CDR1 de la región variable de cadena pesada comprende DYIIN (SEQ ID NO: 9), la secuencia de la CDR2 de la región variable de cadena pesada comprende GIIPVLGTVHYGPKFQG (SEQ

ID NO: 10) y la secuencia de la CDR3 de la región variable de cadena pesada comprende ETALVVSTYLPHYFDN (SEQ ID NO: 3) o ETALVVSTTYRPHYFDN (SEQ ID NO: 11).

De acuerdo con la invención, la secuencia de la CDR1 de la región variable de cadena ligera comprende QASQDIVNYLN (SEQ ID NO: 4), la secuencia de la CDR2 de la región variable de cadena ligera comprende VASNLET (SEQ ID NO: 5) y la secuencia de la CDR3 de la región variable de cadena ligera comprende QQYDNLP (SEQ ID NO: 6).

En una realización, un anticuerpo sintético, recombinante o aislado, o un fragmento de unión a antígeno, con capacidad de unirse específicamente a un antígeno F del VRS comprende

a. una secuencia de la CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos DYIIN (SEQ ID NO: 9), y
b. una secuencia de la CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GIIPVLGTVHYGPKFQG (SEQ ID NO: 10), y
c. una secuencia de la CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ETALVVSTTYRPHYFDN (SEQ ID NO: 11), y
d. una secuencia de la CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QASQDIVNYLN (SEQ ID NO: 4), y
e. una secuencia de la CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos VASNLET (SEQ ID NO: 5), y
f. una secuencia de la CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QQYDNLP (SEQ ID NO: 6).

En otra realización, un anticuerpo sintético, recombinante o aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, con capacidad de unirse específicamente a un antígeno F del VRS comprende

a. una secuencia de la CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos DYIIN (SEQ ID NO: 9), y
b. una secuencia de la CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GIIPVLGTVHYGPKFQG (SEQ ID NO: 10), y
c. una secuencia de la CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ETALVVSTTYLPHYFDN (SEQ ID NO: 3), y
d. una secuencia de la CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QASQDIVNYLN (SEQ ID NO: 4), y
e. una secuencia de la CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos VASNLET (SEQ ID NO: 5), y
f. una secuencia de la CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QQYDNLP (SEQ ID NO: 6).

En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una región Fc que tiene Y en la posición 252Y, T en la posición 254T y E en la posición 256, donde la numeración corresponde a la del índice EU como en Kabat.

En otra realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, es para su uso en un método para inhibir en un sujeto la infección por VRS, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo o fragmento de unión del mismo descrito en el presente documento.

De acuerdo con las enseñanzas que se describen en el presente documento, se describe en el mismo una secuencia de ácido nucleico sintético, recombinante o aislado que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Objetos y ventajas adicionales se expondrán en parte en la siguiente descripción, y en parte serán obvios a partir de la descripción, o pueden aprenderse con la práctica. Los objetos y las ventajas se realizarán y obtendrán por medio de los elementos y combinaciones particularmente indicados en las reivindicaciones adjuntas.

Ha de entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son únicamente ejemplares y explicativas.

Los dibujos adjuntos, constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran una o varias realizaciones y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios descritos en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y B son una representación de la secuencia para la cadena pesada D25 y varias variantes de cadena pesada (J, L, y LA).

La figura 2 es una representación de la secuencia para la cadena pesada de algunas variantes optimizadas (1G7, 1F5, 2D10).

Las figuras 3A y B son una representación de la secuencia para la cadena pesada de cuatro variantes adicionales de la variante 1G7 optimizada. Para alterar el pI se crearon las variantes (1G7-GLM, B12-1, E3-5, E9-2) incorporando restos de la línea germinal.

Las figuras 4A y B muestran la actividad *in vitro* de D25 y de diversas variantes en un ensayo de microneutralización.

Las figuras 5A y B muestran que D25 y diversas variantes ofrecen protección contra exposición al subtipo A2 del VRS y al subtipo B del VRS.

La Figura 6 muestra los resultados de una exposición al VRS A2 de rata algodonera en animales tratados con 1G7, 1F5, D25 (designado en la figura como D25wt), o sin anticuerpo.

Las figuras 7A y B muestran que 1G7 protege contra el VRS A2 y contra el VRS B9320. Los títulos del VRS en pulmón se representan gráficamente como una función de la concentración en suero de la IgG humana en el momento de la recogida.

Las figuras 8A y B muestran la neutralización tanto del VRS A2 como del VRS B9320 por diversos anticuerpos.

Las figuras 9A y B muestran el epítopo para la unión de 1G7 según se define en mutantes resistentes de anticuerpo monoclonal.

La Figura 10 muestra los resultados de un ensayo de neutralización contra aislados clínicos del VRS.

DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

La Tabla 1 proporciona una lista de determinadas secuencias a las que se hace referencia en las realizaciones actuales.

Tabla 1

Descripción	**Secuencia**	**SEQ ID NO**
D25 HC CDR1	NYIIN	1
D25 HC CDR2	GIIPVLGTVHYAPKFQG	2
D25 HC CDR3	ETALVVSTTYLPHYFDN	3
D25 LC CDR1	QASQDIVNYLN	4
D25 LC CDR2	VASNLET	5
D25 LC CDR3	QQYDNLP	6
Región variable de cadena pesada de D25	10 20 30 40 50 QVQLVQSGAE VKKPGSSV**M**V SC**Q**ASGG**PLR** NYIINW**L**RQA PGQG**P**EWMGG 60 70 80 90 100 IIPVLGTVHY APKFQGRVTI TADEST**D**TAY **IH**L**I**SLRSED TA**M**YYCA**T**ET 110 120 126 ALVVSTTYLP HYFDNWGQGT LVTVSS	7
Región variable de cadena ligera de D25	DIQMTQSPSS LSAAVGDRVT ITCQASQDIV NYLNWYQQKP GKAPKLLIYV ASNLETGVPS RFSGSGSGTD FSLTISSLQP EDVATYYCQQ YDNLPLTFGG GTKVEIKRTV	8

(continuación)

Tabla 1		
HC CDR1 alternativa	DYIIN	9
HC CDR2 alternativa	GIIPVLGTVHYGPKFQG	10
HC CDR3 alternativa	ETALVVSTTYRPHYFDN	11
Región variable de cadena pesada de variante J	QVQLVQSGAE VKKPGSSV**M**V SC**Q**ASGG**PLR** NYIINW**V**RQA PGQG**P**EWMGG IIPVLGTVHY APKFQGRVTI TADEST**D**TAY **ME**L**S**SLRSED TA**M**YYCA**T**ET ALVVSTTYLP HYFDNWGQGT LVTVSS	12
Región variable de cadena pesada de variante L	QVQLVQSGAE VKKPGSSV**M**V SC**Q**ASGG**PLR** NYIINW**V**RQA PGQG**L**EWMGG IIPVLGTVHY APKFQGRVTI TADEST**D**TAY **ME**L**S**SLRSED TA**M**YYCA**T**ET ALVVSTTYLP HYFDNWGQGT LVTVSS	13
Región variable de cadena pesada de variante LA	QVQLVQSGAE VKKPGSSV**K**V SC**K**ASGG**TFS** NYIINW**V**RQA PGQG**L**EWMGG IIPVLGTVHY APKFQGRVTI TADEST**D**TAY **ME**L**S**SLRSED TA**M**YYCA**T**ET ALVVSTTYLP HYFDNWGQGT LVTVSS	14
Región variable de cadena pesada de 1G7	QVQLVQSGAE VKKPGSSV**M**V SC**Q**ASGG**LLE D**YIINW**V**RQA PGQG**P**EWMGG IIPVLGTVHY **G**PKFQGRVTI TADEST**D**TAY **ME**L**S**SLRSED TA**M**YYCA**T**ET ALVVSTTYLP HYFDNWGQGT LVTVSS	15
Región variable de cadena pesada de 1F5	QVQLVQSGAE VKKPGSSV**M**V SC**Q**ASGG**PLE D**YIINW**V**RQA PGQG**P**EWMGG IIPVLGTVHY **G**PKFQGRVTI TADEST**D**TAY **ME**L**S**SLRSED TA**M**YYCA**T**ET ALVVSTTYLP HYFDNWGQGT LVTVSS	16
Región variable de cadena pesada de 2D10	QVQLVQSGAE VKKPGSSV**M**V SC**Q**ASGG**PLE D**YIINW**V**RQA PGQG**P**EWMGG IIPVLGTVHY **G**PKFQGRVTI TADEST**D**TAY **ME**L**S**SLRSED TA**M**YYCA**T**ET ALVVSTTY**R**P HYFDNWGQGT LVTVSS	17
Región variable de cadena pesada de 1G7-GLM	QVQLVQSGAE VKKPGSSV**K**V SC**K**ASGG**LLE D**YIINW**V**RQA PGQG**P**EWMGG IIPVLGTVHY **G**PKFQGRVTI TADEST**S**TAY **MH**L**S**SLRSED TA**M**YYCA**R**ET ALVVSTTYLP HYFDNWGQGT LVTVSS	18

(continuación)

Tabla 1		
Región variable de cadena pesada de B12-1	QVQLVQSGAE VKKPGSSV**K**V SC**K**ASGG**LLE** **D**YIINW**V**RQA PGQG**P**EWMGG IIPVLGTVHY **G**PKFQGRVTI TADEST**D**TAY **MH**L**S**SLRSED TA**M**YYCA**T**ET ALVVSTTYLP HYFDNWGQGT LVTVSS	19
Región variable de cadena pesada de E3-5	QVQLVQSGAE VKKPGSSV**K**V SC**K**ASGG**LLE** **D**YIINW**V**RQA PGQG**P**EWMGG IIPVLGTVHY **G**PKFQGRVTI TADEST**S**TAY **ME**L**S**SLRSED TA**M**YYCA**T**ET ALVVSTTYLP HYFDNWGQGT LVTVSS	20
Región variable de cadena pesada de E9-2	QVQLVQSGAE VKKPGSSV**K**V SC**K**ASGG**LLE** **D**YIINW**V**RQA PGQG**P**EWMGG IIPVLGTVHY **G**PKFQGRVTI TADEST**S**TAY **MH**L**S**SLRSED TA**M**YYCA**T**ET ALVVSTTYLP HYFDNWGQGT LVTVSS	21

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES

I. Anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos

Se proporcionan anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, específicos del VRS, que tienen propiedades mejoradas en comparación con otros anticuerpos. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión a epítopo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')2, Fd, Fvs, Fvs monocatenario (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fvs unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden cualquiera de un dominio VL o VH, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab. En la técnica se conocen moléculas de scFv y se describen, por ejemplo, en la patente de estados unidos 5.892.019. Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo incluidas en esta divulgación pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY) clase (por ejemplo, LgG1, LgG2, LgG3, LgG4, LgA1 e LgA) o subclase de moléculas de inmunoglobulina.

Por ejemplo, los inventores han generado, de manera satisfactoria, anticuerpos específicos del VRS con propiedades mejoradas sobre los anticuerpos específicos del VRS anteriores, incluyendo protección mejorada contra los subtipos A y B del VRS, neutralización mejorada y valores más bajos de CI50. Dichos anticuerpos tienen una afinidad alta o fuerte particular por el VRS y por tanto son particularmente adecuados para contrarrestar y/o prevenir, al menos en parte, una infección por VRS y/o los efectos adversos de una infección por VRS. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, son sinónimos de moléculas de unión específicas del VRS e incluyen anticuerpos de longitud completa o partes de anticuerpos que tienen la capacidad de unirse específicamente al VRS.

A. Anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, con restos no de la línea germinal cambiados por restos de la línea germinal

En una realización, al menos un resto no de la línea germinal de la región variable de cadena pesada de D25 (SEQ ID NO: 7) se cambia por un resto de la línea germinal. En otra realización, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 restos no de la línea germinal de la región variable de cadena pesada de los restos de D25 se conmutan de nuevo a un resto de la línea germinal. En una realización adicional, al menos un resto no de la línea germinal puede cambiarse por un resto de la línea germinal y al menos una posición de la CDR puede modificarse en relación con la SEQ ID NO: 7.

En una realización, la región variable de cadena pesada es al menos 99% idéntica a SEQ NO: 15.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, comprende una secuencia CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende una secuencia que difiere en uno o dos aminoácidos de ETALVVSTTYLPHYFDN (SEQ ID NO: 3) o ETALVSTTYRPHYFDN (SEQ ID NO: 11).

De acuerdo con la invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende todas las CDR idénticas como SEQ ID NO: 8 (cadena ligera).

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende una secuencia de CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende DYIIN (SEQ ID NO: 9).

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, comprende una secuencia de CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende GIIPVLGTVHYGPKFQG (SEQ ID NO: 10).

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, comprende una secuencia de CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende ETALVSTYLPHYFDN (SEQ ID NO: 3) o ETALVSTTYRPHYFDN (SEQ ID NO: 11).

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una secuencia de CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende DYIIN (SEQ ID NO: 9), una secuencia CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende GIIPVLGTVHYGPKFQG (SEQ ID NO: 10), y una secuencia CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende ETALVSTTYLPHYFDN (SEQ ID NO: 3) o ETALVVSTTYRPHYFDN (SEQ ID NO: 11).

De acuerdo con la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una secuencia CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende QASQDIVNYLN (SEQ ID NO: 4), una secuencia CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende VASNLET (SEQ ID NO: 5), y una secuencia CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende QQYDNLP (SEQ ID NO: 6).

De acuerdo con la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una secuencia CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende DYIIN (SEQ ID NO: 9), una secuencia CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende GIIPVLGTVHYGPKFQG (SEQ ID NO: 10), una secuencia CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende ETALVSTTYLPHYFDN (SEQ ID NO: 3) o ETALVSTTYRPHYFDN (SEQ ID NO: 11), una secuencia CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende QASQDIVNYLN (SEQ ID NO: 4), una secuencia CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende VASNLET (SEQ ID NO: 5), y una secuencia CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende QQYDNLP (SEQ ID NO: 6).

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia que es idéntica en las regiones marco conservadas (*framework*) a la SEQ ID NO: 15.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende los siguientes aminoácidos en la región variable de cadena pesada que difieren de la SEQ ID NO: 7:

Tabla 2: Variante J

Posición relativa a la SEQ ID NO: 7	**Aminoácido**
37	V
81	M
82	E
84	S

De acuerdo con la invención, las diferencias proporcionadas en la tabla 2 no son las únicas diferencias de la SEQ ID NO: 7. De acuerdo con la invención, la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 8.

De acuerdo con la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende los siguientes aminoácidos en la región variable de cadena pesada que difieren de la SEQ ID NO: 7:

Tabla 3: variante L	
Posición relativa a la SEQ ID NO: 7	**Aminoácido**
37	V
45	L
81	M
82	E
84	S

De acuerdo con la invención, las diferencias proporcionadas en la Tabla 3 no son las únicas diferencias de la SEQ ID NO: 7. De acuerdo con la invención, la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 8.

De acuerdo con la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende al menos los siguientes aminoácidos en la región variable de cadena pesada que difieren de la SEQ ID NO: 7:

Tabla 4: 1G7	
Posición relativa a la SEQ ID NO: 7	**Aminoácido**
28	L
30	E
31	D
37	V
61	G
81	M
82	E
84	S

De acuerdo con la invención, las diferencias proporcionadas en la Tabla 4 no son las únicas diferencias de la SEQ ID NO: 7. De acuerdo con la invención, la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 8.

De acuerdo con la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, comprende los siguientes aminoácidos en la región variable de cadena pesada que difieren de la SEQ ID NO: 7:

Tabla 5: 1F5	
Posición relativa a la SEQ ID NO: 7	**Aminoácido**
30	E
31	D

(continuación)

Tabla 5: 1F5	
Posición relativa a la SEQ ID NO: 7	**Aminoácido**
37	V
61	G
81	M
82	E
84	S

De acuerdo con la invención, las diferencias proporcionadas en la Tabla 5 no son las únicas diferencias de la SEQ ID NO: 7. De acuerdo con la invención, la región variable de cadena ligera comprende SEQ ID NO: 8.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende los siguientes aminoácidos en la región variable de cadena pesada que difieren de la SEQ ID NO: 7:

Tabla 6: 2D10	
Posición relativa a la SEQ ID NO: 7	**Aminoácido**
30	E
31	D
37	V
61	G
81	M
82	E
84	S
109	R

De acuerdo con la invención, las diferencias proporcionadas en la Tabla 6 no son las únicas diferencias de la SEQ ID NO: 7. De acuerdo con la invención, la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 8.

De acuerdo con la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 15. De acuerdo con la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 99% o 100% idéntica a la secuencia marco conservada (es decir, no CDR) de la SEQ ID NO: 15.

De acuerdo con la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia que es idéntica a la secuencia DIQMTQSPSSLSAAVGDRVTITCQASQDIVNYLNWYQQKPGKAPKLLIYVASNLETGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQ PEDVATYYCQQYDNLPLTFGGGTKVEIKRTV (SEQ ID NO: 8).

En una realización, se aplica una sustitución de aminoácidos conservativa. La sustitución de aminoácidos conservativa implica la sustitución de un aminoácido por otro con propiedades generalmente similares (tamaño, hidrofobicidad, etc.)

de forma que es probable que el funcionamiento general no resulte gravemente afectado.

B. Anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos con CDR mejoradas

De acuerdo con la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende los dos primeros o los tres cambios que se indican en la Tabla 7.

Tabla 7

Posición relativa a la SEQ ID NO: 7	Tipo de cambio	Aminoácido
31	modificación de CDR	D
61	modificación de CDR	G
109	modificación de CDR	R

C. Anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, con semivida mejorada

En una realización, pueden hacerse modificaciones adicionales a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento, para mejorar su semivida. En una realización, en los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden hacerse mutaciones, tales como deleción, adición o sustitución, para mejorar su semivida. En una realización, la región Fc puede mutarse para que incluya una, dos o las tres sustituciones siguientes M252Y, S254T y T256E, en donde la numeración corresponde a la del índice EU como en Kabat. En una realización, la región Fc puede mutarse para que incluya todas las sustituciones siguientes M252Y, S254T y T256E, en donde la numeración corresponde a la del índice EU como en Kabat. Dall'Acqua et al., Properties of Human IgG1s Engineered for Enhanced Binding to the Neonatal Fc Receptor (FcRn), J Biol Chem 281(33):23514-23524 (2006). La realización con las tres sustituciones se denomina variante YTE. Expresado de un modo diferente, en una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene una región Fc que tiene Y en la posición 252Y, T en la posición 254T y E en la posición 256, en donde la numeración corresponde a la del índice EU como en Kabat.

D. Otras características de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos

En cierta realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene un valor de CI50 menor de 10 ng/ml en un ensayo de neutralización *in vitro* donde células HEp-2 se infectan con VRS. En otra realización, el valor de CI50 es de 9 ng/ml, 8 ng/ml, 7 ng/ml, 6 ng/ml, 5 ng/ml, 4 ng/ml, 3 ng/ml o 2 ng/ml o menor para el subtipo A y/o subtipo B del VRS. En una realización, la CI50 se mide en el ensayo de neutralización *in vitro* descrito en los ejemplos, opcionalmente para el VRS A2 y/o VRS B9320.

De acuerdo con la invención, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, son eficaces neutralizando cepas del VRS tanto de subtipo A como de subtipo B.

Como se usa en el presente documento, el término anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, se utiliza en el sentido más amplio. El hombre puede crear dichos anticuerpos monoclonales (mAb) mediante tecnología convencional de hibridoma, tecnología recombinante y/o crear un fragmento de unión a antígeno de los mismos. Pueden incluirse tanto moléculas de inmunoglobulina intactas, por ejemplo, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal (mAb), un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo poliespecífico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo animal (por ejemplo, un anticuerpo de camélido), anticuerpos quiméricos, así como partes, fragmentos, regiones, péptidos y derivados de los mismos (proporcionados por cualquier técnica conocida, tal como, pero no limitado a, escisión enzimática, síntesis peptídica, o técnicas recombinantes), tales como, por ejemplo, inmunoglobulina desprovista de cadenas ligeras, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, scFv, fragmento de anticuerpo, diacuerpo, Fd, regiones CDR, o cualquier parte o secuencia peptídica del anticuerpo que tenga la capacidad de unirse a un antígeno o a un epítopo. En una realización, el fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo monocatenario, un fragmento variable monocatenario (scFv), un fragmento Fab o un fragmento $F(ab')_2$.

Se dice que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene "la capacidad de unirse" a una molécula si tiene la capacidad de reaccionar específicamente con la molécula para unir de este modo la molécula con el

anticuerpo. Los fragmentos o partes de los anticuerpos pueden carecer del fragmento Fc del anticuerpo intacto, eliminarse más rápidamente de la circulación y pueden tener una unión tisular menos inespecífica en comparación con un anticuerpo intacto. Pueden producirse ejemplos de anticuerpos a partir de anticuerpos intactos utilizando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante escisión proteolítica con enzimas tales como papaína (para producir fragmentos F(ab) o pepsina (para producir fragmentos $F(ab')_2$). Pueden prepararse partes de anticuerpos mediante cualquiera de los métodos anteriores, o expresando una parte de la molécula recombinante. Por ejemplo, puede aislarse una o más regiones CDR de un anticuerpo recombinante y subclonarse en un vector de expresión apropiado.

En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo humano o un fragmento de anticuerpo humano. El uso de anticuerpos humanos para la terapia humana puede disminuir el riesgo de efectos secundarios debido a una reacción inmunológica en un individuo humano contra secuencias no humanas. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, está humanizado. En otra realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo quimérico. De esta manera, secuencias de interés, tales como, por ejemplo, un sitio de unión de interés, pueden incluirse en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización, el anticuerpo puede tener un isotipo IgG, IgA, IgM, o IgE. En una realización, el anticuerpo es una IgG.

II. Ácidos nucleicos que codifican anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos

Las presentes enseñanzas desvelan además una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que codifica cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos anteriormente en la sección I.A o I.B. Dicho ácido nucleico se aísla, por ejemplo, de un linfocito B que tiene la capacidad de producir un anticuerpo o parte funcional. Dichos ácidos nucleicos codifican las secuencias de cadena pesada y ligera expuestas en el presente documento. De manera alternativa, dichos ácidos nucleicos codifican las secuencias de cadena pesada y ligera que comprenden las CDR de cadena pesada y ligera, respectivamente, expuestas en el presente documento. En algunas enseñanzas, los ácidos nucleicos codificarán partes funcionales de los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos descritos en el presente documento. Debido a la degeneración del código de los ácidos nucleicos, los ácidos nucleicos múltiples codificarán el mismo aminoácido y todos están incluidos en el presente documento

III. Métodos de uso

A. Métodos de uso de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos

En una realización, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, puede usarse en un método de tratamiento o como un medicamento. El método puede usarse para contrarrestar o al menos prevenir en parte una infección por VRS o para contrarrestar o prevenir al menos en parte los efectos adversos de una infección por VRS. El método también comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento. En una realización, el individuo que lo necesite es un paciente humano.

En una realización, con el fin de contrarrestar el VRS, antes de producirse una infección por VRS, a un individuo se le puede administrar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, en otras palabras, como un agente profiláctico. Como alternativa, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo pueden administrarse cuando un individuo ya está infectado por el VRS. Dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo pueden administrarse a individuos con mayor riesgo de infección por VRS, tal como por, ejemplo, bebés prematuros, individuos con enfermedad pulmonar crónica, cardiopatía congénita y/o inmunidad comprometida, bebés con menos de 6 semanas. Los bebés prematuros incluyen bebés tanto de un año como de dos y más mayores que siguen estado en riesgo de infección por VRS. Asimismo, las personas de edad avanzada tienen un mayor riesgo de infección por VRS y pueden por tanto recibir la administración en función del riesgo. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, también pueden administrarse a individuos que anteriormente han tenido una infección por VRS.

Para la aplicación terapéutica, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se combinan típicamente con un vehículo, adyuvante, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se combinan con agua para inyección. En otra realización, se preparan en una solución líquida estéril, sin conservantes, con histidina, glicina y cloruro. En otra realización, los ejemplos de vehículos adecuados comprenden, por ejemplo, hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), albúmina de suero (por ejemplo, BSA y RSA) y ovoalbúmina. En otra realización, dicho vehículo adecuado comprende una solución, como por ejemplo, solución salina. En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se proporcionan en una forma liofilizada y se mezclan con agua para inyección antes de la administración.

B. Métodos de uso de los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos

En otra enseñanza más, puede administrarse un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Después de la administración de dicho ácido nucleico, la maquinaria del huésped produce los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos tienen la capacidad de prevenir y/o contrarrestar una infección por VRS y/o los efectos adversos de una infección por VRS.

IV. Métodos de preparación de los anticuerpos y de los fragmentos de unión a antígeno de los mismos

También se enseña un anticuerpo aislado que tiene la capacidad de producir un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento, pueden fabricarse a partir de un hibridoma que segrega el anticuerpo o a partir de una célula producida de manera recombinante que se ha transformado o transfectado con uno o más genes que codifican el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Una enseñanza incluye un método para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo mediante el cultivo de células huésped en condiciones en las que un ácido nucleico se expresa para producir el anticuerpo, seguido de la recuperación del anticuerpo. Para expresar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede usarse una variedad de líneas celulares, incluyendo, pero no limitado a, líneas celulares de mamíferos. En una enseñanza, las líneas celulares pueden ser humanas. En otra enseñanza, pueden usarse líneas celulares bacterianas o de insectos. En una enseñanza, las líneas celulares incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), variantes de células CHO (por ejemplo, DG44), células 293 y células NSO. En otra realización, las líneas celulares incluyen células VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293F, 293T, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O y T47D, CRL7O3O y HsS78Bst.

La expresión recombinante utiliza la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido, para la producción del anticuerpo puede producirse un vector con tecnología de ADN recombinante muy conocida en la técnica. Los vectores de expresión pueden incluir señales de control de la traducción y de la transcripción apropiadas. Esto puede lograrse usando técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. En una realización, un vector replicable comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo unida operativamente a un promotor heterólogo.

Para expresar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, puede usarse una variedad de sistemas de vectores de expresión en huéspedes, como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 5.807.715. Por ejemplo, un sistema de expresión eficaz para anticuerpos son células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector, tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano (Foecking et al, Gene, 45: 101 (1986); y Cockett et al, Bio/Technology, 8: 2 (1990)). Además, puede seleccionarse una cepa de una célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de las proteínas. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína de la invención pueden seleccionarse líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados. Para este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, la glucosilación y la fosforilación del producto génico.

En sistemas bacterianos, dependiendo del uso previsto para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, a expresarse, pueden seleccionarse diversos vectores de expresión. Por ejemplo, cuando para la generación de composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, hay que producir una gran cantidad de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de altos niveles de productos de proteínas de fusión que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, el vector de expresión pUR278 de *E. coli* (Ruther et al, EMBO., 12: 1791 (1983)), en el que la secuencia codificante puede ligarse individualmente en el vector en fase con la región codificante lac Z, de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem., 24:5503-5509 (1989)); y similares. También pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de células lisadas por adsorción y unión a la matriz de afinidad de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para introducir un trombina y/o sitios de escisión de proteasa del factor Xa el polipéptido expresado, de modo que el producto génico diana clonado pueda liberarse del residuo GST.

En un sistema de insecto, se usó el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños. El virus se desarrolla en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica la proteína puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).

En células huésped de mamífero, pueden utilizarse diversos sistemas de expresión víricos. En los casos en que se use un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de interés puede ligarse a un complejo de adenovirus de control de la transcripción/traducción, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede después insertarse en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, región E1 o E3) producirá un virus recombinante que es viable y que tiene la capacidad de expresar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en huéspedes infectados (véase, por ejemplo, Logan y Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 81: 355-359 (1984)). También pueden ser necesarias señales de inicio específicas para la traducción eficaz de las secuencias insertadas que codifican el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. Además, para garantizar la traducción de todo el inserto, el codón de inicio debe estar generalmente en fase con la fase de lectura de la secuencia codificante deseada. Estas señales de control de la traducción exógenas y codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse incluyendo elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, apropiados, etc. (Véase, por ejemplo, Bittner et al, Methods in Enzymol., 153: 51-544 (1987)).

Para la producción a largo plazo, de alto rendimiento, de proteínas recombinantes, puede usarse expresión estable. Por ejemplo, pueden generarse líneas celulares que expresen de manera estable la molécula proteica. Las células huésped pueden transformarse con un vector modificado apropiadamente por ingeniería genética que comprenda elementos de control (por ejemplo, un promotor, potenciador, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un gen marcador de selección. Después de la introducción del ADN extraño, se puede dejar que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido y, a continuación, cambiarse a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas para crecer y formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Pueden usarse plásmidos que codifiquen un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para introducir el gen/ADNc en cualquier línea celular adecuada para su producción en un cultivo.

Pueden usarse diversos sistemas de selección, incluyendo pero sin limitación, los genes de timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al, Cell, 11: 223 (1977)), de hipoxantinaguanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 202 (1992)) y de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al, Cell, 22: 8-17 (1980)) que pueden emplearse en células tk-, hgprt o aprT, respectivamente. Asimismo, como base de selección para los siguientes genes puede usarse la resistencia antimetabolito: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al, Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Wu y Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993) y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993); May, TIB TECH 11(5):155-2 15 (1993)); e higro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al, Gene, 30:147 (1984)). Pueden aplicarse métodos habituales, comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante, para seleccionar el clon recombinante deseado, y dichos métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel et al. (des.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (des.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley y Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol, 150:1.

Una vez que se ha producido un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo por expresión recombinante, este puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, particularmente por afinidad por los antígenos específicos Proteína A o Proteína G, y cromatografía por tamaño en columna), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional de purificación de proteínas. Además, para facilitar la purificación, las proteínas de la presente invención o los fragmentos de unión a antígeno de las mismas, pueden fusionarse con las secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en el presente documento o, de otra manera, conocidas en la técnica.

En algunas enseñanzas, se generan células productoras de anticuerpos específicos de VRS que son estables durante al menos seis meses. En otra enseñanza, una célula productora de anticuerpos específicos de VRS es estable durante al menos nueve semanas, durante al menos tres meses o durante al menos seis meses. En otra enseñanza, los métodos alternativos para preparar anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos son muy conocidos en la técnica y se describen, al menos, en la patente de Estados Unidos No. 8.562.996.

Ahora se hará referencia en detalle a las presentes realizaciones ejemplares, cuyos ejemplos se ilustran en los dibujos adjuntos. Siempre que sea posible, en todos los dibujos se usarán los mismos números de referencia para referirse a las mismas partes o a partes similares. Otras realizaciones serán obvias para los expertos en la técnica teniendo en

cuenta la memoria descriptiva y realización práctica desvelada en el presente documento. En los siguientes ejemplos se amplían las explicaciones de las realizaciones. Estos ejemplos no limitan el alcance de las reivindicaciones, sino que simplemente sirven para aclarar determinadas realizaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación y expresión de anticuerpos monoclonales

Los fragmentos de ADN de la cadena ligera variable (VL) y de la cadena pesada variable (VH) de la inmunoglobulina 1G7, conteniendo cada una mutaciones deseadas que mejoran la fuerza del anticuerpo, se insertaron en un vector de expresión de IgG1 humana que contenía la región constante ligera kappa y la región constante pesada de IgG1 CH1-bisagra-CH2-CH3. Para expresar el anticuerpo 1G7, células renales embrionarias humanas, 293-F, se transfectaron de manera transitoria con el vector que contenía 1G7 usando el reactivo 293Fectin™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se cultivaron a 37 °C, a 120 rpm con CO_2 al 5% y con una humedad del 80%. Los medios de cultivo se suministraron el segundo día añadiendo medios del mismo volumen y se recogieron 10 días después de la transfección. El sobrenadante se filtró estéril para eliminar células y desechos. La IgG se purificó usando una columna de proteína A (columna Hi-trap de proteína A, Sigma) y la proteína eluida se dializó frente a PBS durante una noche a 4 °C. La concentración de IgG se determinó por cuantificación de proteínas en NanoDrop (Thermo Scientific).

Para producir los otros anticuerpos se adoptó la misma estrategia.

Ejemplo 2. Ensayo de microneutralización *in vitro*

Los ensayos de microneutralización se realizaron de la siguiente manera. Resumiendo, en placas de microtitulación de 384 pocillos, se introdujeron diluciones en serie con factor 2 de mAb en medio de cultivo celular HEp-2 a un volumen de 15 µl/pocillo. Posteriormente, 15 µl de cualquiera de los virus del VRS A2 o VRS B 9320 se diluyeron en medio de cultivo celular HEp-2 a una concentración que variaba de 80 a 150 ufp/pocillo y se añadió a cada pocillo incluyendo pocillos de control que contenían solo medio de cultivo celular HEp-2, y las placas se incubaron durante 1,5 horas a 37 °C con CO_2 al 5%. A cada pocillo se añadieron células HEp-2 a 2,5 x 10^5 células/ml en 30 µl y las placas se incubaron a 37 °C con CO_2 al 5%. Después de 3 días, para el VRS A2, o de 4 días, para el VRS B9320, se retiró el medio y para fijar las células se añadieron 30 µl de acetona al 80%/PBS al 20% enfriado con hielo.

La replicación de los virus se midió con el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando un mAb anti-F del VRS conjugado con peroxidasa de rábano picante dirigido el sitio C de la proteína F del VRS (1331H) (Beeler y Van Wyck Coelingh, J Virol. 63 (7): 2941 -2950 (1989). El mAb 1331H se diluyó en PBS a 1:6.000 y a cada pocillo se añadieron 30 µl. Después de dos horas de incubación a 37 °C, las placas se lavaron tres veces con PBS-T. A cada pocillo se añadieron 30 µl de TMB peroxidasa y las placas se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se detuvo añadiendo a cada pocillo 15 µl de H_2SO_4 2N. La renovación del sustrato se midió monitorizando la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplaca. Los valores de CI50 se calcularon usando un algoritmo de ajuste no lineal en Graphpad Prism usando el log (inhibidor) frente a la respuesta con ajuste de curva con pendiente variable y representando la concentración de mAb necesaria para una reducción del 50% en la absorbancia medida a 450 nm.

En la figura 4 se proporcionan los resultados, donde se observa que cada uno de 1G7, 1F5, 2D10 y D25 inhibió la replicación del VRS A2 y B9320 en la microneutralización. 1G7 fue el más eficaz, seguido de 1F5, 2D10, y después D25.

Ejemplo 3. Modelo de VRS en rata algodonera

A) Comparación de la capacidad de las variantes D25, J, L y LA para proteger contra exposición al VRS

Los animales recibieron una dosis de 0,1 ml de anticuerpo por inyección intramuscular en los distintos niveles de dosificación indicados en la figura. Veinticuatro horas más tarde, los animales se anestesiaron usando una cámara de isoflurano y se infectaron mediante instilación intranasal de 1 × 10^6 ufp/animal de la cepa A2 del VRS. Cuatro días después, los animales se sacrificaron por asfixia con dióxido de carbono; sus pulmones se extirparon con cirugía, se separaron y se congelaron en nitrógeno líquido o se procesaron inmediatamente. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca en el momento del sacrifico.

Para evaluar el efecto de la administración del mAb sobre la replicación del VRS en los pulmones de ratas algodoneras, en cada grupo de dosis se determinó el título vírico del VRS en homogeneizados de pulmón de rata algodonera. Para ello, los pulmones extirpados se homogeneizaron individualmente en 10 partes (peso/volumen) de solución salina equilibrada de Hanks más fosfato de sacarosa usando un homogeneizador tisular Fast Prep 24 durante 20 segundos con tubos TeenALysing Matrix a temperatura ambiente. Las suspensiones resultantes se centrifugaron a 930 ×g durante 10 min at 4°C, los sobrenadantes de recogieron y se conservaron a -80°C hasta su análisis. Las muestras de

homogeneizado de pulmón se diluyeron a 1:10 y 1:100 en medio de cultivo, y 50 µl de cualquiera de las muestras de homogeneizado de pulmón sin diluir o diluido se añadieron a pocillos duplicados de células HEp-2 que se habían sembrado en placas de 24 pocillos a una densidad de 2,5 × 10^5 células/pocillo, 24 horas antes de la inoculación. Después de 1 hora de incubación a 37ºC con CO_2 al 5%, el inóculo se sustituyó por medido de cultivo que contenía metilcelulosa al 08% y las células se incubaron a 37˚C con CO_2 al 5%. Cinco días después, se eliminó el recubrimiento, y las células se fijaron y se inmunotiñeron con un anticuerpo policlonal de cabra anti-VRS seguido de un anticuerpo secundario anti-HRP de cabra. Las placas de visualizaron por reacción con reactivo AEC. Las placas se cuantificaron al microscopio usando un objetivo de 10 aumentos. El límite de detección en este ensayo fue de 200 ufp/g de tejido. Para llevar a cabo los análisis estadísticos, se designaron muestras con un título vírico por debajo del límite de detección (<200 ufp/g) a 100 ufp/g (la mitad del límite de detección inferior). En la figura 5 se proporcionan resultados que demuestran que las variantes J, L y LA son más eficaces que D25 protegiendo contra la exposición al VRS A, pero que las variantes L y LA fueron menos eficaces protegiendo contra los subtipos B del VRS (comportándose L mejor contra una cepa B en comparación con el resto). Basándose en estos datos, la variante J se seleccionó como el punto de partida para una optimización adicional.

B) Comparación de la capacidad de las variantes 1G7, 1F5 y D25 en la protección contra la exposición al VRS

Para comparar la capacidad de 1G7, 1F5 y D25 en la protección contra la exposición al VRS se usó el modelo descrito anteriormente en la parte (A) de este ejemplo. Los animales recibieron dosis de 2 mg/kg, 1 mg/kg, 0,5 mg/kg y 0,25 mg/kg. En la figura 6 se muestran los resultados. Los datos muestran que 1G7 se comportó mejor que 1F5 protegiendo contra la exposición al VRS, aunque ambos pudieron reducir el título de los virus al límite de detección. Tanto 1G7 como 1F5 se comportaron mejor que D25.

C) Evaluación detallada de la variante 1G7

Se usó el mismo modelo de rata algodonera que el descrito en la sección (A) anterior. Cada animal recibió 0,1 ml de anticuerpo, variando las concentraciones del presente anticuerpo, como se indica en la figura 7. La variante 1G7 demostró una relación de respuesta a la dosis con el título del VRS en los pulmones tanto para el VRS A2 como para el VRS B9320.

D) Comparación de la capacidad de las variantes para neutralizar el VRS A2 y el VRS B9320

Se usó el mismo modelo de rata algodonera que el descrito en la sección (A) anterior.

Las concentraciones de la IgG humana en muestras de suero de rata algodonera el día que se extirparon los pulmones se determinaron usando un método ELISA. En este ensayo los anticuerpos humanos se capturaron con un anticuerpo de cabra contra ser humano unido a placas de microtitulación. Durante una noche, placas de microtitulación Nunc Maxisorp de 384 pocillos se recubrieron con el anticuerpo de cabra contra IgG humana (H + L) (0,5 µg/ml en 1× PBS) a una temperatura de 4 °C en un volumen de 30 µl. Las placas se lavaron y después se bloquearon con 60 µl de una solución de PBS + suero de cabra termoinactivado al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente. El tampón de bloqueo se retiró y las muestras se aplicaron de la siguiente manera: Para la curva patrón, se usó una dilución en serie de factor 2 del anticuerpo humano convencional diluido en tampón de ensayo con un intervalo de concentración de 500 ng/ml a 0,488 ng/ml. Las curvas patrón se ajustaron usando un ajuste de curva de 4 parámetros.

En la figura 8 se proporcionan los resultados que muestran que las variantes descritas en el presente documento tienen valores de CI50 inferiores a los de D25 neutralizando el VRS tanto A2 como B9320. Esto también demuestra que no hubo pérdida de actividad contra el virus A2 o B9320, observándose un aumento de la actividad con E9-2 y B12-1 y sólo una pérdida de actividad nominal contra el virus B9320 con 1G7 GLM y E3-5.

Ejemplo 4. Epítopo según la definición de mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales

Se aislaron mutantes de virus del VRS A y B realizando pases tres veces en presencia de 250 ng/ml de 1G7-YTE. 1G7-YTE es el anticuerpo 1G7 con la mutación YTE descrita anteriormente en la sección I.C anterior. Después del último pase, se determinó la secuencia de la proteína F del VRS. Las mutaciones corresponden a regiones que previamente se definieron en la estructura co-cristalina de la proteína F del VRS con el anticuerpo parental D25. Todos los mutantes resistentes contenían cambios en la región de la proteína F del VRS en la región F1 entre los aminoácidos 200-213. Las mutaciones secundarias en la posición 294 no mostraron potenciar la resistencia y no fueron más resistentes que las que tenían una sola mutación en la región entre los aminoácidos 200-213. Las mutaciones secundarias en la región F2 del fondo de la mutación N208S produjeron resistencia potenciada. En la figura 9 se proporcionan los resultados.

Ejemplo 5. Neutralización contra aislados clínicos del VRS

Se realizó un ensayo de neutralización preincubando virus aislados clínicos expandidos con una serie de diluciones

de los anticuerpos antes de la infección de células HEp2. La infección de las células se midió como una función de la expresión de la proteína F en la superficie de las células. Los valores de CI50 se calcularon por ajuste no lineal de curvas de neutralización. La replicación vírica se midió como en el ejemplo 2 (ensayo de microneutralización *in vitro*).

En la figura 10 se proporcionan los resultados. Ambos valores de CI50 para 1G7 y 1F5 son inferiores a los de D25 para neutralizar aislados de A o aislados de B del VRS en células HEp2.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MEDIMMUNE, LLC

<120> ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DEL VRS Y PARTES FUNCIONALES DE LOS MISMOS

<130> RSVNG-103WO1

<150> 61/927.819
<151> 15-01-2014

<160> 21
<170> PatentIn versión 3,5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada de D25

<400> 1

Asn Tyr Ile Ile Asn
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR2 de cadena pesada de D25

<400> 2

Gly Ile Ile Pro Val Leu Gly Thr Val His Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR3 de cadena pesada de D25

<400> 3

Glu Thr Ala Leu Val Val Ser Thr Thr Tyr Leu Pro His Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Asn

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena ligera de D25

<400> 4

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Val Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR2 de cadena ligera de D25

<400> 5

Val Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR3 de cadena ligera de D25

<400> 6

Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro
1 5

<210> 7
<211> 126
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región variable de cadena pesada de D25

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> M también puede ser K

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)
<223> Q también puede ser K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> P también puede ser T o L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> L también puede ser F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> R también puede ser S o E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> N también puede ser D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (37)..(37)
<223> L también puede ser V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(45)
<223> P también puede ser L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (61)..(61)
<223> A también puede ser G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (77)..(77)
<223> D también puede ser S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (81)..(81)
<223> I también puede ser M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (82)..(82)
<223> H también puede ser E o H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (84)..(84)
<223> I también puede ser S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (98)..(98)
<223> T también puede ser R

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (109)..(109)
<223> L también puede ser R

<400> 7

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

Ser Val Met Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gly Pro Leu Arg Asn Tyr
            20                  25                  30

Ile Ile Asn Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Ile Pro Val Leu Gly Thr Val His Tyr Ala Pro Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Ile His Leu Ile Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Thr Glu Thr Ala Leu Val Val Ser Thr Thr Tyr Leu Pro His Tyr
            100                 105                 110

Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 8
<211> 110
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región variable de cadena ligera de D25

<400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Val Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Val Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada alternativa

<400> 9

Asp Tyr Ile Ile Asn
1 5

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR2 de cadena pesada alternativa

<400> 10

Gly Ile Ile Pro Val Leu Gly Thr Val His Tyr Gly Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 11
<211> 17
<212> PRT

<213> artificial

<220>
<223> CDR3 de cadena pesada alternativa

<400> 11

```
Glu Thr Ala Leu Val Val Ser Thr Thr Tyr Arg Pro His Tyr Phe Asp
1               5                   10                  15

Asn
```

<210> 12
<211> 126
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región variable de cadena pesada de la variante J

<400> 12

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

Ser Val Met Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gly Pro Leu Arg Asn Tyr
            20                  25                  30

Ile Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Ile Pro Val Leu Gly Thr Val His Tyr Ala Pro Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Thr Glu Thr Ala Leu Val Val Ser Thr Thr Tyr Leu Pro His Tyr
            100                 105                 110

Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 13
<211> 126
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región variable de cadena pesada de la variante L

<400> 13

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

Ser Val Met Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gly Pro Leu Arg Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Val Leu Gly Thr Val His Tyr Ala Pro Lys Phe

    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Thr Glu Thr Ala Leu Val Val Ser Thr Thr Tyr Leu Pro His Tyr
            100                 105                 110

Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 14
<211> 126
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región variable de cadena pesada de la variante LA

<400> 14

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Val Leu Gly Thr Val His Tyr Ala Pro Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Thr Glu Thr Ala Leu Val Val Ser Thr Thr Tyr Leu Pro His Tyr
            100                 105                 110

Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 15
<211> 126
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región variable de cadena pesada de 1G7

<400> 15

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

Ser Val Met Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gly Leu Leu Glu Asp Tyr
            20                  25                  30

Ile Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Ile Pro Val Leu Gly Thr Val His Tyr Gly Pro Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Thr Glu Thr Ala Leu Val Val Ser Thr Thr Tyr Leu Pro His Tyr
            100                 105                 110

Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 16
<211> 126
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región variable de cadena pesada de 1F5

<400> 16

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

Ser Val Met Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gly Pro Leu Glu Asp Tyr
            20                  25                  30

Ile Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Ile Pro Val Leu Gly Thr Val His Tyr Gly Pro Lys Phe
```

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Glu Thr Ala Leu Val Val Ser Thr Thr Tyr Leu Pro His Tyr
100 105 110

Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 17
<211> 126
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región variable de cadena pesada de 2D10

<400> 17

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

Ser Val Met Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gly Pro Leu Glu Asp Tyr
20 25 30

Ile Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Val Leu Gly Thr Val His Tyr Gly Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Glu Thr Ala Leu Val Val Ser Thr Thr Tyr Arg Pro His Tyr
100 105 110

Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 18

<211> 126
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región variable de cadena pesada de 1G7-GLM

<400> 18

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Leu Leu Glu Asp Tyr
            20                  25                  30

Ile Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Ile Pro Val Leu Gly Thr Val His Tyr Gly Pro Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met His Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Thr Ala Leu Val Val Ser Thr Thr Tyr Leu Pro His Tyr
            100                 105                 110

Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 19
<211> 126
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región variable de cadena pesada de B12-1

<400> 19

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Leu Leu Glu Asp Tyr
            20                  25                  30

Ile Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Ile Pro Val Leu Gly Thr Val His Tyr Gly Pro Lys Phe

    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met His Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Thr Glu Thr Ala Leu Val Val Ser Thr Thr Tyr Leu Pro His Tyr
            100                 105                 110

Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 20
<211> 126
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región variable de cadena pesada de E3-5

<400> 20

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Leu Leu Glu Asp Tyr
            20                  25                  30

Ile Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Ile Pro Val Leu Gly Thr Val His Tyr Gly Pro Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Thr Glu Thr Ala Leu Val Val Ser Thr Thr Tyr Leu Pro His Tyr
            100                 105                 110

Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 21
<211> 126
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región variable de cadena pesada de E9-2

<400> 21

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Leu Leu Glu Asp Tyr
            20                  25                  30

Ile Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Ile Pro Val Leu Gly Thr Val His Tyr Gly Pro Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met His Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Thr Glu Thr Ala Leu Val Val Ser Thr Thr Tyr Leu Pro His Tyr
            100                 105                 110

Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une específicamente al virus respiratorio sincicial (VRS) y es eficaz neutralizando cepas del VRS tanto de subtipo A como de subtipo B y comprende una región variable de cadena pesada que es al menos 98% idéntica a la SEQ ID NO: 15 y una región variable de cadena ligera que es idéntica a la SEQ ID NO: 8, en donde la secuencia de la CDR1 de la región variable de cadena pesada comprende DYIIN (SEQ ID NO: 9), la secuencia de la CDR2 de la región variable de cadena pesada comprende GIIPVLGTVHYGPKFQG (SEQ ID NO: 10) y la secuencia de la CDR3 de la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es idéntica o difiere en uno o dos aminoácidos de ETALVVSTYLPHYFDN (SEQ ID NO: 3) o ETALVVSTTYRPHYFDN (SEQ ID NO: 11), y en donde la región variable de cadena pesada comprende además los siguientes aminoácidos que difieren de SEQ ID NO: 7:

Posición relativa a la SEQ ID NO: 1	Aminoácido
30	E
31	D
37	V
61	G
81	M
82	E
84	S

2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena pesada que es al menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 15.

3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de mismo, comprende un isotipo de IgG1 humana y comprende una región Fc que comprende Y en la posición 252, T en la posición 254 y E en la posición 256, en donde la numeración corresponde a la del índice EU como en Kabat.

4. El fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en donde el fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monocatenario, un fragmento variable monocatenario (scFv), un fragmento Fab o un fragmento F(ab')2.

5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquier reivindicación anterior, para su uso en un método de prevención o tratamiento de infección por VRS.

Figura 1A

Secuencia de cadena pesada D25

```
                      *   *    ***       *        *
QVQLVQSGAEVKKPGSSVMVSCQASGGPLRNYIINWLRQAPGQGPEWMGGIIPVLGTVHY
                     *   ** *         *    *
APKFQGRVTITADESTDTAYIHLISLRSEDTAMYYCATETALVVSTTYLPHYFDNWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 7)
```

- Las CDR se subrayan en D25
- Los restos no de linea germinal se indican con * encima
- Los restos intercambiados se indican con ^encima

Variante J

```
                      *   *    ***       ^        *
QVQLVQSGAEVKKPGSSVMVSCQASGGPLRNYIINWVRQAPGQGPEWMGGIIPVLGTVHY
                     *   ^^ ^         *    *
APKFQGRVTITADESTDTAYMELSSLRSEDTAMYYCATETALVVSTTYLPHYFDNWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 12 )
```

Figura 1B

Variante L

```
                    *   *    ***      ^       ^
QVQLVQSGAEVKKPGSSVMVSCQASGGPLRNYIINWVRQAPGQGLEWMGGIIPVLGTVHY
                 *   ^^ ^        *    *
APKFQGRVTITADESTDTAYMELSSLRSEDTAMYYCATETALVVSTTYLPHYFDNWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 13 )
```

Variante LA

```
                    ^   ^    ^^^      ^       ^
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYIINWVRQAPGQGLEWMGGIIPVLGTVHY
                 *   ^^ ^        *    *
APKFQGRVTITADESTDTAYMELSSLRSEDTAMYYCATETALVVSTTYLPHYFDNWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 14 )
```

Figura 2

Variantes optimizadas

1G7
```
                *   *    #*##     ^       *
QVQLVQSGAEVKKPGSSVMVSCQASGGLLEDYIINWVRQAPGQGPEWMGGIIPVLGTV
  #             *   ^^ ^         *    *
HYGPKFQGRVTITADESTDTAYMELSSLRSEDTAMYYCATETALVVSTTYLPHYFDNW
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 13)
```
1F5
```
                *   *    **##     ^       *
QVQLVQSGAEVKKPGSSVMVSCQASGGPLEDYIINWVRQAPGQGPEWMGGIIPVLGTV
  #             *   ^^ ^         *    *
HYGPKFQGRVTITADESTDTAYMELSSLRSEDTAMYYCATETALVVSTTYLPHYFDNW
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14)
```
2D10
```
                *   *    **##     ^       *
QVQLVQSGAEVKKPGSSVMVSCQASGGPLEDYIINWVRQAPGQGPEWMGGIIPVLGTV
  #             *   ^^ ^         *    *          #
HYGPKFQGRVTITADESTDTAYMELSSLRSEDTAMYYCATETALVVSTTYRPHYFDNW
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 15)
```

Los restos con * encima son los restos no de linea germinal
Los restos con ^ encima son los restos intercambiados en la linea germinal
Los restos con # encima son los cambios que aumentan la actividad *in vitro*

Figura 3A

1G7-GLM (pI 7.31)

~ ~

QVQLVQSGAEVKKPGSSV**K**VSC**K**ASGGLLEDYIINWVRQAPGQGPEWMGGIIPVLG

~ ~ ~

TVHYGPKFQGRVTITADEST**S**TAYM**H**LSSLRSEDTAMYYCA**R**ETALVVSTTYLPHY
FDNWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 18)

B12-1 (pI 6.97)

~ ~

QVQLVQSGAEVKKPGSSV**K**VSC**K**ASGGLLEDYIINWVRQAPGQGPEWMGGIIPVLG

~

TVHYGPKFQGRVTITADEST**D**TAYM**H**LSSLRSEDTAMYYCA**T**ETALVVSTTYLPHY
FDNWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 19)

Los restos señalados con ~ encima representan modificaciones hechas en 1G7 para alterar el pI incorporando restos de la linea germinal

Figura 3B

E3-5 (pI 6.94)

QVQLVQSGAEVKKPGSSV**K**VSC**K**ASGGLLEDYIINWVRQAPGQGPEWMGGIIPVLG
TVHYGPKFQGRVTITADEST**S**TAYM**E**LSSLRSEDTAMYYCA**T**ETALVVSTTYLPHY
FDNWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 20)

E9-2 (pI 7.13)

QVQLVQSGAEVKKPGSSV**K**VSC**K**ASGGLLEDYIINWVRQAPGQGPEWMGGIIPVLG
TVHYGPKFQGRVTITADEST**S**TAYM**H**LSSLRSEDTAMYYCA**T**ETALVVSTTYLPHY
FDNWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 21)

Figura 4

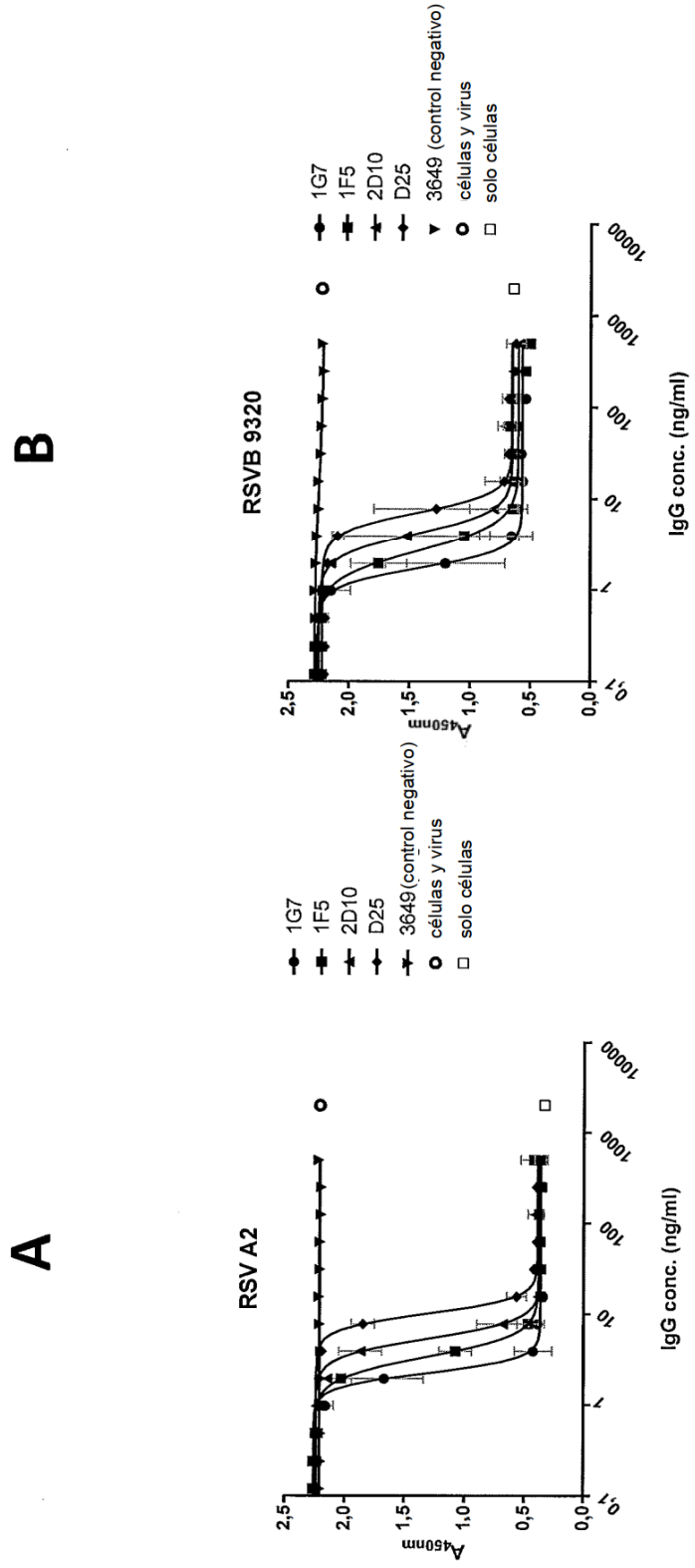
A
B
RSV A2
RSVB 9320
1G7
1F5
2D10
D25
3649 (control negativo)
células y virus
solo células
A450nm
IgG conc. (ng/ml)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,1
1
10
100
1000
10000

Figura 5

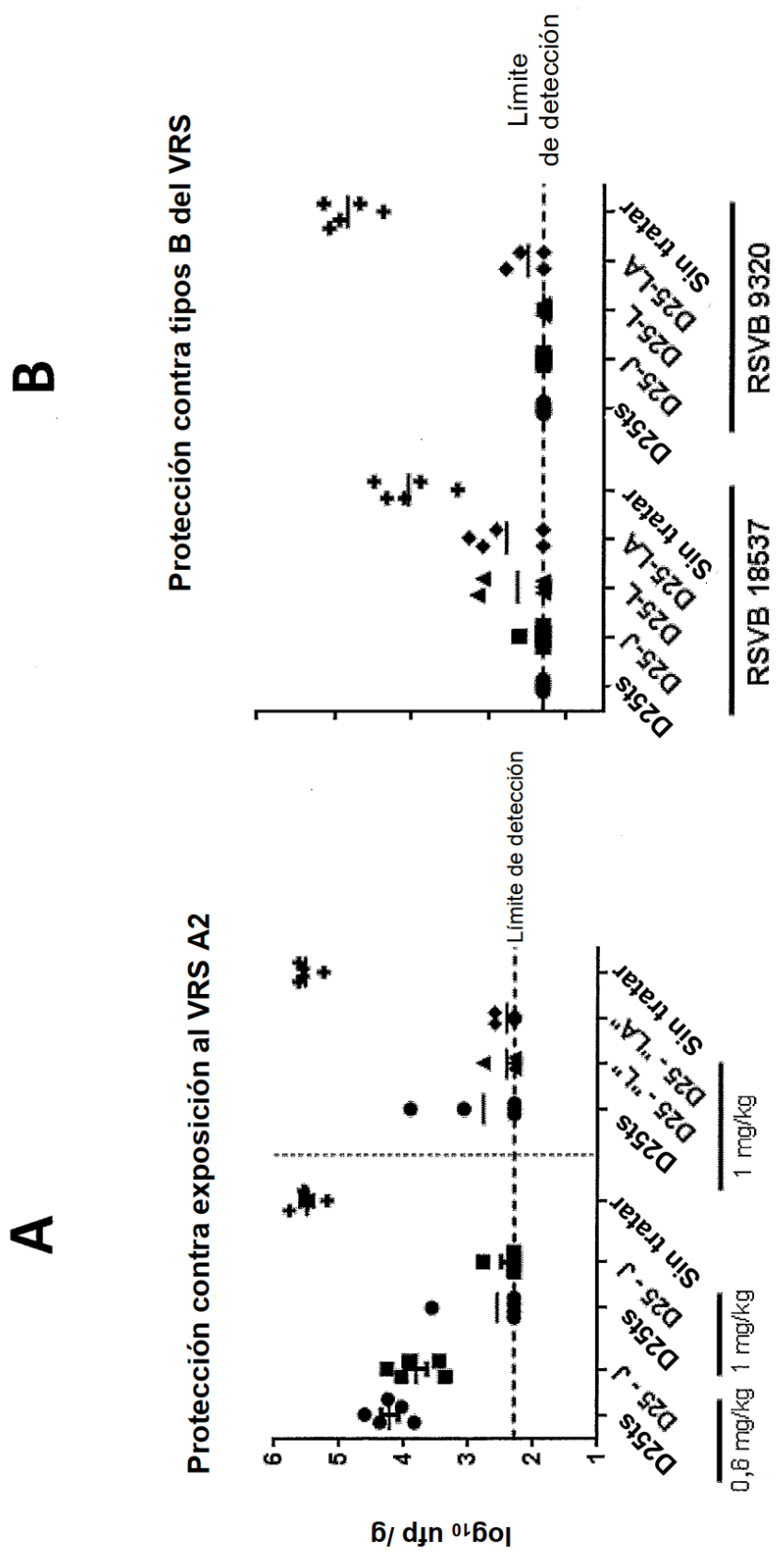
A
B
Protección contra exposición al VRS A2
Protección contra tipos B del VRS
log10 ufp /g
Límite de detección
Límite de detección
D25ts
D25-J
D25-L
D25-LA
Sin tratar
0,6 mg/kg
1 mg/kg
1 mg/kg
RSVB 18537
RSVB 9320

Figura 6

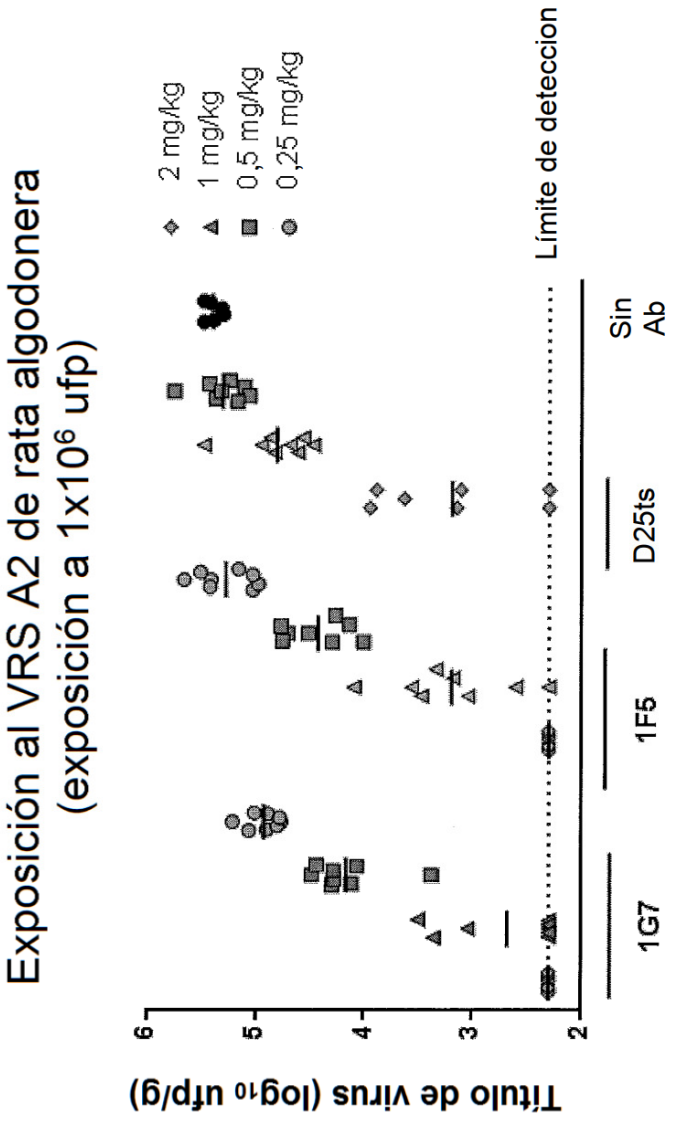
Exposición al VRS A2 de rata algodonera
(exposición a 1x10⁶ ufp)
2 mg/kg
1 mg/kg
0,5 mg/kg
0,25 mg/kg
Límite de deteccion
Título de virus (log10 ufp/g)
6
5
4
3
2
1G7
1F5
D25ts
Sin Ab

Figura 7

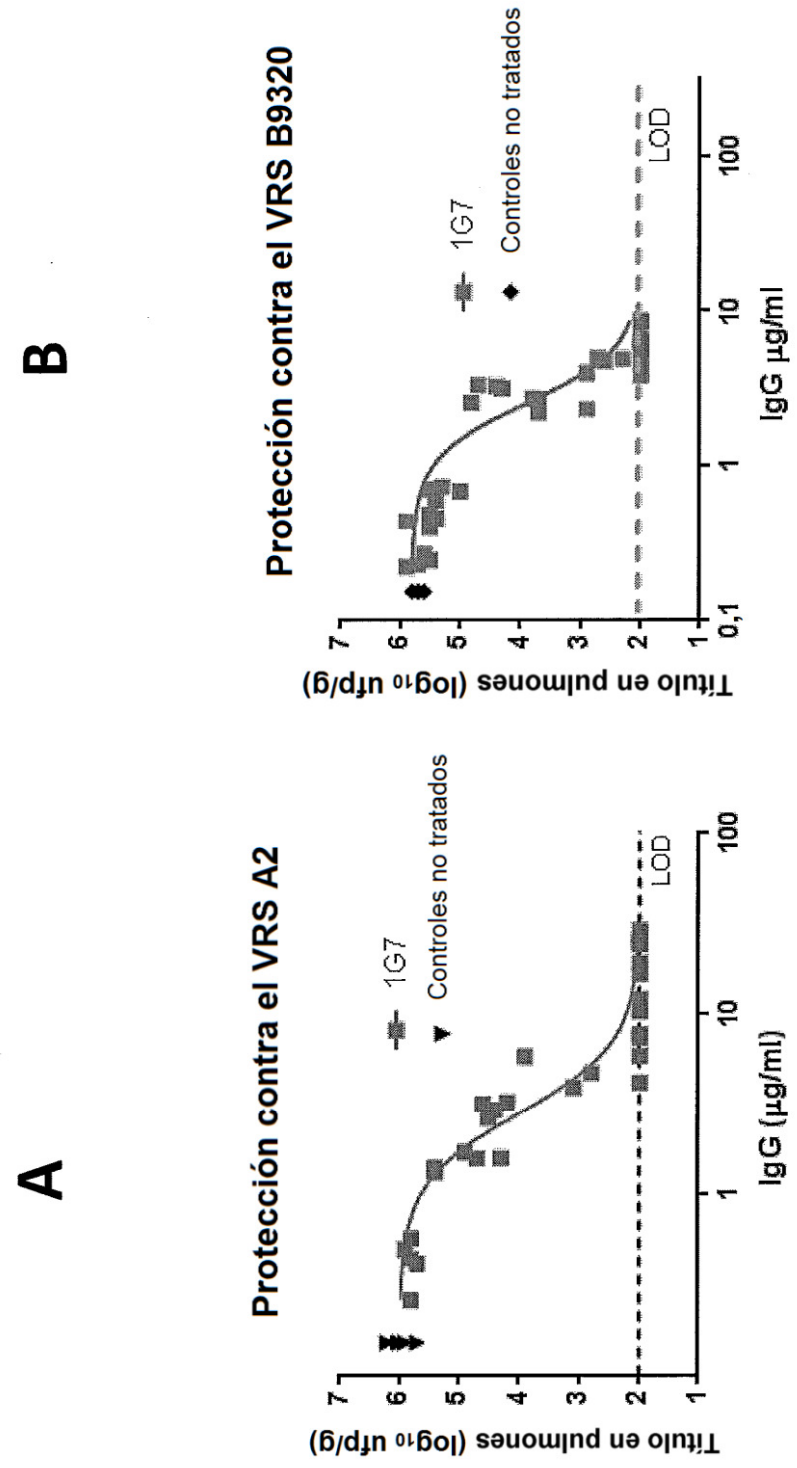
A
Protección contra el VRS A2
Título en pulmones (log10 ufp/g)
7
6
5
4
3
2
1
1G7
Controles no tratados
LOD
1
10
100
IgG (µg/ml)
B
Protección contra el VRS B9320
Título en pulmones (log10 ufp/g)
7
6
5
4
3
2
1
1G7
Controles no tratados
LOD
0,1
1
10
100
IgG µg/ml

Figura 8

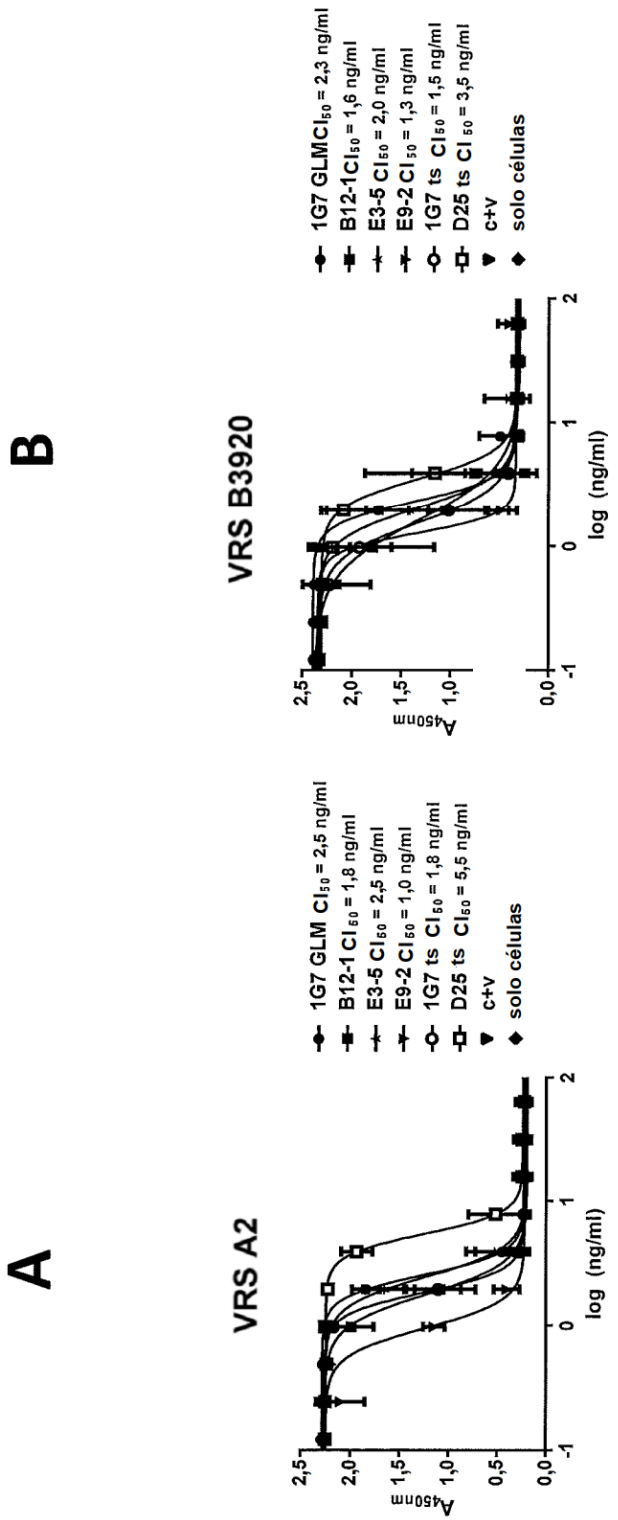
A
VRS A2
1G7 GLM CI50 = 2,5 ng/ml
B12-1 CI50 = 1,8 ng/ml
E3-5 CI50 = 2,5 ng/ml
E9-2 CI50 = 1,0 ng/ml
1G7 ts CI50 = 1,8 ng/ml
D25 ts CI50 = 5,5 ng/ml
c+v
solo células
A450nm
log (ng/ml)
B
VRS B3920
1G7 GLMCI50 = 2,3 ng/ml
B12-1CI50 = 1,6 ng/ml
E3-5 CI50 = 2,0 ng/ml
E9-2 CI 50 = 1,3 ng/ml
1G7 ts CI50 = 1,5 ng/ml
D25 ts CI 50 = 3,5 ng/ml
c+v
solo células
A450nm
log (ng/ml)

Figura 9

A MARMS

Número de aminoácido

	200					205					210					215
A2	D	K	Q	L	L	P	I	V	N	K	Q	S	C	S	I	S
MARM									Y							

A

B MARMS

Número de aminoácido

	63		65				70				74
B 9320	N	I	K	E	T	K	C	N	G	T	D	T
MARM B4												
MARM B12						N						
MARM B14												
MARM B15												
MARM B22						N						
MARM B31												

	200					205					210			213	294
B 9320	N	N	Q	L	L	P	I	V	N	Q	Q	S	C	R	E
MARM B4									D						K
MARM B12									S						
MARM B14									S						
MARM B15									D						
MARM B22		S													
MARM B31									S						K

B
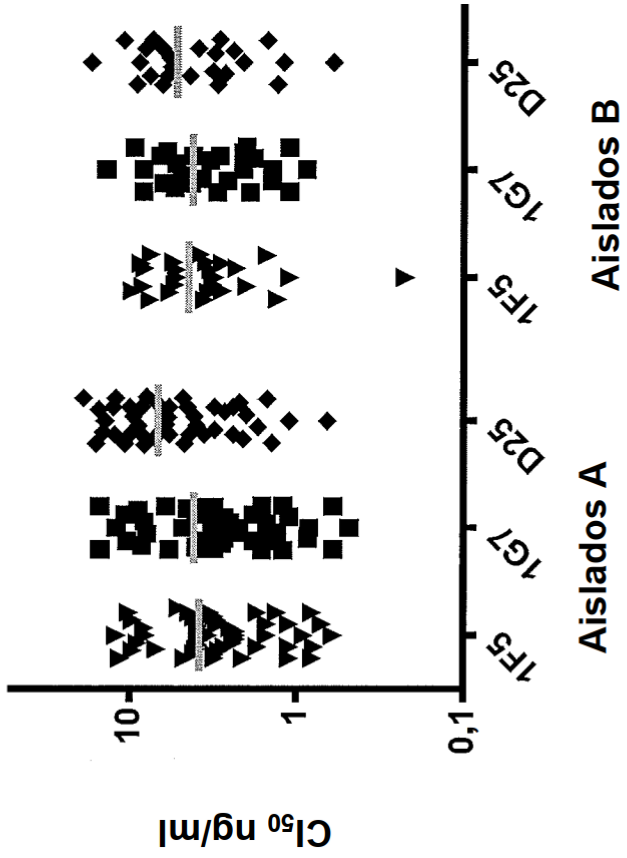
Figura 10