



No. 12-122672- -00000-0000

Fecha: 2012-07-23 11:54:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 466
Act. 411 PRESENTACION Folios: 363



Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____
MIEMBROS ENLAZADORES PARA CITOMEGALOVIRUS HUMANO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____
4-ANTIBODY AG

DOMICILIO _____
JENA, ALEMANIA

74. APODERADO _____
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



No. 12-122672- -00000-0000

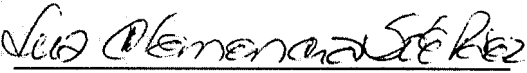
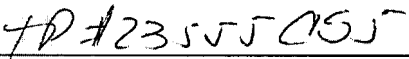
Fecha: 2012-07-23 11:54:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 466

Act. 411 PRESENTACION Folios: 363

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/EP2010/070568	Fecha 2010/12/22
Publicación Internacional No.		WO 2011/076883 A1	Fecha 2011/06/30
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
MIEMBROS ENLAZADORES PARA CITOMEGALOVIRUS HUMANO			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
C07K 016/008			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
4-ANTIBODY AG			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		Bioinstrumentezentrum, Winzerlaer Strasse 2,	No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD		Jena 07745	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
DEPARTAMENTO/ESTADO			NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Alemania	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. GRAWUNDER		Ulf	Alemán
2. MACH		Michael	Alemán
3. MARTIN-PARRAS		Luis	Español
4. PÖTZSCH		Sonja	Alemán
5. SPINDLER		Nadja	Alemán
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Suiza		Basel CH-4002	c/o 4-Antibody AG, Wro-1096.3 Schwarzwaldallee 215,
2. Alemania		Erlangen 91058	Franzosenweg 63,
3. Alemania		Jena 07745	c/o 4-Antibody AG, Bioinstrumentezentrum, Winzerlaer Strasse 2,
4. Alemania		Happurg 91230	Roter Weg 13,
5. Alemania		Erlangen 91054	Luitpoldstrasse 22,
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☒ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			

9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS De Páez		NOMBRES Luz Clemencia	IDENTIFICACIÓN C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35		No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA		CORREO ELECTRÓNICO cavelier@cavelier.com
PAÍS	COLOMBIA		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
(32) FECHA (AAAA/MM/DD)			
1. EUROPA		EP	09015951.8
2. U.S.A.		US	61/289,835
3. EUROPA		EP	10003669.8
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. <u>12-0071480</u> No. <u>12-0063659</u> No. <u>12-0066433</u> No. <u>12-0057984</u> No. <u>12-0067209</u>	Fecha: <u>2012/07/13</u> Fecha: <u>2012/06/25</u> Fecha: <u>2012/07/03</u> Fecha: <u>2012/06/12</u> Fecha: <u>2012/07/04</u>

16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>	
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma  
C.C 35.456.344 de Usaquen		Tarjeta Profesional 23.555

JGG\SDC\ID-AF221938WPC19527



17	ANEXOS
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: <u>251</u> 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: <u>41</u> 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: <u>13</u> 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital. ☒ Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional. ☒ Forma PCT/IB/306. Notificación de la inscripción de la supresión de FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT ERLANGEN-NÜRNBERG como solicitante y de la anotación como único solicitante a 4-ANTIBODY AG.	Documentación Jurídica 9. ☐ Poderes, si fuera el caso. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por 31 reivindicaciones adicionales a 10, por valor de \$930.000.



HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD		NUMERO DE RADICACIÓN	
☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			FECHA DE PRESENTACIÓN	
4	(71) SOLICITANTE (S)			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
2.				
3.				
4.				
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
PAÍS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
2.				
3.				
4.				
TELÉFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
2.				
3.				
4.				
6	(72) INVENTOR (ES)			
APELLIDOS		NOMBRE	NACIONALIDAD	
6. STICHT		Heinrich	Alemán	
7. WIEGERS		Anna-Katharina	Alemana	
8. WINKLER		Thomas	Alemán	
7	DATOS INVENTOR (ES)			
DIRECCIÓN		CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
6. Königswarterstrasse 56,		Fürth 90762		Alemania
7. Obere Krämersgasse 24,		Nürnberg 90403		Alemania
8. Schillerstrasse 69,		Erlangen 91054		Alemania
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)
4. U.S.A.		US	61/320,057	2010/04/01

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 June 2011 (30.06.2011)

(10) International Publication Number
WO 2011/076883 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/08 (2006.01)

Thomas [DE/DE]; Schillerstrasse 69, 91054 Erlangen (DE).

(21) International Application Number:
PCT/EP2010/070568

(74) Agent: **VOSSIUS & PARTNER**; Siebertstraße 4, 81675 München (DE).

(22) International Filing Date:
22 December 2010 (22.12.2010)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09015951.8 23 December 2009 (23.12.2009) EP
61/289,835 23 December 2009 (23.12.2009) US
10003669.8 1 April 2010 (01.04.2010) EP
61/320,057 1 April 2010 (01.04.2010) US

(71) Applicants (for all designated States except US): **4-ANTIBODY AG** [DE/DE]; Bioinstrumentezentrum, Winzerlaer Strasse 2, 07745 Jena (DE). **FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT ERLANGEN-NÜRNBERG** [DE/DE]; Schlossplatz 4, 91054 Erlangen (DE).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **GRAWUNDER, Ulf** [DE/CH]; c/o 4-Antibody AG, Wro-1096.3, Schwarzwaldallee 215, CH-4002 Basel (CH). **MACH, Michael** [DE/DE]; Franzosenweg 63, 91058 Erlangen (DE). **MARTIN-PARRAS, Luis** [ES/DE]; c/o 4-Antibody AG, Bioinstrumentezentrum, Winzerlaer Strasse 2, 07745 Jena (DE). **PÖTZSCH, Sonja** [DE/DE]; Roter Weg 13, 91230 Happurg (DE). **SPINDLER, Nadja** [DE/DE]; Luitpoldstrasse 22, 91054 Erlangen (DE). **STICHT, Heinrich** [DE/DE]; Königswarterstrasse 56, 90762 Fürth (DE). **WIEGERS, Anna-Katharina** [DE/DE]; Obere Krämersgasse 24, 90403 Nürnberg (DE). **WINKLER,**

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: **BINDING MEMBERS FOR HUMAN CYTOMEGALOVIRUS**

(57) Abstract: The invention relates to binding members, especially antibody molecules, which neutralise the biological effects of human cytomegalovirus (hCMV). The binding members are useful for the treatment and prophylaxis of hCMV infection.

WO 2011/076883 A1

MIEMBROS ENLAZADORES PARA CITOMEGALOVIRUS HUMANO

Campo de la Invención

Esta invención se refiere a miembros enlazadores, en especial
5 moléculas de anticuerpos, que neutralizan los efectos biológicos del
citomegalovirus humano (hCMV). Los miembros enlazadores son
útiles para el tratamiento y la profilaxis de la infección por el
citomegalovirus humano (hCMV).

Antecedentes

10 El citomegalovirus humano (hCMV) es un patógeno
ampliamente distribuido que usualmente establece una persistencia
asintomática de toda la vida en el 40 al 80 por ciento de la población
humana dependiendo del origen geográfico y socioeconómico. Sin
embargo, en los pacientes inmunocomprometidos, tales como los
15 receptores de trasplantes y los individuos infectados por VIH, y
también en los recién nacidos, la infección por el citomegalovirus
humano (hCMV) es una causa importante de patología y mortalidad,
y presenta una carga económica significativa para los sistemas del
cuidado de la salud.

20 El citomegalovirus humano (hCMV) es la infección más
significativa que impacta sobre el resultado del trasplante de un
órgano sólido (SOT), y del trasplante de células madre
hematopoyéticas (SCT) (Razonable y Paya, 2003). Después del
trasplante, se presenta una infección activa por el citomegalovirus
25 humano (hCMV) en aproximadamente el 60 al 70 por ciento de los

pacientes seropositivos para el citomegalovirus humano (hCMV) o de los pacientes seronegativos que reciben trasplantes de órganos a partir de un donante seropositivo (Razonable y Paya, *ibid*). Si no se toman medidas preventivas, el riesgo de desarrollar la enfermedad por el citomegalovirus humano (hCMV) es del 20 al 30 por ciento. Considerando el hecho de que se llevaron a cabo aproximadamente 26,000 SCTs alogénicas en todo el mundo en el 2008 (www.cibmtr.org), el éxito de esta terapia y la reducción de la patología y mortalidad después del trasplante tienen implicaciones financieras considerables.. las complicaciones relacionadas con el citomegalovirus humano (hCMV) pueden dar como resultado costos adicionales de EUR 25,000 a 50,000 por paciente.

En adición, la infección por el citomegalovirus humano (hCMV) en los pacientes de trasplante está asociada con aterosclerosis relacionada con el trasplante y pérdida del injerto acelerada (Streblow y colaboradores, 2007).

Como se menciona anteriormente, el citomegalovirus humano (hCMV) es relevante como un patógeno perinatal. Cada año, aproximadamente el 1 por ciento de las mujeres susceptibles se seroconvierten durante el embarazo. Aproximadamente el 40 por ciento de éstas transmiten el citomegalovirus humano (hCMV) a sus hijos, dando como resultado 40,000 recién nacidos infectados anualmente en los EUA (Kenneson y Cannon, 2007). Del 10 al 20 por ciento de los niños infectados tienen síntomas agudos al nacer. De éstos, hasta el 20 por ciento mueren, y el resto típicamente tienen

complicaciones moderadas a graves, incluyendo condiciones relacionadas con el sistema nervioso central (CNS), tales como ceguera, sordera, y retardo mental. Aparte de las consecuencias devastadoras para los pacientes afectados y para sus familias, los
5 costos de cuidado de la salud para estos pacientes son significativos, en particular, si la infección perinatal da como resultado discapacidades graves y permanentes.

Hasta la fecha, hay cinco agentes antivirales aprobados para utilizarse en la infección por el citomegalovirus humano (hCMV):
10 Ganciclovir/Valganciclovir, Cidofovir, Foscarnet y Fomivirsén. Todos los compuestos tienen el inconveniente de presentar efectos secundarios dependientes de la dosis y el desarrollo de cepas de virus resistentes (Schreiber y colaboradores, 2009). Ninguno de los fármacos tiene licencia para utilizarse en niños o en mujeres
15 embarazadas. En adición, se utilizan preparaciones de inmunoglobulina intravenosas (IVIG), por ejemplo, CytoGam® (CSL Behring), y Cytotect® (Biotest) para la profilaxis y el tratamiento de los pacientes en riesgo de adquirir la infección por el citomegalovirus humano (hCMV). Sin embargo, es evidente la incertidumbre acerca
20 de los beneficios de este tratamiento en la situación de trasplante (Sokos y colaboradores, 2002; Raanani y colaboradores, 2009). Se ha utilizado con éxito la transferencia adoptiva de células-T citotóxicas específicas del citomegalovirus humano (hCMV) en los pacientes de SCT hematopoyética (Moss y Rickinson, 2005), pero
25 este tratamiento es extremadamente costoso, y estará limitado a

unos cuantos centros de trasplantes que tengan la experiencia necesaria. Más aún, este tipo de tratamiento está restringido a los receptores de trasplantes que sean seropositivos para el citomegalovirus humano (hCMV). En contraste, se ha reportado que el IVIG es efectivo en el tratamiento y la prevención de la infección por citomegalovirus (CMV) congénita (Nigro y colaboradores, 2005). Sin embargo, el IVIG para el tratamiento de citomegalovirus humano (hCMV) se aísla y se purifica a partir de donantes seropositivos para el citomegalovirus humano (hCMV), lo cual da como resultado titulaciones variables y, por consiguiente, una variación de lote a lote para los anticuerpos específicos para el citomegalovirus humano (hCMV) en estas preparaciones. En adición, los productos de fármaco derivados de la sangre humana siempre tienen el riesgo de la transmisión de los patógenos humanos. Como una consecuencia, se desea un producto de anticuerpo recombinante, que permita la neutralización eficiente del citomegalovirus humano (hCMV) para la profilaxis y el tratamiento de las enfermedades causadas por la infección por el citomegalovirus humano (hCMV).

Los objetivos para la terapia con anticuerpos de las infecciones por el citomegalovirus humano (hCMV) son proteínas expresadas en la superficie del virión del citomegalovirus humano (hCMV). La composición del virión de la envoltura del citomegalovirus humano (hCMV) es muy compleja y, aunque se han identificado muchas proteínas estructurales que comprenden la envoltura, todavía no están completamente definidas. Durante el desarrollo de los

anticuerpos para la terapia del citomegalovirus humano (hCMV), se han identificado determinantes antigénicos en los complejos de glicoproteína superficiales gp58/II6 (gB o gC-1), gp 47-52 (gC-II; gM y gN) (Shimamura y colaboradores, 2006), y gp 86 (gH o gC-III) (Urban y colaboradores, 1996). La mayoría de los anticuerpos neutralizantes identificados hasta la fecha se enlazan a la proteína gB, la cual ha demostrado que contiene la mayoría de los epítomos neutralizantes (Britt y colaboradores, 1990). El complejo gB se sintetiza como un precursor de 130 kD, el cual se disocia en dos moléculas covalentemente enlazadas, denominadas como gp58 y gpII6. El fragmento N-terminal (gpII6) contiene un epítomo neutralizante lineal, denominado como dominio antigénico-2 (AD-2) de 20 aminoácidos (aminoácidos 67-86), el cual no requiere del complemento para tener la actividad biológica mediada por el anticuerpo (Meyer y colaboradores, 1990). La fracción gp58 de gB lleva el dominio neutralizante AD-1, el cual comprende 74 aminoácidos (aminoácidos 557-630), y más probablemente representa un epítomo conformacional (Ohlin y colaboradores, 1993; Wagner y colaboradores, 1992).

El advenimiento de los anticuerpos monoclonales inicialmente dio lugar a la identificación de una variedad de anticuerpos monoclonales de ratón neutralizantes contra el citomegalovirus humano (hCMV). Sin embargo, los anticuerpos monoclonales de ratón son inadecuados para utilizarse en la terapia humana debido a que estas proteínas son reconocidas por el sistema inmunológico

humano como extrañas y, en consecuencia, se eliminan después de un período de tiempo muy corto, lo cual da como resultado una eficacia clínica baja o ninguna eficacia clínica. Se han desarrollado anticuerpos quiméricos contra las proteínas del citomegalovirus humano (hCMV), y la Patente Europea Número EP664834B (Harris y colaboradores) describe un anticuerpo quimérico dirigido hacia la glicoproteína de 86 kD del citomegalovirus humano (hCMV) denominada como gH; sin embargo, estos anticuerpos no han tenido éxito en los establecimientos clínicos.

10 Las tecnologías que utilizan heteromielomas para la generación de hibridomas se han utilizado para generar una variedad de anticuerpos monoclonales humanos que reconocen diferentes glicoproteínas del citomegalovirus humano (hCMV), las cuales se encuentran ambas en la envoltura viral. La Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US5,043,281 (Masuho y colaboradores) describe un anticuerpo monoclonal humano neutralizante que reconoce una proteína del antígeno de citomegalovirus (CMV) que tiene un peso molecular de entre 130,000 y 55,000. La Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 15 US5,750,106 (Ostberg) describe un anticuerpo monoclonal humano para el citomegalovirus, denominado como SDZ MSL 109, el cual reconoce la glicoproteína gH, así como una línea celular de hibridoma para la producción de este anticuerpo. Uno de los anticuerpos monoclonales humanos neutralizantes del virus, SDZ 20 MSL-109, se ha evaluado en los estudios clínicos en Fase I/II para la 25

retinitis inducida por el citomegalovirus humano (hCMV) en los pacientes inmunocomprometidos, pero debido a la falta de eficacia, no se continuaron los estudios clínicos (Borucki y colaboradores, 2004; Hamilton y colaboradores, 1997; Boeckh y colaboradores, 2001). Una explicación plausible para el fracaso de estos estudios es la variabilidad antigénica del citomegalovirus humano (hCMV). El citomegalovirus humano (hCMV) es único entre los virus de herpes humano, en que es una variable antigénica, y la mayoría de los anticuerpos monoclonales humanos, que reaccionan con los antígenos de envoltura, muestran una capacidad de neutralización específica de la cepa. Esto es especialmente cierto para los anticuerpos monoclonales humanos específicos de gH, como el SDZ MSL-109. Este obstáculo solamente se puede superar mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los epítomos que se encuentran sobre el citomegalovirus humano (hCMV) que estén conservados entre los diferentes aislados.

En el pasado, el progreso en el aislamiento de los anticuerpos monoclonales neutralizantes del citomegalovirus humano (hCMV) fue lento, debido al hecho de que no había rastreos de anticuerpos de alta producción para determinar su capacidad neutralizante disponibles. En adición, con frecuencia se ha utilizado el método de immortalización del virus de Epstein Barr (EBV) para generar células-B immortalizadas que produzcan un anticuerpo de interés, durante un número de años. Esta técnica ha tenido éxito para la generación de células secretoras de anticuerpos a partir de diferentes fuentes de

células-B humanas, tales como la sangre periférica de sujetos sanos utilizando la selección específica del antígeno (Casali y colaboradores, 1986), los ganglios linfáticos, el bazo, o la sangre periférica de los pacientes (Yamaguchi y colaboradores, 1987; 5 Posner y colaboradores, 1991; Raff y colaboradores, 1988; Steenbakkers y colaboradores 1993 y 1994). Esta técnica se utilizó para la inmortalización de las células mononucleares de sangre periférica aisladas a partir de donantes de sangre seropositivos para el citomegalovirus (CMV), y el aislamiento subsiguiente de tres 10 anticuerpos: ITC52, ITC63b e ITC88 (WO 93/021952 A1). ITC52 e ITC63b son reactivos con el epítipo conformacional AD-1 del citomegalovirus (CMV), que consiste en la secuencia de aminoácidos 557-630 de gp58 de CMV, y el ITC88 es reactivo contra AD-2, el cual comprende la secuencia de aminoácidos 67-86 (AD-2) de gp116 de 15 CMV (Publicación Internacional Número WO 93/021952 A1).

Se han publicado mejoras sobre el método de transformación de EBV por Lanzavecchia (Publicación Internacional Número WO 04/076677 A2), y Funaro y colaboradores (Publicación Internacional Número WO 07/068758 A1), y estos métodos se han utilizado para la 20 generación de anticuerpos para el citomegalovirus humano (hCMV). La Publicación Internacional Número WO 08/084410 A2 (Lanzavecchia y Macagno) describe anticuerpos producidos a partir de las líneas celulares de EBV 1F11, 2F4, 5A2 y 9A11 que neutralizan la infección por el citomegalovirus humano (hCMV) de las 25 células endoteliales, las células epiteliales, las células retinales y las

células dendríticas, y se dirigen hacia un epítipo conformacional formado por gpUL130 y gpUL131A. Sin embargo, los anticuerpos a partir de estas líneas de EBV no tienen ninguna capacidad neutralizante del citomegalovirus humano (hCMV) detectable, si se utilizan fibroblastos como las células objetivo para la infección. La Publicación Internacional Número WO 08/084410 A2 también menciona las líneas de EBV 10C6, 5F1, 6B4 y 7H3, que producen anticuerpos que neutralizan la infección por el citomegalovirus humano (hCMV) de los fibroblastos y de las células endoteliales en concentraciones inhibitoras medias-máximas (IC_{50}) en el intervalo de entre 0.3 y 2.0 microgramos/mililitro. Se describe que los anticuerpos producidos a partir de estas líneas de EBV se enlazan a un epítipo funcional de gB. Sin embargo, aunque se han deducido las secuencias de cadena pesada y ligera de los anticuerpos a partir de algunas de las líneas celulares de EBV mencionadas anteriormente, estos datos no se han confirmado para los anticuerpos recombinantemente expresados y purificados codificados para las secuencias publicadas. Una solicitud de patente más reciente de Lanzavecchia y Macagno (Publicación Internacional Número WO 10/007463 A1) describe el anticuerpo 6G4, el cual se enlaza a un epítipo determinado por una combinación de las proteínas UL128, UL130 y UL131A, y el cual neutraliza la infección por el citomegalovirus humano (hCMV) de las células endoteliales, retinales y dendríticas. Adicionalmente, la Publicación Internacional Número WO 10/007533 A1 (Lanzavecchia y Macagno) describe anticuerpos

neutralizantes del citomegalovirus humano (hCMV) que se enlazan a un epítipo en la proteína UL128 de hCMV, un epítipo formado por las proteínas gH, gL, UL128 y UL130, un epítipo formado por las proteínas UL128, UL130 y UL131A, o un epítipo formado por las proteínas UL130 y UL131A.

La Publicación Internacional Número WO 08/071806 A1 (Funaro y colaboradores) describe el anticuerpo 26A1, el cual se enlaza a, y neutraliza, el citomegalovirus humano (hCMV), pero no muestra un enlace significativo a cualquiera de los antígenos gB o gH cuando se prueba mediante un ELISA. Se reporta que una concentración inhibidora media-máxima (IC_{50}) del anticuerpo 26A1 está en el intervalo de 1 microgramo/mililitro tanto para los fibroblastos primarios como para las células endoteliales, y por consiguiente, en un intervalo que ha sido alcanzado por los anticuerpos descritos en la técnica anterior. Una solicitud de patente adicional por Funaro y colaboradores, describe el anticuerpo 1F7, el cual reconoce gH (Publicación Internacional Número WO 09/003975 A1). De una manera similar al anticuerpo 26A1, como se describe en la Publicación Internacional Número WO 08/071806 A1, se reporta que la concentración inhibidora media-máxima (IC_{50}) del anticuerpo 1F7 está en el intervalo de 1 microgramo/mililitro tanto para los fibroblastos primarios como para las células endoteliales, y por consiguiente, en un intervalo que ha sido alcanzado por los anticuerpos descritos en la técnica anterior. Todavía otra solicitud de patente por Funaro y colaboradores (Publicación Internacional

Número WO 09/024445 A1) describe los anticuerpos 8C10, 37B7, 8A11 y 10B7, los cuales reconocen ya sea el dominio AD-2 de gB (clones 8C10, 8A11, 10B7), o bien una proteína no relacionada con gB o gH (clon 37B7). Como en las solicitudes de patente de Funaro y colaboradores (Publicaciones Internacionales Números WO 08/071806 A1 y WO 09/003975 A1), los anticuerpos descritos en la Publicación Internacional Número WO 09/024445 A1 también exhiben una concentración inhibidora media-máxima (IC_{50}) en el intervalo de 1 microgramo/mililitro tanto para los fibroblastos primarios como para las células endoteliales (10B7, 8A11, 37B7) o más alta, a aproximadamente 10 microgramos/mililitro (8C10), y por consiguiente, en el intervalo de los anticuerpos neutralizantes del citomegalovirus humano (hCMV) anteriormente publicados.

Las solicitudes de patente recientes adicionales describen anticuerpos neutralizantes del citomegalovirus humano (hCMV) con características similares. Por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 09/114560 A2 (Olsen) describe los clones de anticuerpos 2F10, 2M16, 2N9, 3C21, 3G7, 4P12, 5P9, 9C16, los cuales se enlazan todos al epítipo AD-2 de gB, y exhiben una concentración inhibidora media-máxima (IC_{50}) de la infección por el citomegalovirus humano (hCMV) de los fibroblastos, en el intervalo de 1 microgramo/mililitro. La Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US20090004198 (Nakajima y colaboradores) da a conocer un anticuerpo de alta afinidad para el dominio AD-1 de gB, con una afinidad de enlace aparente en pM, y una actividad

neutralizante del citomegalovirus humano (hCMV) del 80 por ciento en los fibroblastos, si se utiliza en concentraciones de 1 microgramo/mililitro y más altas (10 microgramos/mililitro y 100 microgramos/mililitro). Dos solicitudes recientes, las Publicaciones Internacionales
5 Números WO 10/114105 A1 y WO 10/114106 A1, ambas de Evec Inc., describen anticuerpos que se enlazan al AD-2 y un epítipo discontinuo en AD-1, respectivamente.

Como se da a conocer en la presente invención, hemos desarrollado anticuerpos humanos neutralizantes del citomegalovirus
10 humano (hCMV), que se enlazan con una alta afinidad a la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV). En adición, estos anticuerpos exhiben una alta potencia similar (IC_{50} s por debajo de 0.5 microgramos/mililitro) en la neutralización del citomegalovirus humano (hCMV), utilizando una amplia gama de tipos de células
15 susceptibles al citomegalovirus humano (hCMV) (fibroblastos, células endoteliales, epiteliales y dendríticas), y una alta potencia, no solamente sobre la cepa de laboratorio AD-169, sino que también sobre todos los aislados clínicos probados hasta ahora. En adición, los anticuerpos que se dan a conocer en la presente, reconocen y
20 definen un novedoso epítipo neutralizante de la proteína gB que no se ha descrito anteriormente. Debido a su alta afinidad y potencia, y a sus novedosas características de enlace de epítipo determinadas mediante los estudios funcionales, como se describen en la presente, los miembros enlazadores de la invención son en particular
25 adecuados para utilizarse en el tratamiento terapéutico, la profilaxis

y/o el diagnóstico de las infecciones por el citomegalovirus humano (hCMV) en los pacientes humanos. Los miembros enlazadores son útiles para el tratamiento de diversos trastornos asociados con la infección por citomegalovirus (CMV), como se describe con detalle en cualquier otra parte de la presente.

Breve Descripción de la Invención

En la presente se describen varios anticuerpos humanos neutralizantes del citomegalovirus humano (hCMV) y específicos de gB altamente potentes, los cuales también reconocen un epítipo neutralizante del citomegalovirus humano (hCMV) completamente nuevo y, por consiguiente, actúan mediante un principio terapéutico diferente en comparación con todos los demás anticuerpos específicos para el citomegalovirus humano (hCMV) conocidos. Su descubrimiento y caracterización funcional se da a conocer adicionalmente más adelante. Como se describe con mayor detalle en los Ejemplos, se han identificado 50 anticuerpos neutralizantes del citomegalovirus humano (hCMV) completamente humanos. Se han aislado a partir de sangre periférica humana transformada con células-B derivadas de EBV, derivadas a partir de donantes infectados por el citomegalovirus humano (hCMV). Las secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) de los anticuerpos 1 a 50 son como se detallan en las Tablas 19 y 20. Las combinaciones de dominio V_H y dominio V_L para un panel de anticuerpos 1 a 46 son como se detallan en la Tabla 7. Todas las

secuencias referidas en las Tablas 7 y 19 también se muestran en el listado de secuencias adjunto que forma parte de la presente divulgación.

Como se describe con mayor detalle más adelante, se ha demostrado que los miembros enlazadores de acuerdo con la invención neutralizan la infección por el citomegalovirus humano (hCMV) de las células objetivo en concentraciones terapéuticamente relevantes, es decir, con IC_{50} por debajo de 1 microgramo/mililitro. Los miembros enlazadores más activos neutralizan el citomegalovirus humano (hCMV) incluso en IC_{50} s por debajo de 0.5 microgramos/mililitro. También se ha observado una capacidad neutralizante con diferentes aislados clínicos (por ejemplo, Towne y Altu; Tabla 16), que representan diferentes genotipos de gB. Los miembros enlazadores de la invención pueden neutralizar una o más actividades del citomegalovirus humano (hCMV). Por ejemplo, la actividad biológica inhibida puede ser la prevención de la infección de los fibroblastos, las células endoteliales, las células epiteliales, las células retinales y/o las células dendríticas. La prevención de la infección de los fibroblastos se ha demostrado en un ensayo de neutralización *in vitro* que utiliza una cepa recombinante del citomegalovirus humano (hCMV), AD169, que expresa la luciferasa del gen reportero. Después de la infección con esta cepa de citomegalovirus humano (hCMV) genéticamente modificada, las células objetivo llegan a ser positivas para la expresión de la enzima luciferasa, la cual se puede detectar mediante una conversión del

sustrato apropiada en un luminómetro convencional. Se demostró que los miembros enlazadores descritos en esta invención neutralizan la infección de la cepa AD169 del citomegalovirus humano (hCMV) cuando se incuba primero con la cepa del virus recombinante positiva para luciferasa, y luego se siembra sobre monocapas de fibroblastos primarios de prepucio humano (HFFs). En seguida de una incubación adicional, se detectó la luminiscencia utilizando un luminómetro y las unidades de luz relativas (RLU) detectadas. Entonces se calculó el porcentaje de neutralización, en donde la titulación neutralizante se indica como la concentración del miembro enlazador (microgramos/mililitro) que da una reducción del 50 por ciento o del 100 por ciento de la infección por el citomegalovirus humano (hCMV) de las células objetivo. Los miembros enlazadores pueden dar una reducción del 50 por ciento de la infección por el citomegalovirus humano (hCMV) en concentraciones de 0.1 a 5.0 microgramos/mililitro, de preferencia de 0.1 a 2.0 microgramos/mililitro, más preferiblemente de 0.3 a 1.3 microgramos/mililitro, o más preferiblemente de 0.1 a 0.6 microgramos/mililitro. Se ha demostrado que los miembros enlazadores dan como resultado una reducción del 50 por ciento de la infección por el citomegalovirus humano (hCMV) en concentraciones terapéuticamente relevantes de 0.1, 0.5, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.5 ó 2.0 microgramos/mililitro.

Otros métodos que se pueden utilizar para determinar la neutralización de la infectividad del citomegalovirus humano (hCMV)

incluyen ELISA, FACS, Western blot, inmunoprecipitación, e inspección visual basada en la formación y el recuento de placas.

Se demostró que los miembros enlazadores descritos en la presente neutralizan el citomegalovirus humano (hCMV) no solamente en los fibroblastos, sino que, con una eficacia similar, también en las células endoteliales, epiteliales y dendríticas (como se muestra en un ensayo que utiliza fibroblastos primarios de prepucio, Ejemplo 4, y en un ensayo que utiliza células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), células epiteliales de pigmento retinal ARPE-19 humanas, y células dendríticas primarias, como se muestra en el Ejemplo 7).

La invención da a conocer miembros enlazadores de alta afinidad para el citomegalovirus humano (hCMV) y específicos para la proteína gB de hCMV. Los miembros enlazadores de la invención se pueden enlazar a la proteína gB de hCMV con una K_D de no más de 50nM, por ejemplo, de no más de 25nM, 15nM, 10nM, 5nM, 3nM, 1.5nM, 1nM, 0.5nM, 0.1nM, 75pM ó 57pM. De preferencia, el miembro enlazador tiene una K_D de 1nM o menos, de preferencia de menos de 0.5nM, de preferencia de menos de 0.1nM, y de una manera muy preferible de menos de 75pM. La K_D se puede determinar mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, Biacore®. Las mediciones de afinidad Biacore® se describen en la presente en el Ejemplo 5.

Como se describe en cualquier otra parte de la presente, la resonancia de plasmón superficial involucra pasar un analito en fase

de fluido sobre un ligando unido a un soporte sólido, y determinar los índices de asociación (k_a), y los índices de disociación (k_d) entre el analito y el ligando. La resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, se puede llevar a cabo pasando un miembro enlazador en fase de fluido sobre la proteína gB unida a un soporte. Los datos de la resonancia de plasmón superficial se pueden ajustar a un modelo de datos de analito monovalente. La afinidad se puede expresar como la constante de disociación, K_D , la cual se calcula a partir de la proporción de las constantes de índice de disociación y de asociación k_d/k_a , como se determinan mediante la resonancia de plasmón superficial, utilizando un modelo de datos de analito monovalente.

Se muestra que los miembros enlazadores descritos en la presente se enlazan a una región específica de la proteína gB de hCMV. Los epítomos conocidos de la proteína gB de hCMV están dentro del dominio antigénico 1 (AD-1; entre los aminoácidos 552-635) y/o dentro del dominio antigénico 2 (AD-2; entre los aminoácidos 67-86) de la cepa AD169 de gB, SEQ ID No: 239. En la presente invención describimos miembros enlazadores que se enlazan a dos nuevos dominios antigénicos la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV), dominio antigénico 4 (AD-4; una región discontinua entre los aminoácidos 121-132 y 344-438 de la cepa AD169 de gB; SEQ ID No: 239), y dominio antigénico 5 (AD-5; entre los aminoácidos 133 a 343 de la cepa AD169 de gB; SEQ ID No: 239). En los experimentos iniciales, se investigó la capacidad de

seis de los miembros enlazadores descritos en la presente, los anticuerpos monoclonales recombinantes Ab-04, Ab-11, Ab-14, Ab-19, Ab-28 y Ab-42, para enlazarse a regiones específicas de la proteína gB de hCMV. En particular, primero se investigó la especificidad de enlace de epítipo de estos seis miembros enlazadores en un ensayo de competición Biacore® con una selección de anticuerpos anti-hCMV conocidos en la materia, que se enlazan ya sea con el epítipo AD-1 o bien con el epítipo AD-2 de la proteína gB. Debido a que los miembros enlazadores de la presente invención se enlazaron específicamente a la proteína gB con una alta afinidad, pero no pudieron competir por el enlace de gB con los anticuerpos específicos de AD-1 y AD-2, quedó claro que los miembros enlazadores de la presente invención reconocen un novedoso epítipo neutralizante de la proteína gB. Se obtuvo un apoyo adicional para este hallazgo mediante la expresión de una versión truncada de la proteína gB, la cual comprende los residuos de aminoácidos 100 a 447 (gB cepa AD169; SEQ ID No: 239), la cual, después de su expresión en células COS, fue reconocida por los miembros enlazadores de la invención.

En seguida de la generación de un modelo molecular de gB del citomegalovirus humano (hCMV) (cepa AD169; SEQ ID No: 239), se identificaron los dominios de proteína expuestos superficialmente, y se predijo una secuencia de aminoácidos discontinua entre los residuos de aminoácidos 121-132 y 344-438 como un probable epítipo, al cual se podrían enlazar los miembros enlazadores de la

invención. Cuando se expresó este epítipo predicho como los aminoácidos 116 a 132 y 344 a 440 (gB cepa AD169; SEQ ID No: 239), los cuales se acoplaron mediante un enlazador de aminoácidos sintético, se encontró que esta proteína recombinante era específicamente reconocida por los miembros enlazadores Ab-11, Ab-14 o Ab-28 de la invención. Este nuevo epítipo se ha denominado como AD-4. Por consiguiente, los miembros enlazadores de la invención no se enlazan a la región AD-1 de la proteína gB de hCMV. También, los miembros enlazadores de la invención no se enlazan a la región AD-2 de la proteína gB de hCMV. En contraste, los miembros enlazadores Ab-01 a Ab-46 de la invención se enlazan a un nuevo epítipo conformacional denominado como AD-4 (también denominado como el Dominio II (Dom II)), entre los residuos de aminoácidos 100 a 447, y de preferencia entre los residuos de aminoácidos 121 a 438. Más preferiblemente, los miembros enlazadores de la invención se enlazan a los estiramientos de aminoácidos discontinuos 116-132 y 344-440 de la cepa AD169 de gB (SEQ ID No: 239), y de una manera muy preferible, a los estiramientos 121-132 y 344-438 de la cepa AD169 de gB (SEQ ID No: 239). En este aspecto, se tiene que entender, de acuerdo con la invención, que el epítipo discontinuo generado por los estiramientos de aminoácidos 121-132 y 344-438 de la cepa AD169 de gB (SEQ ID No: 239) constituye el mismo epítipo que el epítipo discontinuo generado por los estiramientos de aminoácidos 116-132 y 344-440 de la cepa AD169 de gB (SEQ ID No: 239).

Debido a que los Anticuerpos Ab-01 a Ab-46 tienen todas las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) estructuralmente relacionadas (en particular HCDR3 de una longitud idéntica y una secuencia relacionada), y a que se derivan a partir de un solo donante, estas moléculas de anticuerpos son más probablemente mutantes somáticos de un clon reactivo con gB original y, por consiguiente, se espera que se enlacen al mismo epítipo o a un epítipo muy similar traslapado sobre la proteína gB de hCMV. De conformidad con lo anterior, también se espera que los resultados de caracterización del epítipo obtenidos con los anticuerpos recombinantes Ab-11, Ab-14 o Ab-28 sean representativos para todos los anticuerpos Ab-01 a Ab-46 que se dan a conocer en la presente. La presente invención, por consiguiente, se refiere a un miembro enlazador, de preferencia a un anticuerpo, que se enlaza a un epítipo conformacional de la proteína gB reconocido por los anticuerpos Ab-11, Ab-14 o Ab-28, y también a un miembro enlazador que compite con cualquiera de los anticuerpos Ab-11, Ab-14 o Ab-28 para enlazarse a un epítipo conformacional de la proteína gB reconocido por estos anticuerpos.

Por consiguiente, en una primera modalidad, un miembro enlazador de la invención se puede enlazar a la proteína gB de hCMV en una región que comprende los aminoácidos 116 a 132 o los aminoácidos 121 a 132, como se predice a partir del modelo estructural (Ejemplo 9). Un miembro enlazador de la invención

26
27

también se puede enlazar a la proteína gB de hCMV en una región que comprende los aminoácidos 344 a 440 o los aminoácidos 344 a 438, como se predice a partir del modelo estructural (Ejemplo 9). Opcionalmente, un miembro enlazador se puede enlazar a los
5 residuos de flanqueo o a los residuos estructuralmente vecinos en la secuencia de aminoácidos de gB de hCMV, en adición a enlazarse a los aminoácidos 116 a 132 y/o a los aminoácidos 344 a 440. De acuerdo con la convención, la numeración de residuos corresponde a la cepa AD169 de gB del hCMV (SEQ ID No: 239).

10 En los experimentos adicionales, también se investigó la capacidad de cuatro de los miembros enlazadores descritos en la presente, los anticuerpos monoclonales recombinantes Ab-47, Ab-48, Ab-49, Ab-50, para enlazarse a regiones específicas de la proteína gB de hCMV. En particular, primero se investigó la especificidad de
15 enlace de epítipo de estos cuatro miembros enlazadores en un ensayo de competición ELISA (Ejemplo 8.3), y luego utilizando un ELISA de captura (Ejemplo 10.2). Quedó claro que estos cuatro miembros enlazadores reconocen un epítipo neutralizante de la proteína gB novedoso adicional.

20 En seguida de la generación de un modelo molecular de gB del citomegalovirus humano (hCMV) (cepa AD169; SEQ ID No: 239), se identificaron los dominios de proteína expuestos superficialmente, y se predijo una secuencia de aminoácidos entre los residuos de aminoácidos 133 y 343 como un probable epítipo, al cual se podrían
25 enlazar los miembros enlazadores de la invención. Este epítipo

predicho se subdividió y se expresó como dos subdominios: Subdominio 1 (aminoácidos 133-144 y 251-343), y Subdominio 2 (aminoácidos 140 a 255) (gB cepa AD169; SEQ ID No: 239). Cuando se probaron en un ELISA de captura, el Subdominio 1 fue reconocido por los miembros enlazadores Ab-47, Ab-49 o Ab-50 de la invención. La región de aminoácidos 134 a 344 del nuevo epítipo (gB cepa AD169; SEQ ID No: 239) se ha denominado como AD-5. Por consiguiente, los miembros enlazadores Ab-47, Ab-48, Ab-49 o Ab-50 de la invención no se enlazan a la región AD-1 de la proteína gB de hCMV. También, los miembros enlazadores de la invención no se enlazan a la región AD-2 de la proteína gB de hCMV. En contraste, los miembros enlazadores Ab-47 a Ab-50 de la invención se enlazan a un nuevo epítipo conformacional denominado como AD-5 (también denominado como Dominio I (Dom I)), entre los residuos de aminoácidos 133 a 343 de la cepa AD169 de gB (SEQ ID No: 239).

La presente invención, por consiguiente, se refiere a un miembro enlazador, de preferencia a un anticuerpo, que se enlaza a un epítipo de la proteína gB reconocido por los anticuerpos Ab-47, Ab-48, Ab-49 o Ab-50, y también a un miembro enlazador que compite con cualquiera de estos cuatro anticuerpos para enlazarse a un epítipo conformacional de la proteína gB reconocido por estos anticuerpos.

Por consiguiente, en una segunda modalidad, un miembro enlazador de la invención se puede enlazar a la proteína gB de hCMV en una región que comprende los aminoácidos 133 a 343,

como se predice a partir del modelo estructural (Ejemplo 9). Opcionalmente, un miembro enlazador se puede enlazar a los residuos de flanqueo o a los residuos estructuralmente vecinos en la secuencia de aminoácidos de gB de hCMV, en adición a enlazarse a los aminoácidos 133 a 343. De acuerdo con la convención, la numeración de residuos corresponde a la cepa AD169 de gB del hCMV (SEQ ID No: 239).

Un miembro enlazador de la invención puede comprender una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una molécula de anticuerpo con una secuencia de aminoácidos completamente humana. El miembro enlazador normalmente comprende un dominio de anticuerpo V_H y/o V_L . Los dominios V_H y V_L de los miembros enlazadores también se dan a conocer como parte de la invención. Cada uno de los dominios V_H y V_L comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs), y regiones de estructura (FRs). Un dominio de anticuerpo V_H comprende tres regiones HCDR, designadas como HCDR1, HCDR2, y HCDR3. Un dominio de anticuerpo V_L comprende tres regiones LCDR, designadas como LCDR1, LCDR2, y LCDR3. Una estructura de dominio V_H o V_L comprende cuatro regiones de estructura, FWR1, FWR2, FWR3 y FWR4, intercaladas con las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) en la siguiente estructura: FWR1 - CDR1 - FWR2 - CDR2 - FWR3 - CDR3 - FWR4.

Los ejemplos de los dominios de anticuerpos V_H y V_L y de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de acuerdo con la presente invención son como se enlistan en el listado de

secuencias adjunto, el cual forma parte de la presente divulgación. Otras regiones determinantes de complementariedad (CDRs) se dan a conocer más adelante y en la Tabla 19. Todas las secuencias V_H y V_L , las secuencias CDR, los conjuntos de CDRs, y los conjuntos de HCDRs, y los conjuntos de LCDRs, que se dan a conocer en la presente, representan aspectos y modalidades de la invención. Como se describe en la presente, un 'conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs)' comprende las CDR1, CDR2 y CDR3. Por consiguiente, un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cadena pesada se refiere a HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cadena ligera se refiere a LCDR1, LCDR2 y LCDR3. A menos que se informe de otra manera, un 'conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs)' incluye HCDRs y LCDRs.

Típicamente, los miembros enlazadores de la invención son anticuerpos monoclonales.

Un miembro enlazador de la invención puede comprender un sitio de enlace de antígeno dentro de una molécula no de anticuerpo, normalmente proporcionado por una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs), por ejemplo, un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) en un andamiaje de proteína que no es de anticuerpo, como se discute adicionalmente más adelante.

Los miembros enlazadores Ab-01 a Ab-46, de acuerdo con la

invención, se aislaron inicialmente a partir de un donante infectado por el citomegalovirus humano (hCMV), y se aislaron a partir de las líneas de células-B inmortalizadas por EBV, referidas como SM1, SM3, SM4, SM5, SM6, SM7, SM9, SM10 ó SM11. A partir de estas
5 nueve líneas celulares, se pudieron identificar 37 secuencias de codificación V_H diferentes y 62 secuencias de codificación V_L diferentes de los anticuerpos humanos (Tabla 6). La combinación de todas las secuencias de codificación V_H y V_L identificadas a partir de cada línea celular como cadenas de IgH e IgL, se pueden generar
10 teóricamente 295 anticuerpos diferentes. De éstos, se han identificado 46 anticuerpos recombinantes diferentes, los cuales fueron neutralizantes del citomegalovirus humano (hCMV) en un ensayo de rastreo biológico de primera línea utilizando la expresión de luciferasa, la cepa de laboratorio del citomegalovirus humano
15 (hCMV) AD-169, y los fibroblastos primarios de prepucio humano. Se encontró que seis de estos anticuerpos recombinantes neutralizan el citomegalovirus humano (hCMV) con una alta potencia (IC_{50} s por debajo de 1 microgramo/mililitro), y se enlazan a la proteína gB con una alta afinidad de K_D de 15nM o menos (Tablas 13 y 15 más
20 adelante).

La estructuras y localizaciones de los dominios variables del miembro enlazador se pueden determinar haciendo referencia a Kabat y colaboradores (1991), y a las actualizaciones del mismo. En la presente se describe un panel de miembros enlazadores, cada uno
25 de los cuales comprende el conjunto de regiones determinantes de

complementariedad (CDRs), como se especifican en las Tablas 19 y 20, en donde la HCDR1 tiene los residuos de Kabat 31-35; la HCDR2 tiene los residuos de Kabat 50-65; la HCDR3 tiene los residuos de Kabat 95-102. La LCDR1 tiene los residuos de Kabat 24-34; la LCDR2 tiene los residuos de Kabat 50-56, y la LCDR3 tiene los residuos de Kabat 89-97. La numeración de Kabat se determinó utilizando el sitio web: <http://www.bioinf.org.uk/abs/abnum/>

Un miembro enlazador de una primera modalidad de la invención puede comprender una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs) como se describen en la presente, por ejemplo, una CDR3, y opcionalmente también una CDR1 y CDR2 para formar un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs). La región determinante de complementariedad (CDR) o el conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) puede ser una región determinante de complementariedad (CDR) o un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-46, o puede ser una variante de las mismas como se describe en la presente.

Un miembro enlazador puede comprender un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) H y/o L de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-46 con una o más mutaciones de aminoácidos dentro del conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) H y/o L dadas a conocer. Las mutaciones de aminoácidos son sustituciones,

supresiones o inserciones de un aminoácido. Con base en los Ejemplos proporcionados y en las secuencias dadas a conocer, puede haber, por ejemplo, hasta 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 mutaciones, por ejemplo, 5 sustituciones, dentro del conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) H y/o L. Adicionalmente, puede haber hasta 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 mutaciones en HCDR3, y/o puede haber hasta 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 mutaciones en HCDR2, y/o puede haber hasta 3, 2 ó 1 mutaciones en HCDR1, y/o puede haber hasta 6, 5, 4, 10 3, 2 ó 1 mutaciones en LCDR3, y/o puede haber 1 mutación en LCDR2 y/o LCDR1. La mutación puede ser una sustitución, o las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) H y/o L opcionalmente pueden contener una inserción o supresión de un aminoácido comparándose con las regiones determinantes de 15 complementariedad (CDRs) H y/o L dadas a conocer.

Las sustituciones, inserciones o supresiones se pueden hacer en cualquier punto de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), por ejemplo, en HCDR1, las sustituciones pueden ser de cualquiera de los residuos de Kabat 31 a 20 35, por ejemplo, cualquiera de los residuos de Kabat 31, 32, 34 y/o 35, en HCDR2, las sustituciones pueden ser de cualquiera de los residuos de Kabat 50 a 65, por ejemplo, cualquiera de los residuos de Kabat 50, 53, 54, 58, 60, y/o 64, y en HCDR3, las sustituciones pueden ser de cualquiera de los residuos de Kabat 99 a 102, por 25 ejemplo, cualquiera de los residuos de Kabat 99 a 100C, 100E, 100F

y/o 100K a 102. Por ejemplo, en LCDR1, una sustitución puede ser de cualquiera de los residuos de Kabat 24 a 34, por ejemplo, los residuos de Kabat 26 ó 27, en LCDR2 las sustituciones pueden ser de cualquiera de los residuos de Kabat 50 a 56, por ejemplo, el
5 residuo de Kabat 56, y en LCDR3, las sustituciones pueden ser de cualquiera de los residuos de Kabat 89 a 97, por ejemplo, cualquiera de los residuos de Kabat 89, y puede haber una inserción en la posición 95B. Se pueden encontrar los detalles de las mutaciones de aminoácidos específicas comparándose con la secuencia del
10 anticuerpo Ab-28 en las Tablas 20a y 20b para las HCDRs y LCDRs, respectivamente, por ejemplo, las sustituciones o inserciones de aminoácidos.

Por ejemplo, la presente invención proporciona un miembro enlazador aislado para el citomegalovirus humano (hCMV), el cual
15 comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde el conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) tiene 22 o menos alteraciones de aminoácidos a partir de un conjunto de regiones determinantes de
20 complementariedad (CDRs) en donde:

HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 3;
HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 4;
HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 5;
LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 93;
25 LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 94; y

LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 95

Por ejemplo, un miembro enlazador o dominio V_H de acuerdo con la invención puede comprender la HCDR1 del anticuerpo Ab-28 con una o más de las siguientes mutaciones:

- 5 El residuo de Kabat Asp 31 reemplazado por Gly;
 El residuo de Kabat His 32 reemplazado por Phe o Tyr;
 El residuo de Kabat Met 34 reemplazado por Ile o Leu; y
 El residuo de Kabat Val 35 reemplazado por Asn.

10 Un miembro enlazador o dominio V_H de acuerdo con la invención puede comprender la HCDR2 del anticuerpo Ab-28 con una o más de las siguientes mutaciones:

- El residuo de Kabat Trp 50 reemplazado por Ser o Cys;
 El residuo de Kabat Gln 53 reemplazado por Asn o His;
 El residuo de Kabat Ser 54 reemplazado por Thr;
15 El residuo de Kabat Gly 58 reemplazado por Lys, Asn o His;
 El residuo de Kabat Gly 60 reemplazado por Ala; y
 El residuo de Kabat Gln 64 reemplazado por Arg.

20 Un miembro enlazador o dominio V_H de acuerdo con la invención puede comprender la HCDR3 del anticuerpo Ab-28 con una o más de las siguientes mutaciones:

- El residuo de Kabat Thr 99 reemplazado por Ala;
 El residuo de Kabat Val 100 reemplazado por Met;
 El residuo de Kabat Ser 100A reemplazado por Thr;
 El residuo de Kabat Asn 100B reemplazado por Thr;
25 El residuo de Kabat Ser 100C reemplazado por Phe;

El residuo de Kabat Leu 100E reemplazado por Met o Ala;

El residuo de Kabat Ser 100F reemplazado por Gly;

El residuo de Kabat His 100K reemplazado por Tyr;

5 El residuo de Kabat Asn 100L reemplazado por Ser o Asp;

El residuo de Kabat Arg 100M reemplazado por Val o Ile;

El residuo de Kabat Leu 100N reemplazado por Met;

El residuo de Kabat Asp 101 reemplazado por Gly; y

El residuo de Kabat Ala 102 reemplazado por Val o Ile.

10 Un miembro enlazador o dominio V_L de acuerdo con la invención puede comprender la LCDR1 del anticuerpo Ab-28, en donde el residuo de Kabat Ser 26 es reemplazado por Asn, o el residuo de Kabat Ser 27 es reemplazado por Arg.

Un miembro enlazador o dominio V_L de acuerdo con la invención puede comprender la LCDR2 del anticuerpo Ab-28, en donde el residuo de Kabat Ser 56 es reemplazado por Pro.

15 Un miembro enlazador o dominio V_L de acuerdo con la invención puede comprender la LCDR3 del anticuerpo Ab-28 con una o más de las siguientes mutaciones:

20 El residuo de Kabat Gly 89 reemplazado por Ala;

El residuo de Kabat Pro 91 reemplazado por Trp;

El residuo de Kabat Arg 93 reemplazado por Ser;

El residuo de Kabat Ser 94 reemplazado por Asp;

El residuo de Kabat Ser 95a reemplazado por Gly o Ala;

25 Ala insertado al residuo de Kabat 95b;

El residuo de Kabat Val 96 reemplazado por Tyr; y

El residuo de Kabat Ile 97 reemplazado por Val.

Por consiguiente, un miembro enlazador de la invención puede
5 comprender una LCDR3 en donde el residuo de Kabat 95b es Ala, o
en donde el residuo de Kabat 95b está ausente.

La invención proporciona miembros enlazadores, los cuales
comprenden una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 de cualquiera de los
anticuerpos Ab-01 a Ab-46, y/o una LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 de
10 cualquiera de los anticuerpos 1 a 46, por ejemplo, un conjunto de
regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cualquiera
de los anticuerpos Ab-01 a Ab-46 mostrados en la Tabla 19 ó 20.

Por ejemplo, un miembro enlazador de la invención puede
comprender un conjunto de regiones determinantes de
15 complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1,
LCDR2 y LCDR3, en donde: HCDR1 es la SEQ ID No: 8; HCDR2 es
la SEQ ID No: 9; HCDR3 es la SEQ ID No: 10; LCDR1 es la SEQ ID
No: 98; LCDR2 es la SEQ ID No: 99; y LCDR3 es la SEQ ID No: 100,
que representan las regiones determinantes de complementariedad
20 (CDRs) del anticuerpo Ab-02.

Por ejemplo, un miembro enlazador de la invención puede
comprender un conjunto de regiones determinantes de
complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1,
LCDR2 y LCDR3, en donde: HCDR1 es la SEQ ID No: 13; HCDR2 es
25 la SEQ ID No: 14; HCDR3 es la SEQ ID No: 15; LCDR1 es la SEQ ID

No: 103; LCDR2 es la SEQ ID No: 104; y LCDR3 es la SEQ ID No: 105, que representan las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del anticuerpo Ab-04.

Por ejemplo, un miembro enlazador de la invención puede
5 comprender un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde: HCDR1 es la SEQ ID No: 18; HCDR2 es la SEQ ID No: 19; HCDR3 es la SEQ ID No: 20; LCDR1 es la SEQ ID No: 108; LCDR2 es la SEQ ID No: 109; y LCDR3 es la SEQ ID No:
10 110, que representan las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del anticuerpo Ab-11.

Por ejemplo, un miembro enlazador de la invención puede comprender un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1,
15 LCDR2 y LCDR3, en donde: HCDR1 es la SEQ ID No: 23; HCDR2 es la SEQ ID No: 24; HCDR3 es la SEQ ID No: 25; LCDR1 es la SEQ ID No: 113; LCDR2 es la SEQ ID No: 114; y LCDR3 es la SEQ ID No: 115, que representan las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del anticuerpo Ab-14.

20 Por ejemplo, un miembro enlazador de la invención puede comprender un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde: HCDR1 es la SEQ ID No: 3; HCDR2 es la SEQ ID No: 4; HCDR3 es la SEQ ID No: 5; LCDR1 es la SEQ ID
25 No: 93; LCDR2 es la SEQ ID No: 94; y LCDR3 es la SEQ ID No: 95,

que representan las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del anticuerpo Ab-28.

Por ejemplo, un miembro enlazador de la invención puede comprender un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde: HCDR1 es la SEQ ID No: 28; HCDR2 es la SEQ ID No: 29; HCDR3 es la SEQ ID No: 30; LCDR1 es la SEQ ID No: 108; LCDR2 es la SEQ ID No: 109; y LCDR3 es la SEQ ID No: 110, que representan las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del anticuerpo Ab-42.

El miembro enlazador puede comprender un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de V_H de uno de estos anticuerpos. Opcionalmente también puede comprender un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de V_L de uno de estos anticuerpos, y las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de V_L pueden ser a partir del mismo o de un anticuerpo diferente de aquél de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de V_H .

La invención también proporciona un dominio V_H , el cual comprende un conjunto de HCDRs de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-46, y/o un dominio V_L , el cual comprende un conjunto de LCDRs de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-46.

Típicamente, un dominio V_H se empareja con un dominio V_L para proporcionar un sitio de enlace de antígeno del anticuerpo, aunque, como se discute adicionalmente más adelante, se puede

utilizar un dominio V_H o V_L solo para enlazarse al antígeno. El dominio V_H del anticuerpo Ab-28 se puede emparejar con el dominio V_L del anticuerpo Ab-28, de tal manera que se forma un sitio de enlace de antígeno del anticuerpo, el cual comprende ambos dominios V_H y V_L del anticuerpo Ab-28. Se proporcionan modalidades análogas para los otros dominios V_H y V_L que se dan a conocer en la presente. En otras modalidades, el V_H del anticuerpo Ab-28 se empareja con un dominio V_L diferente del V_L del anticuerpo. La promiscuidad de cadenas ligeras está bien establecida en este campo (Kang y colaboradores, 1991). Nuevamente, la invención proporciona modalidades análogas para los otros dominios V_H y V_L que se dan a conocer en la presente.

Por consiguiente, una cadena de IgH que contenga V_H de cualquiera de los anticuerpos 1 a 46 se puede emparejar con la cadena de IgL que contenga V_L de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-46 para generar un miembro enlazador específico de gB.

Un miembro enlazador puede comprender una molécula de anticuerpo que tenga una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs), por ejemplo, un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs), dentro de una estructura de anticuerpo. Las regiones de estructura pueden ser de las secuencias del segmento genético de la línea germinal humana. Las secuencias del segmento genético de la línea germinal humana son conocidas por los expertos en este campo, y se pueden acceder, por ejemplo, a partir de la compilación de VBase o de la base de

datos en línea IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Un miembro enlazador de la invención puede ser una molécula de anticuerpo humano aislada que tenga un dominio V_H , el cual comprenda un conjunto de HCDRs en una estructura de la línea germinal humana, por ejemplo, IGHV1-2. Por consiguiente, las regiones de estructura FWR1, FWR2 y/o FWR3 del dominio V_H pueden comprender regiones de estructura del segmento genético de la línea germinal humana IGHV1-2. FWR4 puede comprender una región de estructura de los segmentos J de la línea germinal humana seleccionados a partir de, por ejemplo, las SEQ ID NOs: 188 a 191. La secuencia de aminoácidos de V_H FWR1 puede ser la SEQ ID No: 181. La secuencia de aminoácidos de V_H FWR2 puede ser la SEQ ID No: 182. La secuencia de aminoácidos de V_H FWR3 puede ser la SEQ ID No: 183 ó 184.

Una molécula de anticuerpo o un dominio V_H de la invención puede comprender el siguiente conjunto de regiones de estructura de cadena pesada:

FWR1 SEQ ID No: 181; FWR2 SEQ ID No: 182; FWR3 SEQ ID No: 183 ó 184; o puede comprender el conjunto mencionado de regiones de estructura de cadena pesada con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 alteraciones de aminoácidos, tales como una sustitución, una inserción, o una supresión.

Adicionalmente, un anticuerpo de la invención puede incluir un dominio V_H que sea codificado por una secuencia de ácido nucleico

que sea cuando menos el 80 por ciento homóloga a la secuencia genética de la línea germinal IGHV1-2, de preferencia, la secuencia de ácido nucleico es cuando menos el 90 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento homóloga a la secuencia genética de la línea germinal IGHV1-2, y de una manera muy preferible, es cuando menos el 98 por ciento o el 99 por ciento homóloga a la secuencia genética de la línea germinal IGHV1-2. El dominio V_H de un anticuerpo de la invención puede ser cuando menos el 80 por ciento homólogo a la secuencia de aminoácidos del dominio V_H codificada por la secuencia genética de la línea germinal IGHV1-2. De preferencia, la secuencia de aminoácidos del dominio V_H es cuando menos el 90 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento homólogo a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia genética de la línea germinal IGHV1-2, y de una manera muy preferible, es cuando menos el 98 por ciento o el 99 por ciento homólogo a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia genética de la línea germinal IGHV1-2.

Normalmente el miembro enlazador también tiene un dominio V_L, el cual comprende un conjunto de LCDRs, por ejemplo, en una estructura de la línea germinal humana, por ejemplo, IGLV1-51. Por consiguiente, las regiones de estructura del dominio V_L pueden comprender las regiones de estructura FWR1, FWR2 y/o FWR3 del segmento genético de la línea germinal humana IGLV1-51. FWR4 puede comprender una región de estructura del segmento J de la línea germinal humana IGLJ2 (SEQ ID No: 193). La secuencia de

aminoácidos de V_L FWR1 puede ser la SEQ ID No: 185. La secuencia de aminoácidos de V_L FWR2 puede ser la SEQ ID No: 186. La secuencia de aminoácidos de V_L FWR3 puede ser la SEQ ID No: 187.

Una molécula de anticuerpo o un dominio V_L de la invención
5 puede comprender el siguiente conjunto de regiones de estructura de cadena ligera:

FWR1 SEQ ID No: 185; FWR2 SEQ ID No: 186; FWR3 SEQ ID No: 187; o puede comprender el conjunto mencionado de regiones de estructura de cadena ligera con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
10 ó 14 alteraciones de aminoácidos, tales como una sustitución, una inserción, o una supresión.

Adicionalmente, un anticuerpo de la invención puede incluir un dominio V_L que sea codificado por una secuencia de ácido nucleico que sea cuando menos el 80 por ciento homóloga a la secuencia
15 genética de la línea germinal IGLV1-51. De preferencia, la secuencia de ácido nucleico es cuando menos el 90 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento homóloga a la secuencia genética de la línea germinal IGLV1-51, y de una manera muy preferible, es cuando menos el 98 por ciento o el 99 por ciento homóloga a la
20 secuencia genética de la línea germinal IGLV1-51. El dominio V_L de un anticuerpo de la invención puede ser cuando menos el 80 por ciento homólogo a la secuencia de aminoácidos del dominio V_L codificado por la secuencia genética de la línea germinal IGLV1-51. De preferencia, la secuencia de aminoácidos del dominio V_L es
25 cuando menos el 90 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el

97 por ciento homóloga a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia genética de la línea germinal IGLV1-51, y de una manera muy preferible, es cuando menos el 98 por ciento o el 99 por ciento homóloga a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia genética de la línea germinal IGLV1-51.

Por ejemplo, una molécula de anticuerpo de la invención puede comprender un conjunto de regiones de estructura de cadena pesada y ligera, en donde la FWR1 de cadena pesada es la SEQ ID No: 181; la FWR2 de cadena pesada es la SEQ ID No: 182; la FWR3 de cadena pesada es la SEQ ID No: 183; la FWR1 de cadena ligera es la SEQ ID No: 185; la FWR2 de cadena ligera es la SEQ ID No: 186; la FWR3 de cadena ligera es la SEQ ID No: 187; o puede comprender el conjunto mencionado de regiones de estructura de cadena pesada y ligera con 10 o menos, por ejemplo, cinco o menos, alteraciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones.

Los miembros enlazadores Ab-47 a Ab-50, de acuerdo con la invención, se aislaron inicialmente a partir de tres donantes infectados por el citomegalovirus humano (hCMV) y se aislaron a partir de líneas de células-B inmortalizadas con EBV, referidas como SM10, SM12, 2C2 o 1G2. A partir de estas cuatro líneas celulares, se pudieron identificar cuatro secuencias de codificación V_H diferentes y cinco secuencias de codificación V_L diferentes de los anticuerpos humanos (Tabla 12). La combinación de todas las secuencias de codificación V_H y V_L a partir de cada línea celular como cadenas de IgH e IgL puede generar teóricamente 20

anticuerpos diferentes. De éstos, se han identificado cuatro anticuerpos recombinantes diferentes, los cuales fueron neutralizantes del citomegalovirus humano (hCMV) en un ensayo de rastreo biológico de primera línea utilizando expresión de luciferasa, la cepa de laboratorio AD-169 del citomegalovirus humano (hCMV), y fibroblastos primarios de prepucio humano. Se encontró que todos estos anticuerpos recombinantes neutralizan el citomegalovirus humano (hCMV) con una alta potencia (IC_{50} s por debajo de 0.6 microgramos/mililitro; Tabla 14 más adelante).

Las estructuras y localizaciones de los dominios variables del miembro enlazador se pueden determinar haciendo referencia a Kabat y colaboradores (1991), y a las actualizaciones del mismo. En la presente se describen los miembros enlazadores Ab-46, Ab-47, Ab-48 y Ab-50, cada uno de los cuales comprende el conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) como se especifican en la Tabla 19, en donde las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) se identificaron by el sistema de numeración de Kabat (Kabat y Wu, 1991), y se determinaron utilizando el sitio web: <http://www.bioinf.org.uk/abs/abnum/>.

Un miembro enlazador de una segunda modalidad de la invención puede comprender una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs) como se describen en la presente, por ejemplo, una CDR3, y opcionalmente también una CDR1 y CDR2 para formar un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs). La región determinante de

complementariedad (CDR) o el conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) puede ser una región determinante de complementariedad (CDR) o un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cualquiera de los anticuerpos Ab-47 a Ab-50, o puede ser una variante de las mismas, como se describe en la presente.

Un miembro enlazador puede comprender un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) H y/o L de cualquiera de los anticuerpos Ab-47 a Ab-50 con una o más mutaciones de aminoácidos dentro del conjunto que se da a conocer de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) H y/o L. Las mutaciones de aminoácidos son sustituciones, supresiones o inserciones de un aminoácido. Basándose en los Ejemplos proporcionados y las secuencias que se dan a conocer, puede haber, por ejemplo, hasta 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 mutaciones dentro del conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) H y/o L. La mutación puede ser una sustitución, o las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) H y/o L pueden contener opcionalmente una inserción o supresión de un aminoácido, comparándose con el conjunto que se da a conocer de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) H y/o L. Se pueden hacer sustituciones, inserciones o supresiones en cualquier punto en las regiones determinantes de complementariedad (CDRs).

La invención proporciona miembros enlazadores que comprenden una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 de cualquiera de los

anticuerpos Ab-47 a Ab-50, y/o una LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 de cualquiera de los anticuerpos Ab-47 a Ab-50, por ejemplo, un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cualquiera de los anticuerpos Ab-47 a Ab-50 mostrados en la

5 Tabla 19.

Por ejemplo, un miembro enlazador de la invención puede comprender un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde: HCDR1 es la SEQ ID No: 243; HCDR2

10 es la SEQ ID No: 244; HCDR3 es la SEQ ID No: 245; LCDR1 es la SEQ ID No: 263; LCDR2 es la SEQ ID No: 264; y LCDR3 es la SEQ ID No: 265, que representan las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del anticuerpo Ab-47.

Por ejemplo, un miembro enlazador de la invención puede comprender un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde: HCDR1 es la SEQ ID No: 248; HCDR2

15 es la SEQ ID No: 249; HCDR3 es la SEQ ID No: 250; LCDR1 es la SEQ ID No: 268; LCDR2 es la SEQ ID No: 269; y LCDR3 es la SEQ ID No: 270, que representan las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del anticuerpo Ab-48.

20

Por ejemplo, un miembro enlazador de la invención puede comprender un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde: HCDR1 es la SEQ ID No: 253; HCDR2

25

87
48

es la SEQ ID No: 254; HCDR3 es la SEQ ID No: 255; LCDR1 es la SEQ ID No: 273; LCDR2 es la SEQ ID No: 274; y LCDR3 es la SEQ ID No: 275, que representan las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del anticuerpo Ab-49.

5 Por ejemplo, un miembro enlazador de la invención puede comprender un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde: HCDR1 es la SEQ ID No: 258; HCDR2 es la SEQ ID No: 259; HCDR3 es la SEQ ID No: 260; LCDR1 es la
10 SEQ ID No: 278; LCDR2 es la SEQ ID No: 279; y LCDR3 es la SEQ ID No: 280, que representan las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del anticuerpo Ab-50.

Un miembro enlazador de la invención puede ser una molécula de anticuerpo humano aislada que tiene un dominio V_H , el cual
15 comprende un conjunto de HCDRs en una estructura de la línea germinal humana, por ejemplo, IGHV4-39 o IGHV4-59. Por consiguiente, las regiones de estructura FWR1, FWR2 y/o FWR3 del dominio V_H pueden comprender las regiones de estructura del segmento genético de la línea germinal humana IGHV4-39 o IGHV4-
20 59. FWR4 puede comprender una región de estructura de los segmentos J de la línea germinal humana seleccionados a partir de cualquiera de los seis segmentos J de cadena pesada (véase Ravetch y colaboradores, 1981).

La secuencia de aminoácidos del dominio V_H de Ab-47 o Ab-50
25 puede comprender el siguiente conjunto de regiones de estructura de

cadena pesada de IGHV4-39: FWR1 SEQ ID No: 281, FWR2 SEQ ID No: 282; FWR3 SEQ ID No: 283; o puede comprender el conjunto mencionado de regiones de estructura de cadena pesada con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ó 11 alteraciones de aminoácidos, tales como una
5 sustitución, una inserción, o una supresión.

La secuencia de aminoácidos del dominio V_H de Ab-48 o Ab-48 puede comprender el siguiente conjunto de regiones de estructura de cadena pesada de IGHV4-59: FWR1 SEQ ID No: 284, FWR2 SEQ ID No: 285; FWR3 SEQ ID No: 286; o puede comprender el conjunto
10 mencionado de regiones de estructura de cadena pesada con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ó 13 alteraciones de aminoácidos, tales como una sustitución, una inserción, o una supresión.

Adicionalmente, un anticuerpo de la invención puede incluir un dominio V_H que sea codificado por una secuencia de ácido nucleico
15 que sea cuando menos el 75 por ciento homóloga a la secuencia genética de la línea germinal IGHV4-39 o IGHV4-59, de preferencia, la secuencia de ácido nucleico es cuando menos el 80 por ciento, el 85 por ciento, el 90 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento homóloga a la secuencia genética de la línea germinal
20 IGHV4-39 o IGHV4-59, y de una manera muy preferible, es cuando menos el 98 por ciento o el 99 por ciento homóloga a la secuencia genética de la línea germinal IGHV4-39 o IGHV4-59. El dominio V_H de un anticuerpo de la invención puede ser cuando menos el 75 por ciento homólogo a la secuencia de aminoácidos del dominio V_H
25 codificado por la secuencia genética de la línea germinal IGHV4-39 o

IGHV4-59. De preferencia, la secuencia de aminoácidos del dominio V_H es cuando menos el 80 por ciento, el 85 por ciento, el 90 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento homóloga a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia genética de la línea germinal IGHV4-39 o IGHV4-59, y de una manera muy preferible, es cuando menos el 98 por ciento o el 99 por ciento homóloga a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia genética de la línea germinal IGHV1-2.

Un miembro enlazador de la invención también puede comprender un dominio V_L , el cual comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cadena ligera kappa en una estructura de la línea germinal humana, por ejemplo, IGKV2D-28 o IGKV1D-33. Por consiguiente, las regiones de estructura del dominio V_L FWR1, FWR2 y/o FWR3 pueden comprender las regiones de estructura del segmento genético de la línea germinal humana IGKV2D-28 o IGKV1D-33. FWR4 puede comprender una región de estructura de los segmentos J de la línea germinal humana seleccionados a partir de cualquiera de los cinco segmentos J kappa (véase Hieter y colaboradores, 1982).

La secuencia de aminoácidos del dominio V_L de Ab-47 o Ab-48 puede comprender el siguiente conjunto de regiones de estructura de cadena ligera kappa de IGKV2D-28: FWR1 SEQ ID No: 287, FWR2 SEQ ID No: 288; FWR3 SEQ ID No: 289; o puede comprender el conjunto mencionado de regiones de estructura de cadena ligera con 1 ó 2 alteraciones de aminoácidos, tales como una sustitución, una

inserción, o una supresión.

La secuencia de aminoácidos del dominio V_L de Ab-49 puede comprender el siguiente conjunto de regiones de estructura de cadena ligera de IGKV1D-33: FWR1 SEQ ID No: 290, FWR2 SEQ ID No: 291; FWR3 SEQ ID No: 292; o puede comprender el conjunto mencionado de regiones de estructura de cadena ligera con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 alteraciones de aminoácidos, tales como una sustitución, una inserción, o una supresión.

Un miembro enlazador de la invención también puede comprender un dominio V_L , el cual comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cadena ligera lambda en una estructura de la línea germinal humana, por ejemplo, IGLV1-47. Por consiguiente, las regiones de estructura del dominio V_L FWR1, FWR2 y/o FWR3 pueden comprender las regiones de estructura del segmento genético de la línea germinal humana IGLV1-47. FWR4 puede comprender una región de estructura de los segmentos J de la línea germinal humana seleccionados a partir de cualquiera de los cuatro segmentos J lambda (véase Udey y Blomberg 1987; Vasicek y Leder, 1990).

La secuencia de aminoácidos del dominio V_L de Ab-50 puede comprender el siguiente conjunto de regiones de estructura de cadena ligera lambda de IGLV1-47: FWR1 SEQ ID No: 293, FWR2 SEQ ID No: 294; FWR3 SEQ ID No: 295; o puede comprender el conjunto mencionado de regiones de estructura de cadena ligera con 1 ó 2 alteraciones de aminoácidos, tales como una sustitución, una

inserción, o una supresión.

Adicionalmente, un anticuerpo de la invención puede incluir un dominio V_L que sea codificado por una secuencia de ácido nucleico que sea cuando menos el 90 por ciento homóloga a la secuencia genética de la línea germinal IGKV2D-28, IGKV1D-33 ó IGLV1-47. De preferencia, la secuencia de ácido nucleico es cuando menos el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento homóloga a la secuencia genética de la línea germinal IGKV2D-28, IGKV1D-33 ó IGLV1-47, y de una manera muy preferible, es cuando menos el 98 por ciento o el 99 por ciento homóloga a la secuencia genética de la línea germinal IGKV2D-28, IGKV1D-33 ó IGLV1-47. El dominio V_L de un anticuerpo de la invención puede ser cuando menos el 90 por ciento homólogo a la secuencia de aminoácidos del dominio V_L codificado por la secuencia genética de la línea germinal IGKV2D-28, IGKV1D-33 ó IGLV1-47. De preferencia, la secuencia de aminoácidos del dominio V_L es cuando menos el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento homóloga a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia genética de la línea germinal IGKV2D-28, IGKV1D-33 ó IGLV1-47, y de una manera muy preferible, es cuando menos el 98 por ciento o el 99 por ciento homóloga a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia genética de la línea germinal IGKV2D-28, IGKV1D-33 ó IGLV1-47.

Un miembro enlazador de la invención puede ser uno que compita para enlazarse al citomegalovirus humano (hCMV) con cualquier miembro enlazador que (i) se enlace al citomegalovirus

52

humano (hCMV), y (ii) comprenda un miembro enlazador, dominio V_H y/o V_L , CDR, por ejemplo, HCDR3, y/o conjunto de CDRs que se dan a conocer en la presente.

La competición entre los miembros enlazadores se puede
5 ensayar *in vitro*, por ejemplo, utilizando ensayos de enlace, como
ELISA, resonancia de plasmón superficial, y/o marcando una
molécula reportera específica para un miembro enlazador, la cual se
pueda detectar en la presencia de uno o más miembros enlazadores
no marcados diferentes, para hacer posible la identificación de los
10 miembros enlazadores que se enlacen con el mismo epítipo o con un
epítipo traslapado. Estos métodos son fácilmente conocidos por un
experto ordinario en este campo, y se describen con mayor detalle
en la presente (véanse los Ejemplos). Por consiguiente, un aspecto
adicional de la presente invención proporciona un miembro enlazador
15 que comprende un sitio de enlace de antígeno del anticuerpo que
compite con una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una molécula
de anticuerpo que comprende un dominio V_H y/o V_L , CDR, por
ejemplo, HCDR3, ó conjunto de CDRs de cualquiera de los
anticuerpos Ab-01 a Ab-50, para enlazarse al citomegalovirus
20 humano (hCMV).

En algunos aspectos adicionales, la invención proporciona un
ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un
miembro enlazador, el cual comprende un dominio V_H y/o V_L de
acuerdo con la presente invención, y métodos para la preparación de
25 un miembro enlazador, el cual comprende un dominio V_H y/o un

dominio V_L de la invención, codificado por el ácido nucleico mencionado bajo condiciones que provoquen la producción de este miembro enlazador, el cual comprende el dominio V_H y/o el dominio V_L , y recuperarlo.

5 Otro aspecto de la presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican cualquiera de las secuencias V_H CDR o V_L CDR que se dan a conocer en la presente.

Un aspecto adicional proporciona una célula huésped que contiene o que está transfectada con el ácido nucleico de la
10 invención.

Otros aspectos de la presente invención describen composiciones que contienen los miembros enlazadores de la invención, y su uso en los métodos para enlazar, inhibir y/o neutralizar la infección por el citomegalovirus humano (hCMV),
15 incluyendo los métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

Los miembros enlazadores de acuerdo con la invención se pueden utilizar en un método de tratamiento o de diagnóstico, tal como un método para el tratamiento (el cual puede incluir el
20 tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en el cuerpo humano o animal (por ejemplo, en un paciente humano), el cual comprende administrar a dicho cuerpo humano o animal, una cantidad efectiva de un miembro enlazador de la invención, o una combinación de varios miembros enlazadores de la invención. Las
25 condiciones que se pueden tratar de acuerdo con la presente

invención incluyen cualquiera en donde tenga una función el citomegalovirus humano (hCMV), como se discute con detalle en cualquier otra parte de la presente.

Estos y otros aspectos de la invención se describen con mayor
5 detalle más adelante.

Terminología

Es conveniente señalar aquí que 'y/o' cuando se utiliza en la presente, debe tomarse como la divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados, con o sin el
10 otro. Por ejemplo, 'A y/o B' se debe tomar como la divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B, y (iii) A y B, justamente como si se estipulara cada conjunto individualmente en la presente.

hCMV

La secuencia de aminoácidos de longitud completa del
15 citomegalovirus humano (hCMV) tiene el Número de Acceso de GenBank X17403 (genoma completo de la cepa AD169 del citomegalovirus humano), y comprende una secuencia de 229,354 pares de bases (Chee y colaboradores, 1990; Bankier y colaboradores, 1991).

20 gB

El complejo gB es un complejo de glicoproteína superficial de la envoltura del virión del citomegalovirus (CMV). Hay un número de cepas diferentes de la proteína gB:

gB cepa AD169 – SwissProt Acc. No. P06473 (SEQ ID No: 239)

25 gB cepa Towne - SwissProt Acc. No. P13201 (SEQ ID No: 240)

Los dominios neutralizantes de gB conocidos incluyen el dominio antigénico-1 (AD-1; aminoácidos 552-635 de la SEQ ID NO: 239 [AD169]), y el dominio antigénico-2 (AD-2; aminoácidos 67-86 de la SEQ ID NO: 239 [AD169]). También existe un dominio antigénico adicional, AD-3 (aminoácidos 783-906 de la SEQ ID NO: 239 [AD169]). Este dominio se localiza intraviralmente y no es el objetivo de los anticuerpos neutralizantes.

Miembro enlazador

Esto describe un miembro de un par de moléculas que se enlazan una con la otra. Los miembros de un par de enlace se pueden derivar naturalmente, o se pueden producir de una manera sintética total o parcialmente. Un miembro de un par de enlace puede ser un polipéptido, ácido nucleico, carbohidrato, lípido, compuesto de bajo peso molecular, un oligonucleótido, un oligopéptido, interferencia de ARN (ARNi; véase Milhavet y colaboradores, 2003), anti-sentido (véase Opalinska y Gewirtz, 2003), una proteína recombinante, un anticuerpo, o fragmentos de los mismos, o conjugados o proteínas de fusión de los mismos.

Los inhibidores anti-sentido o de ARNi para utilizarse en la presente invención pueden comprender moléculas de ácidos nucleicos capaces de modular la expresión genética, por ejemplo, capaces de sub-regular la expresión de una secuencia que codifique una proteína gB de hCMV. Estas moléculas de ácidos nucleicos pueden incluir, pero no se limitan a, moléculas anti-sentido, ácido nucleico de interferencia corto (siNA), ARN de doble cadena

(dsARN), micro-ARN, ARN de horquilla corto (shARN), moléculas sensoras de ácido nucleico, alozimas, moléculas enzimáticas de ácidos nucleicos, y oligonucleótidos tríplex, y cualquier otra molécula de ácido nucleico que se pueda utilizar para mediar la interferencia del ARN 'ARNi' o el silenciamiento genético de una manera específica de la secuencia.

Un miembro del par de moléculas puede tener un área sobre su superficie, o una cavidad, la cual se enlaza a, y por consiguiente es complementaria para, una organización espacial y polar particular del otro miembro del par de moléculas. Los ejemplos de los tipos de pares de enlace son antígeno-anticuerpo, receptor-ligando, y enzima-sustrato.

Un miembro enlazador normalmente comprende una molécula que tiene un sitio de enlace. Por ejemplo, un miembro enlazador puede ser una molécula de anticuerpo o una proteína que no sea anticuerpo, que comprende un sitio de enlace. Se puede proporcionar un sitio de enlace por medio de la configuración de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) sobre las regiones de estructura del anticuerpo y/o sobre los andamiajes de proteína que no son anticuerpos, tales como fibronectina o citocromo B, etc. (Haan y Maggos 2004; Koide y colaboradores, 1998; Nygren y colaboradores, 1997), o mediante la selección aleatoria o la mutación de los residuos de aminoácidos de un ciclo dentro de un andamiaje de proteína para conferir especificidad de enlace para un objetivo deseado. Los andamiajes para diseñar los sitios de enlace

novedosos en las proteínas, han sido revisados con detalle por Nygren y colaboradores, *ibid*. Los andamiajes de proteínas para los miméticos de anticuerpos se dan a conocer en la Publicación Internacional Número WO 00/034784 A1 (Lipovsek), en donde se describen proteínas (miméticos de anticuerpos) que incluyen un dominio de fibronectina tipo III que tiene cuando menos un ciclo de selección aleatoria. Un andamiaje adecuado para injertar una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs), por ejemplo, un conjunto de HCDRs, puede ser proporcionado por cualquier miembro de dominio de la súper-familia de genes de inmunoglobulina. El andamiaje puede ser una proteína humana o no humana. Una ventaja de un andamiaje de una proteína que no sea anticuerpo es que puede proporcionar un sitio de enlace de antígeno en una molécula de andamiaje que es más pequeña y/o más fácil de elaborar que cuando menos algunas moléculas de anticuerpos. El tamaño pequeño de un miembro enlazador puede conferir propiedades fisiológicas útiles, tales como una capacidad para entrar en las células, para penetrar profundamente en los tejidos, o alcanzar los objetivos dentro de otras estructuras, o para enlazarse dentro de las cavidades de proteína del antígeno objetivo. El uso de sitios de enlace de antígeno en los andamiajes de proteína que no es anticuerpo, se revisa en Wess, 2004. Son típicas las proteínas que tienen una estructura base estable y uno o más ciclos variables, en donde las secuencias de aminoácidos del ciclo o de los ciclos se mutan específicamente o de una manera aleatoria, para crear un sitio

de enlace de antígeno que se enlaza al objetivo. Estas proteínas incluyen los dominios de enlace de IgG de la proteína A a partir de *S. aureus*, transferrina, tetranectina, fibronectina, lipocalinas, así como gamma-cristalina y otros andamiajes Affilin^{MR} (Scil Proteins).

5 Los ejemplos de otros planteamientos incluyen 'Microcuerpos' sintéticos basados en ciclótidos - pequeñas proteínas que tienen enlaces de disulfuro intra-moleculares, Microproteins (Versabodies^{MR}, Amunix), y proteínas de repetición de anquirina (DARPs, Molecular Partners).

10 En adición a las secuencias de anticuerpos y/o a un sitio de enlace de antígeno, un miembro enlazador de acuerdo con la presente invención puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, que formen un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o para impartir a la molécula otra característica funcional

15 en adición a la capacidad para enlazarse al antígeno. Los miembros enlazadores de la invención pueden llevar una marca detectable, o se pueden conjugar con una toxina o con una fracción o enzima de dirección (por ejemplo, por medio de un enlace o un enlazador de peptidilo). Por ejemplo, un miembro enlazador puede comprender un

20 sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio de enzima), así como un sitio de enlace de antígeno, en donde el sitio de enlace de antígeno se enlaza al antígeno y, por consiguiente, dirige el sitio catalítico hacia el antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo, mediante disociación.

25 Aunque, como se observó, las regiones determinantes de

complementariedad (CDRs) pueden ser llevadas por andamiajes que no sean anticuerpos, la estructura para llevar una región determinante de complementariedad (CDR) o un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de la invención será en términos generales una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o una porción sustancial de la misma, en donde la región determinante de complementariedad (CDR) o el conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) se localiza en una ubicación correspondiente a la región determinante de complementariedad (CDR) o al conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de los dominios variables de anticuerpos V_H y V_L que se presentan naturalmente codificados por los genes de inmunoglobulina reconfigurados. Las estructuras y localizaciones de los dominios variables de inmunoglobulina se pueden determinar haciendo referencia a Kabat y Wu, (1991), y a las actualizaciones del mismo. Hay un número de recursos académicos y comerciales en línea para pedir esta base de datos. Por ejemplo, véase Martin, 1996 y el recurso en línea asociado, actualmente en la dirección web de

20 <http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>.

Región CDR o CDR, pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, como son definidas por Kabat y colaboradores, *ibid*. Un anticuerpo típicamente contiene 3 regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cadena pesada, denominadas como

25

HCDR1, HCDR2, y HCDR3, y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cadena ligera, denominadas como LCDR1, LCDR2 y LCDR3. El término CDR o CDRs se utiliza en la presente con el objeto de indicar una de estas regiones o varias, o
5 inclusive todas estas regiones que contienen la mayoría de los residuos de aminoácidos responsables del enlace por afinidad del anticuerpo para el antígeno o el epítipo que reconoce.

Entre las seis secuencias CDR, la tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene la mayor variabilidad de tamaño, es decir, la
10 mayor diversidad, esencialmente debido al mecanismo conocido en la materia como reconfiguración V(D)J de los segmentos genéticos V, D y J del *locus* genético de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal. La HCDR3 puede ser tan corta como de dos aminoácidos, o tan larga como de 26 aminoácidos, o puede tener
15 cualquier longitud entre estos dos extremos. La longitud de la CDR también puede variar de acuerdo con la longitud que pueda ser acomodada por la estructura subyacente particular. Funcionalmente, la HCDR3 puede tener una función importante en la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal y colaboradores, 1974; Amit y
20 colaboradores, 1986; Chotia y colaboradores, 1987, 1989; Caton y colaboradores, 1990; Sharon 1990a, Sharon 1990b, Kabat y colaboradores, 1991).

En los miembros enlazadores Ab-01 a Ab-46 de la presente invención, como se indica en las Tablas 20a y b, la HCDR1 puede
25 ser de 5 aminoácidos de largo, consistentes en los residuos de Kabat

31-35. La HCDR2 puede ser de 17 aminoácidos de largo, consistentes en los residuos de Kabat 50-65. La HCDR3 puede ser de 22 aminoácidos de largo, consistentes en los residuos de Kabat 95-102. La LCDR1 puede ser de 13 aminoácidos de largo, consistentes en los residuos de Kabat 24-34. La LCDR2 puede ser de 7 aminoácidos de largo, consistentes en los residuos de Kabat 50-56. La LCDR3 puede ser de 10 aminoácidos de largo, consistentes en los residuos de Kabat 89-97.

En los miembros enlazadores Ab-47 a Ab-50 de la presente invención, la HCDR1 puede ser de 7 o 5 aminoácidos de largo, consistentes en los residuos de Kabat 31-37 o 31-35, respectivamente. La HCDR2 puede ser de 16 aminoácidos de largo, y la HCDR3 puede ser de 10, 15, 17 o 22 aminoácidos de largo. La LCDR1 puede ser de 11 aminoácidos de largo, consistentes en los residuos de Kabat 24-34; o de 13 aminoácidos de largo, consistentes en los residuos de Kabat 23-35; o de 16 aminoácidos de largo, consistentes en los residuos de Kabat 24-39. La LCDR2 puede ser de 7 aminoácidos de largo, y la LCDR3 puede ser de 9 aminoácidos de largo.

20 Molécula de anticuerpo

Esto describe una inmunoglobulina producida ya sea naturalmente, o parcial o totalmente de una manera sintética. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que comprenda un sitio de enlace de antígeno del anticuerpo. Se debe entender en la presente que la invención no se relaciona con los

anticuerpos en su forma natural, es decir, no están en su medio ambiente natural, pero que han sido capaces de aislarse o de obtenerse mediante purificación a partir de fuentes naturales, o de otra manera se han obtenido mediante recombinación genética, o mediante síntesis química, y que entonces pueden contener aminoácidos no naturales. Los fragmentos de anticuerpos que comprenden un sitio de enlace de antígeno del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, moléculas tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, scFv, Fv, dAb y Fd. Se han diseñado otras diferentes moléculas de anticuerpos que incluyen uno o más sitios de enlace de antígeno del anticuerpo, incluyendo, por ejemplo, Fab2, Fab3, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos, y también anticuerpos biespecíficos y triespecíficos. Las moléculas de anticuerpos y los métodos para su construcción y uso se describen en Hollinger y Hudson (2005).

Es posible tomar los anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos, y emplear las técnicas de la tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que se enlacen al antígeno objetivo. Estas técnicas pueden involucrar la introducción de ADN que codifique la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), de un anticuerpo para las regiones constantes, o las regiones constantes más las regiones de estructura, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, las Patentes Europeas Números EP0184187A (Kudo y colaboradores)

o EP0239400A (Winter). Un hibridoma u otra célula que produzca un anticuerpo se puede someter a mutación genética o a otros cambios, lo cual puede o no alterar la especificidad de enlace de los anticuerpos producidos.

5 Debido a que los anticuerpos se pueden modificar en un número de formas, el término 'molécula de anticuerpo' se debe interpretar para cubrir cualquier miembro enlazador o sustancia que tenga un sitio de enlace de antígeno del anticuerpo con la especificidad requerida y/o que se enlace al antígeno. Por
10 consiguiente, este término cubre los anticuerpos biespecíficos o triespecíficos, así como los fragmentos de anticuerpos y sus derivados, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un sitio de enlace de antígeno del anticuerpo, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por consiguiente, se incluyen las moléculas
15 quiméricas que comprenden un sitio de enlace de antígeno del anticuerpo, o su equivalente, fusionado con otro polipéptido (por ejemplo, derivado a partir de otra especie o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpo). La clonación y expresión de los anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la Patentes
20 Europeas Números EP0120694A (Boss y colaboradores) y EP0125023A (Cabilly y colaboradores).

 Otras técnicas disponibles en la técnica del diseño de anticuerpos han hecho posible aislar los anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, se pueden hacer hibridomas humanos,
25 como es descrito por Kontermann y Dubel (2001). La exhibición de

fagos, otra técnica establecida para la generación de miembros enlazadores se ha descrito con detalle en muchas publicaciones, tales como Kontermann y Dubel, *ibid* y en la Publicación Internacional Número WO 92/01047 A1 (McCafferty y colaboradores).

5 Se pueden utilizar ratones transgénicos en donde se inactiven los genes de anticuerpos de ratón, y sean funcionalmente reemplazados con genes de anticuerpos humanos, mientras que se dejen intactos otros componentes del sistema inmunológico del ratón, para aislar los anticuerpos humanos (Mendez y colaboradores, 10 1997). De una manera alternativa, se puede emplear el método descrito por Grawbajo y Melchers (Publicación Internacional Número WO 03/068819 A1), para generar linfocitos precursores de vertebrados genéticamente modificados para la producción de anticuerpos heterólogos o de proteínas de enlace. Se pueden 15 producir anticuerpos humanizados empleando las técnicas conocidas en la materia, tales como aquéllas que se dan a conocer, por ejemplo, en la Publicación Internacional Número WO 91/09967 A1 (Adair y colaboradores). Además, la Publicación Internacional Número WO 04/006955 A1 (Foote) describe métodos para humanizar 20 anticuerpos, basándose en la selección de las secuencias de estructura de región variable a partir de genes de anticuerpos humanos, mediante la comparación de los tipos de estructura de CDR canónica para las secuencias de CDR de la región variable de un anticuerpo no humano para los tipos de estructura de CDR 25 canónica para las CDRs correspondientes a partir de una biblioteca

de secuencias de anticuerpos humanos, por ejemplo, los segmentos genéticos de anticuerpos de la línea germinal. Las regiones variables de anticuerpos humanos que tienen tipos de estructura de CDR canónica similares a las CDRs no humanas, forman un subconjunto de secuencias de anticuerpos humanos miembros a partir de las cuales se seleccionan las secuencias de estructura humanas. Los miembros del subconjunto se pueden clasificar adicionalmente por similitudes de aminoácidos entre las secuencias de CDR humanas y no humanas. En el método de la Publicación Internacional Número WO 04/006955 A1 *ibid*, las secuencias humanas de clasificación superior se seleccionan para proporcionar las secuencias de estructura para construir un anticuerpo quimérico que reemplace funcionalmente a las secuencias de CDR humanas con las contrapartes de CDR no humanas, utilizando las estructuras humanas miembros del subconjunto seleccionadas, proporcionando de esta manera un anticuerpo humanizado de una alta afinidad y una baja inmunogenicidad, sin la necesidad de comparar las secuencias de estructura entre los anticuerpos no humanos y humanos. También se dan a conocer anticuerpos quiméricos hechos de acuerdo con el método.

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo entero pueden llevar a cabo la función de los antígenos de enlace. Los ejemplos de los fragmentos de enlace son: (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y $CH1$; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y $CH1$; (iii) el fragmento Fv que consiste

en los dominios V_L y V_H de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward y colaboradores, 1989; McCafferty y colaboradores, 1990; Holt y colaboradores, 2003), el cual consiste en un dominio V_H o un dominio V_L ; (v) las regiones CDR aisladas; (vi) los fragmentos

5 $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados; (vii) las moléculas Fv de una sola cadena (scFv), en donde un dominio V_H y un dominio V_L se enlazan mediante un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de enlace de antígeno (Bird y colaboradores,

10 1998; Huston y colaboradores 1988); (viii) los dímeros Fv de una sola cadena biespecíficos (Publicación Internacional Número WO 93/011161 A1 (Whitlow y colaboradores)), y (ix) los 'diacuerpos', que son fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos mediante fusión genética (Holliger y colaboradores, 1993, y

15 Publicación Internacional Número WO 94/13804 A1). Fv, scFv o las moléculas de diacuerpo, se pueden estabilizar mediante la incorporación de puentes de disulfuro que enlacen a los dominios V_H y V_L (Reiter y colaboradores, 1996). También se pueden hacer minicuerpos, los cuales comprenden un scFv unido a un dominio C_H3

20 (Hu y colaboradores; 1996). Otros ejemplos de los fragmentos de enlace son Fab', el cual difiere de los fragmentos Fab por la adición de unos cuantos residuos en el término carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas a partir de la región de articulación del anticuerpo, y Fab' -SH, el cual es un

25 fragmento Fab' en donde los residuos de cisteína de los dominios

constantes llevan un grupo tiol libre. También se han descrito moléculas de anticuerpos que contienen solamente dos CDRs enlazadas por una región de estructura (Qui y colaboradores, 2007). La CDR3 a partir del dominio V_H o V_L se enlazó al ciclo de CDR1 o CDR2 del otro dominio con el enlace a través del término C de la CDR1 o CDR2 seleccionada, con el término N de la CDR3, por medio de una región de estructura.

Un anticuerpo de dominio (dAb) es un pequeño fragmento de enlace de antígeno monomérico de un anticuerpo, es decir, la región variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo (Holt y colaboradores, 2003). Los dAbs V_H se presentan naturalmente en los camélidos (por ejemplo, camello, llama), y se pueden producir mediante la inmunización de un camélido con un antígeno objetivo, el aislamiento de las células-B específicas del antígeno, y la clonación directa de los genes del dAb a partir de las células-B individuales; sin embargo, los dAbs también se pueden producir en un cultivo celular. Un miembro enlazador de la presente invención puede ser un dAb que comprende un dominio V_H o V_L sustancialmente como se estipula en la presente, o un dominio V_H o V_L que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) sustancialmente como se estipulan en la presente.

Los fragmentos de anticuerpos de la invención se pueden obtener empezando a partir de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50, mediante métodos tales como digestión mediante enzimas, por ejemplo, pepsina o papaína y/o mediante la disociación de los

puentes de disulfuro mediante reducción química. De otra manera, los fragmentos de anticuerpos comprendidos en la presente invención se pueden obtener mediante las técnicas de recombinación genética bien conocidas por la persona experta en la materia, o de
5 otra manera mediante síntesis de péptidos, o mediante síntesis y expresión de ácidos nucleicos.

Los fragmentos funcionales de anticuerpos de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier fragmento funcional cuya vida media sea aumentada mediante una modificación química, en
10 especial mediante PEGilación, o mediante su incorporación en un liposoma, por ejemplo.

Los anticuerpos biespecíficos o bifuncionales forman una segunda generación de anticuerpos monoclonales, en donde se combinan dos regiones variables diferentes en la misma molécula
15 (Holliger y Bohlen, 1999). Por consiguiente, un anticuerpo biespecífico puede tener dos especificidades de enlace diferentes codificadas por las regiones variables y, por consiguiente, se enlazan a dos epítopos diferentes sobre los antígenos objetivo individuales o múltiples. Su uso se ha demostrado tanto en el campo
20 del diagnóstico como en el campo de la terapia, a partir de su capacidad para reclutar nuevas funciones efectoras o para dirigirse a varias moléculas sobre la superficie de las células tumorales. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden armar con mecanismos citotóxicos adicionales, tales como radioisótopos, toxinas
25 bacterianas, citoquinas inflamatorias, productos quimioterapéuticos,

o pro-fármacos. Cuando se van a utilizar anticuerpos biespecíficos, éstos pueden ser los anticuerpos biespecíficos convencionales, los cuales se pueden elaborar en una variedad de formas (Holliger y Winter, 1993). Los ejemplos de los anticuerpos biespecíficos incluyen aquéllos de la tecnología BiTE[®] (Micromet, Inc.), en donde se pueden utilizar los dominios de enlace de dos anticuerpos con diferente especificidad, y se pueden enlazar directamente por medio de péptidos flexibles cortos. Ésta combina dos anticuerpos sobre una sola cadena de polipéptido corta. Los diacuerpos y scFv se pueden construir sin una región Fc, utilizando solamente dominios variables, que reducen potencialmente los efectos de la reacción anti-idiotípica.

Los anticuerpos biespecíficos se pueden construir como la IgG entera, como cuadroma (fragmento de enlace de antígeno de especificidad doble (Fab) más Fcγ), como F(ab')₂ biespecífico, como Fab'PEG, como Fab heterodimérico, como diacuerpos, o como scFv biespecífico o heterodimérico (revisado en Kufer y colaboradores, 2004). Además, dos anticuerpos biespecíficos se pueden enlazar empleando los métodos de rutina conocidos en la técnica para formar anticuerpos tetravalentes. Los diacuerpos biespecíficos, opuestamente a los anticuerpos enteros biespecíficos, también pueden ser particularmente útiles debido a que se pueden construir y expresar fácilmente en *E.coli*.

El trabajo reciente sobre los anticuerpos multi-específicos ha conducido al desarrollo de mezclas de anticuerpos, en donde se producen de tres a cinco anticuerpos recombinantes monoclonales

humanos mediante una sola célula clonal. Los anticuerpos componentes comparten la misma región variable de cadena ligera de inmunoglobulina para asegurar que todos los sitios de enlace asociados con las especies de anticuerpos en la mezcla sean
5 funcionales., (Oligoclones^{MR}; Merus Biopharmaceuticals BV; Publicación Internacional Número WO 04/106375 A1). Los anticuerpos componentes pueden comprender diferentes formatos, tales como IgG entera o fragmentos Fab, o mezclas de tanto la inmunoglobulina de longitud completa como los fragmentos de los
10 anticuerpos. Los anticuerpos componentes se seleccionan por tener actividades biológicas superiores, tales como una mayor potencia en la neutralización del virus, una mejor neutralización y remoción de citoquinas y quimiocinas, una mejor aniquilación y prevención de escape de las células tumorales, y una mayor amplitud de la
15 protección viral.

Hay diferentes métodos disponibles en este campo para obtener anticuerpos contra el citomegalovirus humano (hCMV). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, en especial de origen humano, los cuales se pueden obtener de acuerdo con los
20 métodos convencionales bien conocidos por la persona experta en la materia. En general, para la preparación de los anticuerpos monoclonales o de sus fragmentos funcionales, en especial de origen de murino, es posible referirse a las técnicas que se describen en particular en el manual 'Antibodies' (Harlow y Lane, 1988), o a la
25 técnica de preparación a partir de hibridomas, como es descrito por

Kohler y Milstein, 1975.

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener, por ejemplo, a partir de las células-B de un animal o humano inmunizado contra el citomegalovirus humano (hCMV), o uno de sus fragmentos, por ejemplo, gB, que contenga el epítipo reconocido por estos anticuerpos monoclonales. Los fragmentos y péptidos o polipéptidos adecuados que los comprenden se describen en la presente, y se pueden utilizar para inmunizar a los animales para generar anticuerpos contra el citomegalovirus humano (hCMV). El citomegalovirus humano (hCMV), o uno de sus fragmentos, se puede producir de acuerdo con los métodos de procesamiento usuales, mediante recombinación genética, empezando con una secuencia de ácido nucleico contenida en la secuencia de ADNc que codifique para el citomegalovirus humano (hCMV) o el fragmento del mismo, y/o mediante síntesis de péptidos, empezando a partir de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia peptídica del citomegalovirus humano (hCMV) y/o el fragmento del mismo.

Los anticuerpos monoclonales, por ejemplo, se pueden purificar en una columna de afinidad sobre la cual se haya inmovilizado previamente la proteína del citomegalovirus humano (hCMV) o una de sus proteínas componentes que contenga el epítipo reconocido por estos anticuerpos monoclonales. De una manera más particular, los anticuerpos monoclonales se pueden purificar mediante cromatografía sobre proteína A y/o G, seguida o no seguida por cromatografía de intercambio de iones con el objetivo

de eliminar los contaminantes de proteína residuales, así como el ADN y el LPS, por sí mismos, seguida o no seguida por cromatografía de exclusión sobre gel Sepharose, con el objeto de eliminar los aglomerados potenciales debidos a la presencia de dímeros o de otros multímeros. Se puede emplear cualquiera de estas técnicas de una manera simultánea o sucesivamente.

Sitio de enlace de antígeno

Esto describe la parte de una molécula que se enlaza a, y es complementaria para, todo o parte del antígeno objetivo. En una molécula de anticuerpo, ésta es referida como el sitio de enlace de antígeno del anticuerpo, y comprende la parte del anticuerpo que se enlaza a, y es complementaria para, todo o parte del antígeno objetivo. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo solamente se puede enlazar a una parte particular del antígeno, cuya parte se denomina como un epítipo. Un sitio de enlace de antígeno del anticuerpo puede ser proporcionado por uno o más dominios variables de anticuerpo. Un sitio de enlace de antígeno del anticuerpo puede comprender una región variable de cadena ligera del anticuerpo (V_L), y una región variable de cadena pesada del anticuerpo (V_H).

Un sitio de enlace de antígeno se puede diseñar en una región de una molécula de anticuerpo separada de la localización natural de las regiones determinantes de complementariedad, por ejemplo, en una región de estructura de un dominio V_H o V_L , o en un dominio constante de anticuerpo, por ejemplo, pero no limitándose a, CH1 y/o

C_H3. Un sitio de enlace de antígeno diseñado en una región estructural puede ser adicional a, o en lugar de, un sitio de enlace de antígeno formado por los conjuntos de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de un dominio V_H y V_L. Cuando están
5 presentes múltiples sitios de enlace de antígeno en una molécula de anticuerpo, se pueden enlazar al mismo dominio antigénico sobre el citomegalovirus humano (hCMV), por ejemplo, aumentando de esta manera la valencia del miembro enlazador, e incrementando por lo mismo su avidéz. De una manera alternativa, se pueden enlazar
10 múltiples sitios de enlace de antígeno a diferentes antígenos sobre el citomegalovirus humano (hCMV) y/o uno o más antígenos diferentes, y esto se puede utilizar para agregar funciones efectoras, prolongar la vida media, o mejorar el suministro *in vivo* de la molécula de anticuerpo.

15 **Aislados**

Esto se refiere al estado en donde los miembros enlazadores de la invención, o el ácido nucleico que codifica tales miembros enlazadores, estarán generalmente de acuerdo con la presente invención. Por consiguiente, los miembros enlazadores, los dominios
20 V_H y/o V_L, y las moléculas de ácidos nucleicos codificantes y los vectores de acuerdo con la presente invención, se pueden proporcionar aislados y/o purificados, por ejemplo, a partir de su medio ambiente natural, en una forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso del ácido nucleico, libre o sustancialmente
25 libre del ácido nucleico o de los genes de origen diferente de la

secuencia que codifique un polipéptido con la función requerida. Los miembros aislados y el ácido nucleico aislado estarán libres o sustancialmente libres del material con el que estén asociados naturalmente, tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentren en su medio ambiente natural, o en el medio ambiente en donde se preparen (por ejemplo, cultivo celular), cuando esta preparación sea mediante la tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los miembros y el ácido nucleico se pueden formular con diluyentes o adyuvantes, y todavía, para propósitos prácticos, se pueden aislar -, por ejemplo, los miembros normalmente se mezclarán con gelatina o con otros vehículos si se utilizan para recubrir las placas de microtitulación para utilizarse en los inmunoensayos, o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se utilicen en diagnóstico o terapia. Los miembros enlazadores se pueden glicosilar, ya sea naturalmente o bien mediante los sistemas de células eucarióticas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NS0), o pueden no ser glicosilados, si, por ejemplo, son producidos mediante la expresión en una célula procariótica.

Las preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas de anticuerpos anti-hCMV también forman parte de la invención. Por ejemplo, estas preparaciones pueden ser las mezclas de anticuerpos con cadenas pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carezcan de la lisina C-terminal, con diferentes grados de glicosilación y/o con aminoácidos derivados, tal como la ciclación de

un ácido glutámico N-terminal para formar un residuo de ácido piroglutámico.

Como se utiliza en la presente, la frase 'sustancialmente como se estipula' se refiere a que las características de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) relevantes del dominio V_H o V_L de los miembros enlazadores descritos en la presente, serán ya sea idénticas o bien altamente similares a las regiones especificadas de las que se estipula la secuencia en la presente. Como se describe en la presente, la frase 'altamente similar' con respecto a las regiones especificadas de uno o más dominios variables, se contempla que se pueden hacer de 1 a aproximadamente 5, por ejemplo, de 1 a 4, incluyendo de 1 a 3, o 1, 2, 3 ó 4, sustituciones de aminoácidos en la región determinante de complementariedad (CDR) y/o en el dominio V_H o V_L .

15 **Breve Descripción de las Figuras**

Figura 1. Esta Figura muestra un panorama esquemático de la proteína gB (cepa AD169; SEQ ID No: 239), que indica la localización de los dominios antigénicos conocidos AD-1, AD-2 y AD-3 (Ohlin y colaboradores, 1993; Wagner y colaboradores, 1992). Hay un sitio de disociación en el aminoácido 460 y un enlace de disulfuro que enlaza las dos fracciones entre sí, como se indica mediante los paréntesis. Señal: secuencia de señal (aminoácidos 1-22), TM: dominio transmembrana (aminoácidos 751-771).

Figura 2. Esta Figura muestra el enriquecimiento de células-B de memoria específicas de gB mediante selección de células

activada por fluorescencia de preparación (FACS). Con el objeto de
aislar las células-B de memoria positivas para IgG específicas de gB,
las células-B enriquecidas en MACS anti-CD20 (MACS = selección
de células activada magnéticamente) se tiñeron con los siguientes
5 anticuerpos: a. CD19 anti-humano (marcador de células-B); b. CD27
anti-humano (marcador de células-B de memoria); c. IgG anti-
humano. Adicionalmente, las células-B se incubaron con una
glicoproteína B recombinante marcada con un tinte fluorescente. Las
células-B reactivas con CD19+/CD27+/IgG+/gB+ se seleccionaron
10 sobre células alimentadoras irradiadas, y se establecieron las líneas
celulares productoras de anticuerpos, como se describe en el
Ejemplo 1.

Figura 3. Arquitectura del dominio de gB del citomegalovirus
humano (hCMV). Las regiones que representan los dominios
15 individuales se exhiben en diferentes sombras, y se dan los números
de los residuos de partida. Los paréntesis indican los enlaces de
disulfuro. Señal: secuencia de señal, TM: dominio transmembrana.

Figuras 4a y 4b. ELISA de competición entre los anticuerpos
anti-hCMV y el Ab-50. La Figura 4a muestra el Ab-50 en la
20 competición con los anticuerpos Ab-47, Ab-48, Ab-49 y C23
(anticuerpo de control específico de gB). Se observa la competición
para enlazarse a la proteína gB para Ab-50 contra Ab-47 y Ab-49,
pero no para Ab-48 (o el anticuerpo de control C23). La Figura 4b
muestra Ab-50 en la competición con los anticuerpos ITC52, ITC88,
25 89-104 y 89-109. No se observa competición por el enlace entre Ab-

50 y cualquiera de estos anticuerpos probados. La línea de rayas a través de la parte superior de las gráficas 4a y 4b indica el Ab-50 en una concentración de 0.5 nanogramos/pozo.

Figura 5. Titulaciones de anticuerpos en sueros humanos
5 contra gB y fragmentos de gB. Se analizaron ochenta sueros
aleatoriamente seleccionados a partir de los individuos seropositivos
para el citomegalovirus humano (hCMV) en un ELISA para
determinar la reactividad contra la gB recombinante y los dominios
antigénicos 1 (AD-1), 2 (AD-2), 4 (AD-4/Dom II), y 5 (AD-5/Dom I). La
10 línea horizontal representa el corte para los antígenos individuales.

Figura 6. Esta Figura muestra la correlación entre la
titulación de anticuerpos contra las diferentes regiones antigénicas
(como se mide mediante ELISA), y la titulación de neutralización del.
r: coeficiente de correlación de rangos de Spearman.

15 Figuras 7a y 7b. Especificidad y capacidad de neutralización
de los anticuerpos policlonales anti-AD-4 de afinidad purificada.

Figura 7a) Las placas ELISA se recubrieron con gB, AD-1, AD-
2 y AD-4, respectivamente, y se probaron con diferentes anticuerpos.
E3: fracción de IgG de afinidad purificada; Pre: reserva de suero
20 antes de la purificación de afinidad; Post: reserva de suero después
de la purificación de afinidad; C23: anticuerpo monoclonal específico
de AD-2 humano; 89-104: anticuerpo monoclonal específico anti-AD-
1; anti-GST: anticuerpo monoclonal de murino específico para GST.

Figura 7b) Ensayo de neutralización utilizando la reserva de
25 suero, el anticuerpo monoclonal humano C23, y la fracción de IgG

específica de AD-4 de afinidad purificada (E3).

Figura 8. Esta Figura muestra la secuencia de aminoácidos de AD-4 y proteínas mutantes. La secuencia de aminoácidos de AD-4, como se utiliza para la expresión en células de mamífero, se muestra en la pista superior. Los residuos que se intercambiaron a alanina se indican en las pistas A-Q. Las líneas de rayas indican la identidad con la secuencia de tipo silvestre.

Figuras 9a y 9b. Reconocimiento de AD-4 y las proteínas mutantes de AD-4 mediante los anticuerpos monoclonales humanos (Ab-28, Ab-11, Ab-14), y la IgG de afinidad purificada a partir de los donantes seropositivos para el citomegalovirus humano (hCMV).

Las placas ELISA se recubrieron con las proteínas de fusión AD-4 indicadas, y se utilizaron para analizar el enlace de los anticuerpos monoclonales humanos (Ab-28, Ab-11, Ab-14; Figura 9a) o la fracción de IgG de afinidad purificada (E3; Figura 9b). Se utilizó un anticuerpo anti-GST para controlar la eficiencia del recubrimiento de los antígenos.

Figura 10. Reconocimiento de los mutantes de AD-4 por parte de los sueros humanos. El panel de sueros (80 muestras) se probó en un ELISA contra las proteínas de fusión de GST que contenían AD-4 o los péptidos mutantes AD-4G (K378K379), AD-4H (Q380E381), AD-4E (E359D362), AD-4I (N383S385), y AD-4L (N405T406), respectivamente. Para cada suero, se calculó una proporción entre el valor OD más alto y más bajo, y se graficó como las veces de diferencia. La línea punteada representa la diferencia

ST
80

promedio de todas las muestras de suero.

Figura 11. Esta Figura muestra los resultados de un ELISA de captura que determina el reconocimiento por el anticuerpo de los dominios y subdominios antigénicos de la proteína gB. Las células 293T se transfectaron con Control (pcUL132SigHA), AD-4 + AD-5, Subdominio 1 de AD-5

(AD-5-S1) o Subdominio 2 de AD-5 (AD-5-S2). Se utilizaron los anticuerpos Ab-47 a Ab-50 para la detección. Los resultados se detectaron mediante inmunofluorescencia indirecta.

Figura 12. Ensayo de neutralización competitivo con el anticuerpo neutralizante Ab-28 y diferentes sueros humanos.

Los datos del lado izquierdo de la gráfica representan triplicados de diferentes sueros positivos para el citomegalovirus humano (hCMV) y sueros negativos para el citomegalovirus humano (hCMV) (sobre el eje-x) aplicados en una concentración constante alrededor de su actividad neutralizante del 50 por ciento. Las curvas sobre el lado derecho de la gráfica representan una combinación del Ab-28 titulado con los sueros positivos para hCMV o los sueros negativos para hCMV agregados en una concentración constante idéntica a la concentración representada por los datos del lado izquierdo del diagrama. Todas las curvas reflejan la concentración de IgG del Ab-28 solo sin agregar la concentración de IgG constante de los sueros. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Leyenda:

- concentración constante de suero negativo para hCMV;
- ▲ concentración constante de suero positivo para hCMV;

- concentración constante de Intratec®; ○ Ab-28 titulado con una concentración constante de suero negativo para hCMV; ▽ Ab-28 titulado con una concentración constante de suero positivo para hCMV; □ Ab-28 titulado con una concentración constante de Intratec; 5 ◇ Ab-28 titulado solo.

Figura 13. Ensayo posterior a la adsorción con Ab-02, Ab-04 y Ab-28.

El virus de citomegalovirus humano (hCMV) se dejó adsorber pero no penetrar en los fibroblastos de prepucio humano durante 1 10 hora a 4°C, y entonces se agregaron los anticuerpos Ab-02, Ab-04 o Ab-28, y se dejaron incubar durante un periodo de cualquiera de 30, 80 ó 120 minutos a 4°C. Se llevaron a cabo diluciones en serie a 1:2 a partir de 150 a 5 microgramos/mililitro para cada anticuerpo por triplicado. Se utilizó C23 (anticuerpo específico de AD-2) como un 15 anticuerpo de control para la inhibición de la penetración del virus en las células. El eje-x muestra la concentración de IgG (microgramos/mililitro), y el eje-y muestra el porcentaje de neutralización. Leyenda: ● periodo de incubación de 30 minutos; ■ periodo de incubación de 80 minutos; ▲ periodo de incubación de 120 minutos.

20 Figura 14. Ensayo de neutralización competitivo representativo entre los anticuerpos específicos de AD-1 y AD-2 y Ab-28.

Como se muestra en las Figuras 12a y 12b, ITC52 (un anticuerpo específico de AD-1) o ITC88 (un anticuerpo específico de AD-2) se titularon en ausencia (●) o en la presencia (■) de Ab-28, 25 respectivamente. El Ab-28 se agregó al anticuerpo titulado en una

concentración constante de 0.5 microgramos/mililitro (▲). La Figura 12c muestra el ITC52 titulado en ausencia (●) o en la presencia (■) del ITC88, el cual se agregó al anticuerpo titulado en una concentración constante de 3 microgramos/mililitro (▲). Todos los resultados representan el análisis por triplicado.

Figura 15. Ensayo de neutralización competitivo entre los anticuerpos específicos para AD-4 y AD-5.

Para este ensayo, se utilizaron un anticuerpo específico de AD-4 (Dom II) representativo (Ab-28), y dos anticuerpos específicos de AD-5 (Dom I) representativos (Ab-49 y Ab-50). El eje-x muestra la concentración de IgG (microgramos/mililitro), y el eje-y muestra el porcentaje de neutralización. Leyenda: ● anticuerpo AD-5 (Ab-49 o Ab-50) solo; ▲ anticuerpo AD-4 solo; ■ anticuerpos AD-5 y AD-4 mezclados. La concentración inicial de la mezcla fue de 3 microgramos/mililitro, debido a que se aplicaron 1.5 microgramos/mililitro de cada anticuerpo en el primer pozo.

Descripción Detallada de la Invención

Como se observa anteriormente, un miembro enlazador de acuerdo con la presente invención modula y puede neutralizar una actividad biológica del citomegalovirus humano (hCMV). A una alta potencia, el miembro enlazador se puede obtener directamente a partir de un rastreo inicial, por ejemplo, un ensayo biológico de neutralización del citomegalovirus humano (hCMV). Los ensayos y las potencias se describen con mayor detalle en cualquier otra parte de la presente.

La transformación del Virus de Epstein-Barr (EBV) es un método confiable para immortalizar las células de mamífero, y se han desarrollado numerosos protocolos de transformación de EBV (Rosen y colaboradores, 1977; Steinitz y colaboradores, 1977; Steinitz y colaboradores, 1980; Kozbor y Roder, 1981; Lundgren y colaboradores, 1983; Rosen y colaboradores, 1983; Steinitz y colaboradores, 1984; Lanzavecchia, 1985; Bernasconi y colaboradores, 2002; Jung y colaboradores, 2002; Traggiai y colaboradores, 2004). La técnica se utiliza con mayor frecuencia para obtener líneas celulares a partir de linfocitos humanos que sirven como una fuente permanente para el aislamiento del ADN y de la proteína, y han encontrado un uso ampliamente extendido en los estudios clínicos como el método principal para generar una fuente permanente de ADN del paciente para la genotipificación. EBV es un virus de Herpes, y su genoma consiste en un ADN lineal de doble cadena de 172 kb, el cual se ha secuenciado completamente. La biología molecular y la patogénesis del EBV se estudian extensamente, y se conocen las funciones de muchos genes de células huésped y EBV cruciales en la patogénesis. EBV infecta solamente a ciertas células epiteliales de mamífero y a los linfocitos-B. *In vitro*, EBV immortaliza las células-B mediante la activación de un número de genes reguladores del ciclo celular, así como de los genes específicos de células-B, incluyendo los genes de inmunoglobulina. Entonces se pueden seleccionar los clones en crecimiento que secreten los anticuerpos específicos para el análisis.

Entonces se pueden clonar los anticuerpos de interés, y se puede determinar su secuencia mediante los métodos convencionales.

Un dominio variable de anticuerpo V_H con la secuencia de aminoácidos del miembro enlazador seleccionado mencionado, se puede proporcionar en una forma aislada, así como un miembro enlazador que comprenda ese dominio V_H .

La capacidad para enlazarse al citomegalovirus humano (hCMV) se puede probar adicionalmente, y también la capacidad para competir con, por ejemplo, cualquier molécula de anticuerpo de Ab-01 a Ab-50 de la presente invención (por ejemplo, en el formato scFv y/o en el formato IgG, por ejemplo, IgG₁), para enlazarse al citomegalovirus humano (hCMV). La capacidad para neutralizar el citomegalovirus humano (hCMV) se puede probar como se discute adicionalmente en cualquier otra parte de la presente.

La afinidad de enlace y la potencia de neutralización de diferentes miembros enlazadores se puede comparar bajo las condiciones apropiadas.

Las variantes de los dominios V_H y V_L y las CDRs de la presente invención, incluyendo aquéllas para las cuales se estipulan las secuencias de aminoácidos en la presente, y las cuales se pueden emplear en los miembros enlazadores de la invención, se pueden obtener por medio de los métodos de alteración o mutación de secuencias y rastreo de los miembros enlazadores de antígeno con las características deseadas. Los ejemplos de las características deseadas incluyen, pero no se limitan a:

- Aumento de la afinidad de enlace por el antígeno en relación con los anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno.
- Aumento en la neutralización de la actividad de un antígeno en relación con los anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno, si se conoce la actividad.
- Capacidad competitiva especificada con un anticuerpo o ligando conocido para el antígeno en una proporción molar específica.
- Capacidad para inmunoprecipitar el complejo.
- Capacidad para enlazarse a un epítipo especificado, tal como un epítipo lineal, por ejemplo, utilizando péptidos rastreados en la conformación lineal y/o limitada, o el epítipo conformacional formado por residuos no continuos.
- Capacidad para modular una nueva actividad biológica del citomegalovirus humano (hCMV), o una molécula corriente abajo. Estos métodos también se proporcionan en la presente.

Un sitio de enlace de antígeno del anticuerpo compuesto de un dominio V_H y un dominio V_L típicamente está formado por seis ciclos de polipéptido: tres a partir del dominio variable de cadena ligera (V_L), y tres a partir del dominio variable de cadena pesada (V_H). El análisis de los anticuerpos de estructura atómica conocida ha elucidado las relaciones entre la secuencia y la estructura tridimensional de los sitios de combinación del anticuerpo. Estas relaciones implican que, excepto por la tercera región (ciclo en los

dominios V_H , los ciclos del sitio de enlace tienen una de un pequeño número de conformaciones de la cadena principal o estructuras canónicas. Se ha demostrado que la estructura canónica formada en un ciclo particular es determinada por su tamaño y por la presencia de ciertos residuos en los sitios clave, tanto en el ciclo como en las regiones de estructura (Chotia y colaboradores, 1992; Al-Lazikani y colaboradores, 1997).

Este estudio de relación de secuencia-estructura se puede utilizar para la predicción de los residuos en un anticuerpo de una secuencia conocida, pero de una estructura tridimensional desconocida, que son importantes en el mantenimiento de la estructura tridimensional de sus ciclos de CDR y, por consiguiente, para mantener la especificidad de enlace. En un planteamiento estructural, se puede crear un modelo de la molécula de anticuerpo (Chotia y colaboradores, 1986) utilizando cualquier paquete libremente disponible o comercial, tal como WAM (Whitelegg y Rees, 2000). Entonces se puede utilizar un paquete de software de visualización y análisis de proteínas, tal como Insight II (Accelrys, Inc.) o Deep View (Guex y Peitsch, 1997) para evaluar las posibles sustituciones en cada posición de la CDR. Esta información se puede utilizar entonces para hacer sustituciones que tengan la probabilidad de tener un efecto mínimo o benéfico sobre la actividad.

Las técnicas requeridas para hacer sustituciones dentro de las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), los dominios de anticuerpo V_H o V_L , y

los miembros enlazadores, están disponibles en términos generales en este campo. Las secuencias variantes se pueden hacer con sustituciones que pueden o no ser predichas para tener un efecto mínimo o benéfico sobre la actividad, y se pueden probar para determinar su capacidad para enlazarse y/o para neutralizar el citomegalovirus humano (hCMV) y/o para determinar cualquier otra propiedad deseada.

Las variantes de secuencia de aminoácidos de dominio variable de cualquiera de los dominios V_H y V_L cuyas secuencias se dan a conocer específicamente en la presente, se pueden emplear de acuerdo con la presente invención, como se discute.

Un aspecto adicional de la invención es una molécula de anticuerpo que comprende un dominio V_H que tiene cuando menos el 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 ó 99 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio V_H de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50 mostrados en el listado de secuencias adjunto, y/o que comprende un dominio V_L que tiene cuando menos el 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 ó 99 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio V_L de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50 mostrados en el listado de secuencias adjunto. Los algoritmos que se pueden utilizar para calcular el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos incluyen, por ejemplo, BLAST (Altschul y colaboradores, 1990), FASTA (Pearson y Lipman, 1988), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman, 1981), por ejemplo, empleando los parámetros por omisión. Las variantes

particulares pueden incluir una o más alteraciones de las secuencias de aminoácidos (adición, supresión, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido).

Se pueden hacer alteraciones en una o más regiones de estructura y/o en una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Las alteraciones normalmente no dan como resultado una pérdida de función, de modo que un miembro enlazador que comprenda una secuencia de aminoácidos alterada de esta manera, puede conservar la capacidad para enlazarse a, y/o para neutralizar, el citomegalovirus humano (hCMV). Puede conservar la misma capacidad de enlace cuantitativo y/o neutralizante que un miembro enlazador en el que no se haga la alteración, por ejemplo, como se mide en un ensayo descrito en la presente. El miembro enlazador que comprende una secuencia de aminoácidos alterada de esta manera, puede tener una mayor capacidad para enlazarse a, y/o para neutralizar, la infectividad del citomegalovirus humano (hCMV).

La alteración puede comprender el reemplazo de uno o más residuos de aminoácidos con un aminoácido que no se presente naturalmente o no estándar, la modificación de uno o más residuos de aminoácidos en una forma que no se presente naturalmente o no estándar, o la inserción de uno o más aminoácidos que no se presenten naturalmente o no estándares en la secuencia. Los ejemplos de los números y localizaciones de las alteraciones en las secuencias de la invención se describen en cualquier otra parte de la

presente. Los aminoácidos que se presentan naturalmente incluyen los 20 L-aminoácidos 'estándares' identificados como G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E por sus códigos convencionales de una sola letra. Los aminoácidos no estándares incluyen cualquier otro residuo que se pueda incorporar en una estructura base de polipéptido, o que pueda resultar a partir de la modificación de un residuo de aminoácido existente. Los aminoácidos no estándares se pueden presentar naturalmente o pueden no presentarse naturalmente. En la materia se conocen varios aminoácidos no estándares que se presentan naturalmente, tales como 4-hidroxi-prolina, 5-hidroxi-lisina, 3-metil-histidina, N-acetil-serina (Voet y Voet, 2004). Estos residuos de aminoácidos que se derivan en su posición N-alfa solamente se localizarán en el término N de una secuencia de aminoácidos. Normalmente en la presente invención, un aminoácido es un L-aminoácido, pero puede ser un D-aminoácido. La alteración, por consiguiente, puede comprender la modificación de un L-aminoácido en, o su reemplazo con, un D-aminoácido. También se conocen las formas de aminoácidos metiladas, acetiladas y/o fosforiladas, y los aminoácidos de la presente invención se pueden someter a esa modificación.

Las secuencias de aminoácidos en los dominios de anticuerpos y los miembros enlazadores de la invención, pueden comprender los aminoácidos no naturales o no estándares descritos anteriormente. Los aminoácidos no estándares (por ejemplo, los D-aminoácidos) se pueden incorporar en una secuencia de aminoácidos durante la

síntesis, o mediante la modificación o el reemplazo de los aminoácidos estándares 'originales' después de la síntesis de la secuencia de aminoácidos.

El uso de aminoácidos no estándares y/o que no se presentan naturalmente aumenta la diversidad estructural y funcional y, por consiguiente, puede incrementar el potencial para lograr las propiedades deseadas de enlace y neutralizantes del citomegalovirus humano (hCMV) en un miembro enlazador de la invención. Adicionalmente, se ha demostrado que los D-aminoácidos y sus análogos tienen diferentes perfiles farmacocinéticos, comparándose con los L-aminoácidos estándares, debido a la degradación de los polipéptidos *in vivo* que tienen los L-aminoácidos después de su administración a un animal, por ejemplo, a un ser humano, significando que los D-aminoácidos son convenientes para algunas aplicaciones *in vivo*.

Las regiones V_H o V_L novedosas, portadoras de las secuencias derivadas de CDR de la invención, se pueden generar utilizando mutagénesis aleatoria de uno o más genes V_H y/o V_L seleccionados para generar mutaciones dentro del dominio variable entero. Esta técnica es descrita por Gram y colaboradores (1992), quienes utilizaron la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) susceptible a error. En algunas modalidades, se hacen una o dos sustituciones de aminoácidos dentro de un dominio variable entero o en el conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Otro método que se puede utilizar es dirigir la mutagénesis hacia las

regiones CDR de los genes V_H o V_L (Barbas y colaboradores, 1994; Schier y colaboradores, 1996).

Todas las técnicas anteriormente descritas son conocidas como tales en este campo, y la persona experta podrá utilizar estas técnicas para proporcionar los miembros enlazadores de la invención utilizando la metodología de rutina en la materia.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para obtener un sitio de enlace de antígeno del anticuerpo para el citomegalovirus humano (hCMV), comprendiendo el método proporcionar, por medio de la adición, supresión, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H estipulado en la presente, un dominio V_H que sea una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio V_H , opcionalmente combinar el dominio V_H proporcionado de esta manera, con uno o más dominios V_L , y probar el dominio V_H o la combinación o combinaciones de V_H/V_L , para identificar un miembro enlazador o un sitio de enlace de antígeno del anticuerpo para el citomegalovirus humano (hCMV), y opcionalmente con una o más propiedades deseadas, por ejemplo, la capacidad para neutralizar la actividad del citomegalovirus humano (hCMV). El dominio V_L mencionado puede tener una secuencia de aminoácidos que sea sustancialmente como se estipula en la presente. Se puede emplear un método análogo, en donde se combinan una o más variantes de secuencia de un dominio V_L que se da a conocer en la presente, con uno o más dominios V_H . Como se observa anteriormente, una

secuencia de aminoácidos de la región determinante de complementariedad (CDR) sustancialmente como se estipula en la presente, puede ser llevada como una región determinante de complementariedad (CDR) en un dominio variable de anticuerpo humano o en una porción sustancial del mismo. Las secuencias de HCDR3 sustancialmente como se estipulan en la presente, representan modalidades de la presente invención, y cada una de las mismas puede ser llevada como una HCDR3 en un dominio variable de cadena pesada humano, o en una porción sustancial del mismo.

Los dominios variables empleados en la invención se pueden obtener o derivar a partir de cualquier dominio variable humano de la línea germinal o reconfigurado, o pueden ser un dominio variable sintético basado en las secuencias en consenso o reales de los dominios variables humanos conocidos. Un dominio variable se puede derivar a partir de un anticuerpo no humano. Una secuencia de una región determinante de complementariedad (CDR) de la invención (por ejemplo, CDR3) se puede introducir en un repertorio de dominios variables que carezcan de una región determinante de complementariedad (CDR) (por ejemplo, CDR3), utilizando la tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, Marks y colaboradores (1992) describen los métodos para producir repertorios de dominios variables de anticuerpos, en donde se utilizan cebadores en consenso dirigidos hacia, o adyacentes a, el extremo 5' del área del dominio variable, en conjunto con cebadores en consenso para la tercera región de estructura de los genes V_H

humanos, con el fin de proporcionar un repertorio de dominios variables V_H que carezcan de una CDR3. Marks y colaboradores, describen además la manera en que se puede combinar este repertorio con una CDR3 de un anticuerpo particular. Utilizando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención se pueden mezclar con los repertorios de los dominios V_H o V_L que carezcan de una CDR3, y los dominios V_H o V_L mezclados completos se pueden combinar con un dominio V_L o V_H cognado, para proporcionar los miembros enlazadores de la invención. El repertorio se puede exhibir entonces en un sistema huésped adecuado, tal como en un sistema de exhibición de fago, exhibición en levadura, exhibición bacteriana, exhibición en T7, exhibición viral, exhibición celular, exhibición en ribosoma, o exhibición covalente.

De una manera similar, una o más, o las tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs) se pueden injertar en un repertorio de dominios V_H o V_L , los cuales entonces se rastrean para determinar un miembro enlazador o miembros enlazadores para el citomegalovirus humano (hCMV).

Por ejemplo, se pueden emplear una o más de las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 ó conjunto de HCDRs de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50, y/o se pueden emplear una o más de las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 ó conjunto de LCDRs de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50. De una manera similar, se pueden emplear otros dominios V_H y V_L , conjuntos de regiones determinantes de complementariedad (CDRs), y conjuntos de HCDRs y/o conjuntos de LCDRs que se dan a conocer

en la presente.

Una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina puede comprender cuando menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones de estructura interventoras. La porción
5 también puede incluir cuando menos aproximadamente el 50 por ciento de cualquiera de, o de tanto la primera como la cuarta, regiones de estructura, en donde el 50 por ciento es el 50 por ciento C-terminal de la primera región de estructura, y el 50 por ciento N-terminal de la cuarta región de estructura. Los residuos adicionales
10 en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquéllos que normalmente no están asociados con las regiones de dominio variable que se presentan naturalmente. Por ejemplo, la construcción de los miembros enlazadores de la presente invención hecha mediante técnicas de
15 ADN recombinante, puede dar como resultado la introducción de los residuos N- o C-terminales codificados por los enlazadores introducidos con el objeto de facilitar la clonación u otros pasos de manipulación.

Otros pasos de manipulación incluyen la introducción de
20 enlazadores para unir los dominios variables de la invención con otras secuencias de proteínas, incluyendo las regiones constantes de anticuerpos, otros dominios variables o marcas detectables/funcionales, como se discute con mayor detalle en cualquier otra parte de la presente.

25 Aunque en algunos aspectos de la invención, los miembros

enlazadores comprenden un par de dominios V_H y V_L , los dominios de enlace individuales basados en cualquiera de las secuencias del dominio V_H o V_L , forman otros aspectos de la invención. Se sabe que los dominios de inmunoglobulina individuales, en especial los dominios V_H , son capaces de enlazarse a los antígenos objetivo de una manera específica. En el caso de cualquiera de los dominios de enlace individuales, estos dominios se pueden utilizar para rastrear los dominios complementarios capaces de formar un miembro enlazador de dos dominios capaz de enlazarse al citomegalovirus humano (hCMV). Esto se puede lograr mediante los métodos de rastreo de exhibición de fagos, utilizando el denominado como planteamiento de combinación doble jerárquica, como se da a conocer en la Publicación Internacional Número WO92/01047 (McCafferty y colaboradores), y en Marks y colaboradores, *ibid*.

Los miembros enlazadores de la presente invención pueden comprender además regiones constantes de anticuerpos o partes de las mismas, por ejemplo, las regiones constantes de anticuerpos humanos o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio V_L se puede unir en su extremo C-terminal a los dominios constantes de cadena ligera del anticuerpo, incluyendo las cadenas C_k o C_λ humanas. De una manera similar, un miembro enlazador basado en un dominio V_H se puede unir en su extremo C-terminal con toda o con una parte (por ejemplo, un dominio CH1) de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada a partir de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM, de cualquiera de las

subclases de isotipos, en particular IgG₁ e IgG₄. IgG₁ es conveniente debido a su función efectora y a su facilidad de elaboración. Cualquier variante sintética u otra variante de región constante que tenga estas propiedades y que estabilice las regiones variables, también puede ser útil en la presente invención.

Los miembros enlazadores de la invención también pueden comprender más de un par de dominios V_H y V_L, tal como un anticuerpo biespecífico o multiespecífico, el cual forma un aspecto adicional de la invención. En el caso de un anticuerpo biespecífico, el cual tiene dos pares de dominios V_H y V_L, uno de los pares de dominios V_H y V_L puede ser a partir de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50, como se describe en la presente invención. El segundo par de dominios V_H y V_L puede ser igual que el primer par, o puede ser diferente. Por ejemplo, el par de dominios V_H y V_L se puede seleccionar a partir de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50, ó a partir de un anticuerpo diferente. En una modalidad preferida, un primer par de dominios V_H y V_L se selecciona a partir de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50, y el segundo par de dominios V_H y V_L también se selecciona a partir de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50, pero es diferente del primer par de dominios, de tal manera que el anticuerpo biespecífico se enlaza al citomegalovirus humano (hCMV). Adicionalmente, un primer par de dominios V_H y V_L se selecciona a partir de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50, y el segundo par de dominios V_H y V_L se selecciona a partir de un anticuerpo diferente. Por consiguiente, el anticuerpo biespecífico se

puede enlazar al citomegalovirus humano (hCMV) y a un antígeno diferente o a un epítipo diferente sobre el citomegalovirus humano (hCMV). De preferencia, el anticuerpo biespecífico comprende un primer par de dominios V_H y V_L que se enlaza a AD-4 o AD-5 del citomegalovirus humano (hCMV) (es decir, un primer par de dominios V_H y V_L a partir de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50), y un segundo par de dominios V_H y V_L seleccionado a partir de los anticuerpos de enlace del citomegalovirus humano (hCMV) descritos en los siguientes documentos de patente: US5,043,281 (Mashuho y colaboradores), US5,750,106 (Ostberg), WO93/021952 A1 (Borrebaeck y colaboradores), WO08/084410 A2, WO10/007463 A1 y WO10/007533 A2 (Lanzavecchia y Macagno), WO08/071806 A1, WO09/003975 A1 y WO09/024445 A1 (Funaro y colaboradores), WO09/114560 A2 (Olsen), WO10/114105 A1 y WO10/114106 A1 (Takada y colaboradores).

Se pueden generar mezclas de anticuerpos, tales como las mezclas de los anticuerpos recombinantes monoclonales humanos conocidos en la materia como Oligoclomics^{MR} (Merus Biopharmaceutical BV; Publicación Internacional Número WO 04/106375) para utilizarse en la neutralización del citomegalovirus humano (hCMV). Estas mezclas pueden comprender miembros enlazadores derivados a partir de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50. La mezcla de anticuerpos también puede comprender miembros enlazadores a partir de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50 en combinación con un miembro enlazador para el

citomegalovirus humano (hCMV) que reconozca un dominio antigénico diferente sobre la proteína gB, tal como AD-1 o AD-2, o que reconozca gH, o que reconozca las proteínas gpUL130, gpUL131A, gp128 etc. del citomegalovirus humano (hCMV). Por

5 ejemplo, la mezcla de anticuerpos puede comprender un dominio V_L a partir de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50, y un dominio V_H seleccionado a partir de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50 y/o un dominio V_H seleccionado a partir de cualquiera de los anticuerpos de enlace del citomegalovirus humano (hCMV) descritos

10 en los siguientes documentos de patente: US5,043,281 (Mashuho y colaboradores), US5,750,106 (Ostberg), WO93/021952 A1 (Borrebaeck y colaboradores), WO08/084410 A2, WO10/007463 A1 y WO10/007533 A2 (Lanzavecchia y Macagno), WO08/071806 A1, WO09/003975 A1 y WO09/024445 A1 (Funaro y colaboradores),

15 WO09/114560 A2 (Olsen), WO10/114105 A1 y WO10/114106 A1 (Takada y colaboradores). En la alternativa, la mezcla de anticuerpos puede comprender un dominio V_L seleccionado a partir de cualquiera de los anticuerpos de enlace del citomegalovirus humano (hCMV) descritos en los siguientes documentos de patente: US5,043,281

20 (Mashuho y colaboradores), US5,750,106 (Ostberg), WO93/021952 A1 (Borrebaeck y colaboradores), WO08/084410 A2, WO10/007463 A1 y WO10/007533 A2 (Lanzavecchia y Macagno), WO08/071806 A1, WO09/003975 A1 y WO09/024445 A1 (Funaro y colaboradores), WO09/114560 A2 (Olsen), WO10/114105 A1 y WO10/114106 A1

25 (Takada y colaboradores), junto con un dominio V_H seleccionado a

partir de cualquiera de los anticuerpos de enlace del citomegalovirus humano (hCMV) descritos en la lista anteriormente mencionada, y/o un dominio V_H seleccionado a partir de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50.

5 Los miembros enlazadores de la presente invención también puede incluir anticuerpos o fragmentos que comprendan una región Fc modificada, en donde la región Fc modificada comprenda cuando menos una modificación de aminoácido en relación con una región Fc de tipo silvestre. La región Fc variante se puede diseñar, en relación
10 con una molécula comparable que comprenda la región Fc de tipo silvestre, para enlazarse a los receptores de Fc con una mayor o menor afinidad. La región Fc se refiere a los polipéptidos que se presentan naturalmente o sintéticos homólogos al dominio C-terminal de IgG que se produce después de la digestión de la IgG con
15 papaína. La Fc de IgG tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kD. Para los anticuerpos y/o fragmentos de la presente invención, se puede utilizar una región Fc entera, o solamente una porción que mejore la vida media.

La región Fc se puede mutar, si se desea, para inhibir su
20 capacidad para fijar el complemento, y se puede enlazar al receptor de Fc con una alta afinidad. En la presente invención, los anticuerpos o fragmentos pueden ser provistos con una región Fc modificada, en donde se modifica una región Fc que se presente naturalmente para aumentar la vida media del anticuerpo o
25 fragmento en un medio ambiente biológico, por ejemplo, la vida

media en suero, o una vida media medida mediante un ensayo *in vitro*. Los métodos para alterar la forma original de una región Fc de una IgG también se describen en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US6,998,253 (Presta y Snedecor). Las

5 funciones efectoras que se pueden alterar (por ejemplo, mejorar) haciendo modificaciones a la región Fc, ya sea mediante la modificación de los patrones de glicosilación, o bien mediante la modificación de la secuencia de aminoácidos de la región Fc, incluyen, pero no se limitan a: un aumento de la citotoxicidad celular

10 mediada por Fc, incluyendo un aumento de la citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos, y un aumento de la lisis mediada por el complemento (por ejemplo, de las células infectadas por el citomegalovirus humano (hCMV)), un aumento del enlace del anticuerpo a los receptores de Fc, células aniquiladoras naturales

15 (NK), macrófagos, monocitos, y/o células polimorfonucleares; un aumento de la maduración de las células dendríticas, y un aumento en el cebado de las células-T. Las modificaciones potenciales incluyen inserción, supresión o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos, incluyendo sustitución con alanina, una sustitución

20 conservadora, una sustitución no conservadora, o el reemplazo con un residuo de aminoácido correspondiente en la misma posición a partir de una subclase de IgG diferente (por ejemplo, reemplazando un residuo de IgG₁ con un residuo de IgG₂ correspondiente en esa posición).

25 En otras modalidades, una variante de polipéptido Fc de la

presente invención puede comprender una o más glicoformas diseñadas, es decir, una composición de carbohidrato que se une covalentemente a una molécula que comprende una región Fc. La región Fc de los anticuerpos de tipo IgG contiene un sitio de glicosilación N-enlazado conservado en el residuo Asn297 del dominio CH2. Se ha demostrado que la modificación del patrón de glicosilación de los oligosacáridos enlazados a este residuo puede aumentar las funciones efectoras mediadas por la región Fc en las interacciones con los receptores de Fc. Las glicoformas diseñadas pueden ser útiles para una variedad de propósitos, incluyendo, pero no limitándose a, mejorar o reducir la función efectora. Las glicoformas diseñadas se pueden generar mediante cualquier método conocido por un experto en este campo, por ejemplo, utilizando cepas de expresión diseñadas o variantes, mediante su co-expresión con una o más enzimas, por ejemplo, $\beta(1,4)$ -N-acetil-glucosaminil-transferasa III, mediante la expresión de una molécula que comprenda una región Fc en diferentes organismos o líneas celulares a partir de diferentes organismos, o mediante la modificación de los carbohidratos después de que se haya expresado la molécula que comprenda la región Fc.

Los métodos para generar las glicoformas diseñadas son conocidos en la materia, e incluyen, pero no se limitan a, aquéllos descritos en los documentos US6,602,684 (Umaña y colaboradores); US20030157108 (Presta y colaboradores); Umaña y colaboradores (1999); Davies y colaboradores (2001); Shields y colaboradores

10f
102

(2002); Shinkawa y colaboradores (2003); y en las patentes y solicitudes en relación con la tecnología Potelligent^{MR} (Biowa, Inc. Princeton, NJ, EUA), y con la tecnología de ingeniería de glicosilación GlycoMAb^{MR} (GLYCART Biotechnology AG, Schlieren, CH).

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención abarca un miembro enlazador del citomegalovirus humano (hCMV), como se describe en cualquier otra parte de la presente, en donde este miembro enlazador comprende una región Fc o una región equivalente que comprende cuando menos una región CH2 de IgG, que se ha modificado para aumentar una o más funciones efectoras. En una modalidad, el miembro enlazador se modifica para alterar el patrón de glicosilación de los oligosacáridos N-enlazados en Asn 297, de tal manera que se incrementa la actividad de una o más funciones efectoras. En otra modalidad, el miembro enlazador se modifica para alterar la secuencia de aminoácidos de la región Fc, de tal manera que se incrementa la actividad de una o más funciones efectoras. Los métodos para medir la actividad de la función efectora y determinar si se incrementa o no, son bien conocidos en la materia.

Los miembros enlazadores de la invención se pueden marcar con una marca detectable o funcional. Por consiguiente, un miembro enlazador o una molécula de anticuerpo puede estar presente en la forma de un inmunoconjugado, como para obtener una señal detectable y/o cuantificable. Un inmunoconjugado puede comprender

una molécula de anticuerpo de la invención, por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-50, conjugado con una marca detectable o funcional. Una marca puede ser cualquier molécula que produzca, o que pueda ser inducida para producir, una señal, incluyendo, pero no limitándose a, fluorocromos, radiomarcas, 5 enzimas, quimiluminiscedores o fotosensibilizadores. Por consiguiente, el enlace se puede detectar y/o medir mediante la detección de la fluorescencia o de la luminiscencia, de la radioactividad, de la actividad enzimática, o de la absorbencia de luz. 10

Las marcas adecuadas incluyen, a manera de ilustración y no de limitación, enzimas, tales como fosfatasa alcalina, deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato ('G6PDH'), alfa-D-galactosidasa, oxidasa de glucosa, glucosa-amilasa, anhidrasa 15 carbónica, acetil-colinesterasa, lisozima, deshidrogenasa de malato, y peroxidasas, por ejemplo, peroxidasa de radícula roja; tintes; marcas fluorescentes o fluorocromos, tales como fluoresceína y sus derivados, compuestos de rodamina y sus derivados, proteína fluorescente verde/amarilla (G/YFP), proteína fluorescente roja 20 (RFP), proteína fluorescente azul (BFP), dansilo, umbeliferona, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído, y fluorescamina; fluoróforos, tales como criptatos y quelatos de lantánidos, por ejemplo, Europio, etc. (Perkin Elmer and Cis Biointernational), marcas quimiluminiscentes o quimiluminiscedores, tales como 25 isoluminol, luminol, y los dioxetanos; marcas bio-luminiscentes, tales

como luciferasa y luciferina; sensibilizantes; coenzimas; sustratos de enzimas; radiomarcas, incluyendo, pero no limitándose a, bromo77, carbono14, cobalto57, flúor8, galio67, galio68, hidrógeno3 (tritio), indio111, indio113m, yodo123m, yodo125, yodo126, yodo131, yodo133, mercurio107, mercurio203, fósforo32, renio99m, renio101, renio105, rutenio95, rutenio97, rutenio103, rutenio105, escandio47, selenio75, azufre35, tecnecio99, tecnecio99m, telurio121m, telurio122m, telurio125m, tulio165, tulio167, tulio168, itrio199, y otras radiomarcas mencionadas en la presente; partículas, tales como partículas de látex o de carbono; solución de metal; cristalita; liposomas; células, etc., los cuales se pueden marcar adicionalmente con un tinte, un catalizador, u otro grupo detectable; moléculas, tales como biotina, digoxigenina o 5-bromo-desoxiuridina; fracciones de toxina, tales como, por ejemplo, una fracción de toxina seleccionada a partir de un grupo de exotoxina de *Pseudomonas* (PE o un fragmento o mutante citotóxico de la misma), toxina de Difteria o un fragmento o mutante citotóxico de la misma, una toxina de botulinio A, B, C, D, E o F, ricina o un fragmento citotóxico de la misma, por ejemplo, ricina A, abrina o un fragmento citotóxico de la misma, saporina o un fragmento citotóxico de la misma, toxina antiviral de grana o un fragmento citotóxico de la misma, y briodina 1 o un fragmento citotóxico de la misma.

Las enzimas y coenzimas adecuadas se dan a conocer en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US4,275,149 (Litman y colaboradores), y US4,318,980 (Boguslaski y

colaboradores), y los fluorescedores y quimiluminiscedores adecuados se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US4,275,149, las cuales se incorporan a la presente como referencia en su totalidad. Las marcas incluyen
5 además las fracciones químicas, tales como biotina, que se puede detectar por medio del enlace con una fracción detectable cognada específica, por ejemplo, avidina o estreptavidina marcada, o estreptavidina genéticamente diseñada, como estreptactina (IBA GmbH, Göttingen, DE). Las marcas detectables se pueden unir a los
10 anticuerpos de la invención utilizando la química convencional conocida en la materia.

Los inmunoconjugados o sus fragmentos funcionales se pueden preparar mediante los métodos conocidos por la persona experta en este campo. Se pueden acoplar a las enzimas o a las marcas
15 fluorescentes directamente o por medio del intermediario de un grupo espaciador o de un grupo de enlace, tal como un poli-aldehído, como glutaraldehído, ácido etilen-diamina-tetra-acético (EDTA), ácido dietilen-triamina-penta-acético (DPTA), o en la presencia de agentes de acoplamiento, tales como aquéllos mencionados anteriormente
20 para los conjugados terapéutico. Los conjugados que contienen marcas de tipo de fluoresceína, se pueden preparar mediante la reacción con un isotiocianato.

Los métodos conocidos por la persona experta en la materia que existen para el acoplamiento de los radioisótopos terapéuticos a
25 los anticuerpos, ya sea directamente o por medio de un agente

quelante, tal como EDTA, DTPA, mencionados anteriormente, se pueden utilizar para los radio-elementos, los cuales se pueden utilizar en el diagnóstico. De la misma manera, es posible llevar a cabo el marcado con sodio¹²⁵ mediante el método de cloramina T (Hunter y Greenwood, 1962), o de otra manera con tecnecio-99m (Tc-99m) mediante la técnica descrita en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US4,424,200 (Crockford y Rhodes), o se pueden unir por medio de DTPA, como se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US4,479,930 (Hnatowich), ambas de las cuales se incorporan a la presente como referencia en su totalidad.

Existen numerosos métodos mediante los cuales la marca puede producir una señal detectable por medios externos, por ejemplo, mediante examinación visual, radiación electromagnética, calor, y reactivos químicos. La marca también se puede enlazar a otro miembro enlazador que se enlace al miembro enlazador de la invención, o a un soporte.

La marca puede producir directamente una señal, y por consiguiente, no se requieren componentes adicionales para producir una señal. Numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo, fluorescentes, son capaces de absorber la luz ultravioleta y visible, en donde la absorción de luz transfiere energía a estas moléculas, y las eleva hasta un estado de energía excitada. Esta energía absorbida se disipa entonces mediante la emisión de luz a una segunda longitud de onda. Esta emisión a la segunda longitud de

onda también puede transferir energía a una molécula aceptora marcada, y la energía resultante se disipa desde la molécula aceptora mediante la emisión de luz, por ejemplo, mediante transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). Otras
5 marcas que producen directamente una señal incluyen los isótopos radioactivos y los tintes.

Alternativamente, la marca puede necesitar otros componentes para producir una señal, y la señal en el sistema de producción entonces incluiría todos los componentes requeridos para producir
10 una señal medible, la cual puede incluir sustratos, enzimas adicionales, coenzimas, potenciadores y sustancias que reaccionen con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, eliminadores, iones metálicos, y una sustancia de enlace específica necesaria para el enlace de las sustancias que generan
15 señales. Una discusión detallada de los sistemas productores de señales adecuados se puede encontrar en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US5,185,243 (Ullman y colaboradores). La presente invención proporciona un método que comprende causar o permitir el enlace de un miembro enlazador de
20 acuerdo con lo dispuesto en el presente documento, específico para el citomegalovirus humano (hCMV). Como se observa, este enlace puede tomar lugar *in vivo*, por ejemplo, después de la administración de un miembro enlazador, o de un ácido nucleico que codifique un miembro enlazador, o puede tomar lugar *in vitro*, por ejemplo, en
25 ELISA, Western blot, cromatografía de afinidad, inmunocitoquímica,

inmunoprecipitación, neutralización y ensayos bioquímicos o basados en células.

La presente invención también proporciona métodos para medir los niveles de antígeno directamente, mediante el empleo de un miembro enlazador de acuerdo con la invención, por ejemplo, en un sistema biosensor. Por ejemplo, la presente invención comprende un método de detección y/o de medición del enlace al citomegalovirus humano (hCMV), el cual comprende: (i) exponer el miembro enlazador al citomegalovirus humano (hCMV), y (ii) detectar el enlace de dicho miembro enlazador al citomegalovirus humano (hCMV), en donde se detecta el enlace utilizando cualquier método o marca detectable descritos en este documento. Este y cualquier otro método de detección de enlace descrito, puede ser interpretado directamente por la persona que lleve a cabo el método, por ejemplo, observando visualmente una marca detectable. Alternativamente, este método, o cualquier otro método de detección de enlace descrito, puede producir un reporte en la forma de una autoradiografía, una fotografía, una impresión de computadora, un reporte de la citometría de flujo, un gráfico, un diagrama, un tubo de ensayo, o un recipiente o pozo que contenga el resultado, o cualquier otra representación visual o física de un resultado del método.

Se puede determinar la cantidad de enlace de un miembro enlazador al citomegalovirus humano (hCMV). La cuantificación se puede relacionar con la cantidad de antígeno en una muestra de

prueba, que puede ser de interés en el diagnóstico. La detección del enlace del citomegalovirus humano (hCMV), o la cuantificación del mismo, puede ser útil, por ejemplo, en los pacientes con las enfermedades o los trastornos mencionados en este documento, o con cualquier otra enfermedad o trastorno que involucre la expresión y/o la actividad aberrante del citomegalovirus humano (hCMV).

Un método de diagnóstico de la invención puede comprender: (i) la obtención de un tejido o muestra de líquido de un sujeto, (ii) exponer dicho tejido o la muestra de líquido a uno o más miembros enlazadores de la presente invención; y (iii) la detección del citomegalovirus humano (hCMV) enlazado en comparación con una muestra de control, en donde un aumento en la cantidad de enlace del citomegalovirus humano (hCMV) en comparación con el control, puede indicar la expresión y/o actividad del citomegalovirus humano (hCMV). Las muestras de tejido o líquido que se van a probar incluyen sangre, suero, saliva, orina, esputo, un material de biopsia o cualquier tejido que se sospeche que contiene el citomegalovirus humano (hCMV). Los sujetos que se prueben como positivos para el citomegalovirus humano (hCMV) también pueden beneficiarse de los métodos de tratamiento divulgados posteriormente en este documento. Aquéllos especializados en la técnica son capaces de elegir un modo adecuado de determinación del enlace de los miembros enlazadores a un antígeno según sus preferencias y conocimientos generales, teniendo en cuenta los métodos que se dan a conocer en la presente.

La reactividad de los miembros enlazadores en una muestra puede determinarse por cualquier medio adecuado. Se puede usar un ensayo de enlace competitivo con antígeno radiactivo, por ejemplo, una marca de isótopo, tal como ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S , o con un antígeno no radiactivo, utilizando el antígeno o un análogo enlazado a una molécula reportera. La molécula reportera puede ser un tinte fluorocromo, fósforo o láser con características de absorción o emisión espectralmente aisladas. Los fluorocromos adecuados incluyen quelatos con fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y Texas Red, y los lantánidos o criptatos. Los tintes cromogénicos adecuados incluyen diaminobenzidina.

Otros reporteros incluyen partículas coloidales macromoleculares o material particulado, tal como gotas de látex coloreadas, magnéticas o paramagnéticas, y agentes biológicamente o químicamente activos que puedan provocar directamente o indirectamente señales detectables para observarse visualmente, detectadas electrónicamente o registradas de otra manera. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalicen las reacciones que se desarrollen, o que cambien los colores o provoquen cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser molecularmente excitables, de tal manera que produzcan transiciones electrónicas entre los estados de energía en las emisiones o absorciones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas utilizadas conjuntamente con biosensores. Pueden emplearse la avidina/biotina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina o

sistemas de detección de peroxidasa de rábano.

Las señales generadas por los conjugados individuales de miembro enlazador-reportero, se pueden utilizar para obtener datos relativos o absolutos cuantificables de los miembros enlazadores
5 pertinentes que se enlacen en las muestras (normales y de prueba).

También se suministra un kit que comprende: un miembro enlazador de acuerdo con cualquier aspecto o modalidad de la presente invención. En el kit, el miembro enlazador puede marcarse para permitir su reactividad en una muestra que se puede
10 determinar, por ejemplo, como se describe más adelante. Además, los miembros enlazadores pueden o no pueden fijarse a un soporte sólido. Los componentes de un kit son generalmente estériles y están en frascos sellados u otros recipientes. Los kits pueden ser empleados en el análisis de diagnóstico o en otros métodos para los
15 que sean útiles los miembros enlazadores. Un kit puede contener instrucciones de uso de los componentes de un método, por ejemplo, un método de acuerdo con la presente invención. Se pueden incluir materiales auxiliares para ayudar a, o permitir realizar, tal método, dentro de un kit de la invención. Los materiales auxiliares incluyen
20 un segundo miembro enlazador diferente, que se enlaza al primer miembro enlazador, y se conjuga con una marca detectable (por ejemplo, una marca fluorescente, isótopo radiactivo o enzima). Los kits basados en anticuerpos también pueden comprender gránulos para conducir la inmunoprecipitación. Cada componente de los kits
25 está generalmente en su propio contenedor. Por consiguiente, estos

kits incluyen generalmente distintos recipientes adecuados para cada miembro enlazador. Además, los kits podrán incluir instrucciones para realizar el análisis y los métodos de interpretación y análisis de los datos resultantes de la ejecución del ensayo.

5 La presente invención también proporciona el uso de un miembro enlazador como se menciona anteriormente, para medir los niveles de antígeno en un ensayo de competición, es decir un método para medir el nivel de antígeno en una muestra mediante el empleo de un miembro enlazador de acuerdo con lo dispuesto por la
10 presente invención, en un ensayo de competición. Esto puede ser en donde no se requiera la separación física del antígeno enlazado del no enlazado. Una posibilidad es el enlace de una molécula reportera a los miembros enlazadores para que se produzca un cambio físico u óptico sobre el enlace. La molécula reportera puede generar directa
15 o indirectamente las señales detectables, que pueden ser cuantificables. El enlace de las moléculas reporteras puede ser directa o indirectamente covalente, por ejemplo, a través de un enlace peptídico, o no covalente. El enlace a través de un enlace peptídico puede ser el resultado de la expresión recombinante de un
20 anticuerpo codificante de la fusión genética y la molécula reportera.

 En diversos aspectos y modalidades, la presente invención se extiende a un miembro enlazador que compite por el enlace al citomegalovirus humano (hCMV) con cualquier miembro enlazador definido en la presente, por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos
25 Ab-01 a Ab-50, por ejemplo, en formato de IgG. La competición entre

los miembros enlazadores se puede ensayar *in vitro*, por ejemplo, marcando una molécula reportera específica para un miembro enlazador que pueda ser detectado en la presencia de otros miembros enlazadores no marcados, para permitir la identificación de los miembros enlazadores que unan el mismo epítipo o un epítipo superpuesto. La competición puede determinarse mediante, por ejemplo, ELISA, o por resonancia de plasmón superficial, en donde el citomegalovirus humano (hCMV) es inmovilizado en una fase sólida, y se agrega un primer miembro enlazador no marcado o no etiquetado, junto con uno o más miembros enlazadores no marcados o no etiquetados diferentes que se añaden a la fase sólida. La presencia de un miembro enlazador no marcado que compite con el miembro enlazador marcado se observa por una disminución en la señal emitida por el miembro enlazador marcado.

Por ejemplo, la presente invención incluye un método para identificar un compuesto de enlace del citomegalovirus humano (hCMV), el cual comprende: (i) inmovilizar la proteína gB a un soporte, (ii) poner en contacto con dicha gB inmovilizada, simultáneamente o de manera escalonada, con cuando menos un miembro enlazador marcado o etiquetado de acuerdo con la invención, y uno o más compuestos enlazadores de prueba no marcados o no etiquetados, y (iii) identificar un nuevo compuesto enlazador del citomegalovirus humano (hCMV), observando una disminución en la cantidad de la marca enlazada a partir del miembro enlazador marcado. Estos métodos pueden llevarse a cabo de una

manera de alto rendimiento utilizando un formato de múltiples pozos o de matriz. Estos ensayos también pueden realizarse en solución. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US5,814,468 (Sliman y colaboradores), que se
5 incorpora a la presente como referencia en su totalidad. Como se describió anteriormente, la detección del enlace puede ser interpretada directamente por la persona que lleve a cabo el método, por ejemplo, observando visualmente una marca detectable, o una disminución en la presencia de la misma. Alternativamente, los
10 métodos de enlace de la invención pueden producir un reporte en la forma de una auto-radiografía, una fotografía, una impresión de computadora, un reporte de la citometría de flujo, o cualquier otra representación visual o física de un resultado del método.

También se pueden utilizar ensayos de competición en la
15 caracterización del epítipo. En una instancia, se puede utilizar la caracterización del epítipo para identificar el epítipo enlazado por un miembro enlazador del citomegalovirus humano (hCMV) que opcionalmente puede tener características de neutralización y/o modulación optimizadas. Este epítipo puede ser lineal o
20 conformacional. Un epítipo conformacional puede comprender cuando menos dos diferentes dominios del citomegalovirus humano (hCMV), en donde dichos dominios están colocados en proximidad uno con el otro, cuando se pliegan las proteínas del citomegalovirus humano (hCMV) en su estructura terciaria o cuaternaria para formar
25 un epítipo conformacional que sea reconocido por un inhibidor del

citomegalovirus humano (hCMV), como un miembro enlazador del citomegalovirus humano (hCMV), en esta memoria descriptiva. En las pruebas de competición se puede emplear un fragmento peptídico del antígeno, especialmente un péptido que incluya o que se componga de un epítipo de interés. Puede utilizarse un péptido con la secuencia del epítipo más uno o más de los aminoácidos en los extremos. Los miembros enlazadores de acuerdo con la presente invención pueden ser tales que su enlace con el antígeno sea inhibido por un péptido con, o que se incluya en, la secuencia indicada.

La presente invención proporciona además un ácido nucleico aislado que codifica un miembro enlazador de la presente invención. El ácido nucleico puede incluir ADN o ARN. En uno, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica para una región determinante de complementariedad (CDR) o un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDR), o el dominio V_H o el dominio V_L , o el sitio de enlace de antígeno del anticuerpo, o la molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG₁, de la invención, de acuerdo con lo definido anteriormente.

La presente invención también proporciona construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden cuando menos un polinucleótido como se menciona anteriormente.

La presente invención también proporciona una célula huésped recombinante que comprende una o más construcciones como se

indican anteriormente. Un ácido nucleico que codifica cualquier región determinante de complementariedad (CDR) o un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDR), o el dominio V_H o el dominio V_L , o el sitio de enlace de antígeno del anticuerpo, o la molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG₁, tal como se prevén, por sí mismos constituyen un aspecto de la presente invención, así como un método de producción del producto codificado, cuyo método comprenda la expresión a partir del ácido nucleico codificante. La expresión convenientemente podrá lograrse mediante el cultivo celular de dicho huésped recombinante que contenga el ácido nucleico, bajo las condiciones adecuadas. Después de la producción para la expresión de un miembro enlazador que comprende el dominio V_H o V_L como se da a conocer en la presente, el miembro enlazador puede ser aislado y purificado mediante cualquier técnica adecuada conocida en la materia y que se considere como apropiada.

El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede comprender ADN o ARN, y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos como se estipula en la presente, abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada, en donde se sustituye U por T, a menos que el contexto requiera lo contrario.

Un aspecto todavía adicional proporciona un método de producción de un miembro enlazador, el cual comprende el dominio

variable V_H o V_L de la presente invención, en donde este método incluye causar la expresión del ácido nucleico codificante. Este método puede comprender el cultivo de las células huésped recombinantes bajo condiciones para la producción del dominio

5 variable V_H o V_L de dicho anticuerpo.

Un método de producción puede comprender un paso de aislamiento y purificación del producto. Un método de producción puede comprender la formulación del producto en una composición, incluyendo cuando menos un componente adicional, como un

10 excipiente farmacéuticamente activo.

Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, células vegetales, hongos filamentosos, células de

15 levadura y de insectos, y plantas y animales transgénicos. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en las células procariotas está bien establecida en la materia. Para una revisión, véase, por ejemplo, Pluckthun (1991). Un huésped bacteriano común es *E. coli*.

20 La expresión en las células eucariotas en el cultivo también está disponible para aquellos especializados en la técnica como una opción para la producción de un miembro enlazador (Chadd y Chamow, 2001; Yersen y Krummen, 2002; Larrick y Thomas, 2001). Las líneas celulares de mamífero en la técnica para la expresión de

25 un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster

chino (CHO), células HeLa, células de riñón (BHK) de hámster bebé, células de melanoma del ratón NS0, células de mieloma de rata YB2/0, células de riñón de embrión humano (HEK), células de la retina embrionaria humana, y muchas otras.

5 Los vectores adecuados pueden ser elegidos o contruidos para que contengan las secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias mejoradoras, genes marcadores, y otras secuencias según corresponda. Pueden ser
10 vectores, plásmidos, fagémidos o vectores virales, por ejemplo, vectores retrovirales, como sea apropiado (Sambrook y Russell, 2001). Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de los ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación,
15 introducción de ADN en las células, y expresión genética, así como análisis de las proteínas, se describen detalladamente en Ausubel y colaboradores., (1999).

 Otro aspecto de la presente invención proporciona una célula huésped que contiene ácido nucleico como se da a conocer en la
20 presente. Dicha célula huésped puede mantenerse *in vitro*, y se puede propagar en un cultivo de tejido. Dicha célula huésped puede también mantenerse *in vivo*, por ejemplo, con el fin de producir miembros enlazadores en ascitis. *In vivo*, la presencia de la célula huésped puede permitir la expresión intracelular de los miembros
25 enlazadores de la presente invención como 'intracuerpos' o

anticuerpos intracelulares. Los intracuerpos se pueden utilizar para la terapia genética.

Un aspecto todavía adicional proporciona un método que comprende la introducción del ácido nucleico de la invención en una
5 célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transfección de fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas, y transducción utilizando retrovirus u otros virus, por ejemplo, vacuna o, para las
10 células de insectos, baculovirus o cualquier combinación de los mismos. La introducción de ácido nucleico en la célula huésped, en particular una célula eucariota, puede usar un sistema basado en virus o en plásmidos. El sistema de plásmido puede mantenerse episomalmente, o puede ser incorporado en el genoma de la célula
15 huésped o en un cromosoma artificial. La incorporación puede ser ya sea mediante integración aleatoria o específica de una o más copias en uno o múltiples *loci*. Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación, y transfección mediante bacteriófagos.

20 La introducción puede estar seguida por causar o permitir la expresión a partir de los ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante el cultivo de las células huésped bajo condiciones para la expresión de los miembros enlazadores. La purificación del producto expresado podrá lograrse mediante los métodos conocidos para un experto en
25 la materia.

El ácido nucleico de la invención puede integrarse en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula huésped. La integración puede ser promovida mediante la inclusión de secuencias que promuevan la recombinación con el genoma, de acuerdo con las técnicas convencionales.

La presente invención también proporciona un método que comprende utilizar una construcción como se indica anteriormente, en un sistema de expresión, con el objeto de expresar un miembro enlazador o polipéptido como se menciona anteriormente.

Existe evidencia de participación de la infección por el citomegalovirus humano (hCMV) en una variedad de trastornos, como se explica en cualquier otra parte de la presente. Los miembros enlazadores de la presente invención, por consiguiente, se pueden utilizar en un método de diagnóstico o en el tratamiento de un trastorno asociado con la infección por el citomegalovirus humano (hCMV). Dicho trastorno puede afectar a los pacientes inmunodeprimidos, tales como los receptores de aloinjertos y los individuos infectados por el VIH, y puede incluir, por ejemplo: fiebre, hepatitis, retinitis, neumonitis, mielosupresión, encefalopatía, poliradiculopatía, inmunosupresión, rechazo/enfermedad del injerto contra el huésped, o aterosclerosis. Un miembro enlazador de la presente invención también puede utilizarse para tratar la infección intrauterina en los neonatos. Con frecuencia, los neonatos nacen sin signos o síntomas de los trastornos mencionados anteriormente, pero sin tratamiento pueden desarrollar síntomas progresivos de

disfunción y deterioro del sistema nervioso central (CNS), por ejemplo, pero no limitándose a, la pérdida de la audición, la pérdida de la visión, o retraso mental.

De conformidad con lo anterior, la invención proporciona un
5 método para tratar un trastorno relacionado con la infección por el
citomegalovirus humano (hCMV), el cual comprende administrar a un
paciente que lo necesite, una cantidad efectiva de uno o más
miembros enlazadores de la presente invención solos o en un
régimen terapéutico combinado con otro medicamento apropiado
10 conocido en la materia o descrito en la presente.

La evidencia de participación de la infección por el
citomegalovirus humano (hCMV) en ciertos trastornos se resume en
otras partes de la presente. En adición, los datos presentados en
este documento indican además que los miembros enlazadores de la
15 invención se pueden utilizar para tratar dichos trastornos, incluyendo
el tratamiento preventivo y la reducción de la gravedad de los
trastornos. De conformidad con lo anterior, la invención proporciona
un método para el tratamiento o la reducción de la gravedad de
cuando menos uno de los síntomas de los trastornos mencionados en
la presente, el cual comprende administrar a un paciente que lo
20 necesite, una cantidad efectiva de uno o más miembros enlazadores
de la presente invención solos o en un régimen terapéutico
combinado con otro medicamento apropiado conocido en la técnica o
descrito en la presente, de tal manera que se reduce la gravedad de
25 cuando menos uno de los síntomas de los trastornos anteriores.

121
122

Por consiguiente, los miembros enlazadores de la presente invención son útiles como agentes terapéuticos en el tratamiento de las enfermedades o los trastornos relacionados con la infección y/o la actividad del citomegalovirus humano (hCMV), especialmente resultantes de una alta carga viral en un paciente. Un método de tratamiento puede comprender administrar una cantidad efectiva de un miembro enlazador de la invención a un paciente que lo necesite, en donde se reduce la infección y/o actividad aberrante del citomegalovirus humano (hCMV). Un método de tratamiento puede comprender: (i) identificar un paciente que demuestre niveles o actividad de infección por el citomegalovirus humano (hCMV), por ejemplo, empleando los métodos de diagnóstico descritos anteriormente, y (ii) administrar una cantidad efectiva de un miembro enlazador de la invención al paciente, en donde se reduce la expresión o la actividad del citomegalovirus humano (hCMV). Una cantidad efectiva de acuerdo con la invención es una cantidad que disminuye la expresión o actividad del citomegalovirus humano (hCMV) con el fin de disminuir o mitigar la gravedad de cuando menos uno de los síntomas de la infección por el citomegalovirus humano (hCMV) o de la enfermedad o el trastorno particular que se vaya a tratar, pero no necesariamente cura la enfermedad o el trastorno.

La invención también proporciona un método para antagonizar cuando menos uno de los efectos de la infección por el citomegalovirus humano (hCMV), el cual comprende poner en

contacto con, o administrar, una cantidad efectiva de uno o más miembros enlazadores de la presente invención, de tal manera que se antagonice el cuando menos uno de los efectos de la infección por el citomegalovirus humano (hCMV). De conformidad con lo anterior, otros aspectos de la invención proporcionan métodos de tratamiento que comprenden la administración de un miembro enlazador previsto, composiciones farmacéuticas que comprenden dicho miembro enlazador, y el uso de este miembro enlazador en la elaboración de un medicamento para su administración, por ejemplo, en un método para la elaboración de un medicamento o de una composición farmacéutica que comprende formular el miembro enlazador con un excipiente farmacéuticamente activo. Un excipiente farmacéuticamente activo puede ser un compuesto o una combinación de compuestos introducidos en una composición farmacéutica, que no provoque reacciones secundarias y que permita, por ejemplo, la facilitación de la administración de los compuestos activos, un aumento en su tiempo de vida y/o en su eficacia en el cuerpo, un aumento de su solubilidad en la solución, o bien una mejora en su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y serán adaptados por la persona experta en la técnica como una función de la naturaleza y el modo de administración de los compuestos activos seleccionados.

Los miembros enlazadores de la presente invención normalmente serán administrados en la forma de una composición

farmacéutica, la cual puede comprender cuando menos un componente además del miembro enlazador. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para el uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente farmacéuticamente activo, portador, regulador del pH, estabilizador u otros materiales bien conocidos por aquéllos especializados en la materia. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del portador o de otro material dependerá de la vía de administración, la cual puede ser oral, inhalada, intra-traqueal, tópica, intra-vesicular o mediante inyección, como se explica a continuación.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en una forma de tableta, cápsula, polvo, líquido o semi-sólido. Una tableta puede comprender un vehículo sólido, tal como gelatina, o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden generalmente un vehículo líquido, tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral, o aceite sintético. Se pueden incluir solución salina fisiológica, dextrosa, o solución de sacárido o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para inyección intravenosa o inyección en el sitio de aflicción, el ingrediente activo estará en la forma de una solución acuosa aceptable para uso parenteral que esté libre de pirógenos y que tenga estabilidad, isotonicidad y pH adecuados. Los expertos en la

técnica pertinente serán capaces de preparar soluciones adecuadas, por ejemplo, utilizando vehículos isotónicos, tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactatada.

Se pueden emplear conservadores, estabilizantes, reguladores
5 del pH, antioxidantes y otros aditivos como sean necesarios, incluyendo reguladores del pH tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico y metionina; conservadores (tales como cloruro de octadecil-dimetil-bencil-amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio;
10 cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquil-parabenos, tales como metil- o propil-parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3'-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas tales como la albúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinil-
15 pirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparaginas, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, tales como glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como el EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sales, tales
20 como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteínas); o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN^{MR}, PLURONICS^{MR} o polietilenglicol (PEG).

Los miembros enlazadores de la presente invención pueden formularse en formas sólidas, líquidas o semi-sólidas, dependiendo
25 de las propiedades fisicoquímicas de la molécula y de la vía de

suministro. Las formulaciones pueden incluir excipientes o combinaciones de excipientes, por ejemplo: azúcares, aminoácidos, y agentes tensoactivos. Las formulaciones líquidas pueden incluir un amplio intervalo de concentraciones de anticuerpo y pH. Las formulaciones sólidas se pueden producir mediante liofilización, secado por aspersión, o secado mediante la tecnología de fluidos supercríticos, por ejemplo. Las formulaciones de los miembros enlazadores dependerán de la vía de suministro pretendida. Un miembro enlazador puede prepararse con un vehículo que protegerá al miembro enlazador contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biocompatibles y biodegradables, tales como etileno/acetato de vinilo, poli-anhídridos, poli-ácido glicólico, colágeno, poli-orto-ésteres y poli-ácido láctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones son conocidos por los expertos en la materia (Robinson, 1978).

El tratamiento puede darse por vía oral o mediante inyección (es decir, por vía subcutánea, intra-articular, intravenosa, intraperitoneal, intra-arterial o intramuscular), mediante inhalación, intra-traqueal, por la vía intravesicular (instilación en la vejiga urinaria), o tópica (por ejemplo, intraocular, pentavalente, rectal, en heridas, sobre la piel). El tratamiento se puede administrar mediante infusión de impulsos, particularmente con dosis decrecientes del miembro enlazador. La vía de administración puede determinarse por

126
127

las características fisicoquímicas del tratamiento, por consideraciones especiales para la enfermedad, o por el requerimiento de optimizar la eficacia o minimizar los efectos secundarios. Una vía de administración particular es intravenosa.

5 Otra vía de administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención es por vía subcutánea. Se prevé que no el tratamiento no será restringido a su uso en la clínica. Por consiguiente, también es conveniente la inyección subcutánea utilizando un dispositivo sin aguja.

10 Una composición se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultáneamente o en secuencia, dependiendo de la condición a tratar.

Un miembro enlazador de la invención puede utilizarse como parte de una terapia de combinación en conjunto con un componente medicinal adicional. Los tratamientos de combinación se pueden
15 utilizar para proporcionar efectos sinérgicos significativos, particularmente la combinación de un miembro enlazador de la invención con uno o más anticuerpos, tales como los anticuerpos Ab-01 a Ab-50, como se dan a conocer en la presente, o cualquiera de
20 los anticuerpos del citomegalovirus humano (hCMV) descritos en las siguientes publicaciones: US5, 043, 281 (Mashuho y colaboradores), US5, 750, 106 (Ostberg), WO93/021952 A1 (Borrebaeck y colaboradores), WO08/084410 A2WO10/007463 A1 y A2 de WO10/007533 (Lanzavecchia y Macagno), WO08/071806 A1,
25 WO09/003975 A1 y WO09/024445 A1 (Funaro y colaboradores),

128

WO09/114560 A2 (Olsen), WO10/114105 A1 y WO10/114106 A1 (Takada y colaboradores), o cualquier otro fármaco. Un miembro enlazador de la invención puede ser administrado simultáneamente o en secuencia, o como una preparación combinada con otro agente o
5 agentes terapéuticos, para el tratamiento de una o más de las condiciones enlistadas en la presente.

Un miembro enlazador de la invención puede utilizarse como un quimiosensibilizador, mediante el cual se puede aumentar la eficacia terapéutica de los agentes antivirales y, por lo tanto, se
10 puede proporcionar para su administración en combinación con uno o más agentes antivirales, simultáneamente o en secuencia.

Un miembro enlazador de acuerdo con la presente invención puede proporcionarse en combinación o en adición a uno o más de los siguientes agentes antivirales, por ejemplo, aciclovir, famciclovir, valganciclovir, ganciclovir, cidofovir, amantadina, rimantadina,
15 ribavirina, zanamavir u oseltamavir.

Se puede utilizar un miembro enlazador de la invención y uno o más de los componentes medicinales adicionales anteriores, en la elaboración de un medicamento. El medicamento puede ser para su
20 administración separada o combinada a un individuo y, de conformidad con lo anterior, puede comprender al miembro enlazador y al componente adicional como una preparación combinada o como preparaciones separadas. Las preparaciones separadas se pueden utilizar para facilitar la administración separada y en secuencia o
25 simultánea, y para permitir la administración de los componentes por

diferentes vías, por ejemplo, la administración oral y parenteral.

De acuerdo con la presente invención, la composiciones proporcionadas pueden administrarse a mamíferos. La administración normalmente se hace en una 'cantidad terapéuticamente efectiva',
5 siendo ésta suficiente para mostrar el beneficio para un paciente. Estos beneficios pueden ser cuando menos una mejoría de cuando menos uno de los síntomas. La cantidad real administrada y la tasa y el curso del tiempo de administración, dependerá de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando, del mamífero particular que
10 esté siendo tratado, de la condición clínica de cada paciente, de la causa del trastorno, del sitio de suministro de la composición, del tipo de miembro enlazador, del método de administración, de la programación de la administración, y de otros factores conocidos por los médicos practicantes. La prescripción del tratamiento, por
15 ejemplo, las decisiones sobre dosificación, etc., es responsabilidad de los médicos generales y de otros doctores médicos, y puede depender de la gravedad de los síntomas o del progreso de una enfermedad a tratar. Las dosis apropiadas de los anticuerpos son bien conocidas en la técnica (Ledermann y colaboradores., 1991;
20 Bagshawe y colaboradores., 1991). Se pueden utilizar las dosificaciones específicas indicadas en la presente o en Physician's Desk Reference (2009), como sean adecuadas para el tipo de medicamento que se esté administrando. Una cantidad terapéuticamente efectiva o una dosis adecuada de un miembro
25 enlazador de la invención se puede determinar comparando su

actividad *in vitro* y su actividad *in vivo* en un modelo animal. Los métodos para la extrapolación de las dosificaciones efectivas en ratones y en otros animales de prueba o en seres humanos son conocidos. La dosis exacta dependerá de varios factores, incluyendo

5 si el anticuerpo es para diagnóstico, prevención o tratamiento, del tamaño y ubicación de la zona a tratar, de la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo entero o fragmento), y de la naturaleza de cualquier marca detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis de anticuerpo típica estará en el intervalo de

10 100 microgramos a 1 gramo para aplicaciones sistémicas, y de 1 microgramo a 1 miligramo para aplicaciones tópicas. Se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguida por una o más dosis más bajas. Normalmente, el anticuerpo será un anticuerpo entero, por ejemplo, el isotipo de IgG₁. Ésta es una dosis para un

15 solo tratamiento de un paciente adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para niños, bebés y recién nacidos, y también se puede ajustar para otros formatos de anticuerpos en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, dos veces por semana, semanales o mensuales, a discreción

20 del médico. Los tratamientos pueden ser cada dos a cuatro semanas por vía subcutánea, y cada cuatro a ocho semanas para administración intravenosa. El tratamiento puede ser periódico, y el período entre administraciones es de aproximadamente dos semanas o más, por ejemplo, de aproximadamente tres semanas o más, de

25 aproximadamente cuatro semanas o más, o de aproximadamente una

vez al mes. El tratamiento puede darse antes y/o después de la cirugía de trasplante, y/o se puede administrar o aplicar directamente en el sitio anatómico del tratamiento quirúrgico.

Los miembros enlazadores del citomegalovirus humano (hCMV) de la invención pueden ofrecer ventajas en cuanto a los requerimientos de dosis y administración, en comparación con los anticuerpos para el citomegalovirus humano (hCMV) dados a conocer previamente en la materia, como se discutió anteriormente. Por ejemplo, si la dosis de un producto terapéutico anti-hCMV es más baja, puede haber ventajas significativas en que la dosis baja facilite las inyecciones subcutáneas, así como las inyecciones intravenosas. Es bien sabido por los entendidos en la materia, que la dosificación subcutánea puede estar limitada por la cantidad de miembros enlazadores, por ejemplo, la molécula de anticuerpo, requeridos por dosis. Esto es debido a que la inyección subcutánea está limitada por el volumen que puede ser inyectado en un sitio de la piel. Normalmente se utilizan volúmenes de inyección subcutánea de 1.2 mililitros o menos. Debido a que cada vez más difícil formular un miembro enlazador para inyección subcutánea en concentraciones superiores a 50 miligramos/mililitro, las dosis mayores de 100 miligramos por esta vía suelen requerir múltiples inyecciones y más molestias para el paciente. Por consiguiente, es conveniente una dosis más baja, por ejemplo, de un miembro enlazador de citomegalovirus humano (hCMV) más potente, debido a que amplía las vías de administración.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Clasificación FACS de las células-B de memoria específicas del citomegalovirus humano (hCMV) y la transformación

5 EBV de las células-B de memoria positivas para IgG

Después de que se obtuvo el consentimiento informado del donante, se recolectó sangre periférica (300 mililitros) a partir de los donantes sanos seropositivos para el citomegalovirus humano (hCMV), cuyo suero se había rastreado previamente para determinar las titulaciones altas de enlace de gB y la actividad neutralizante del citomegalovirus humano (hCMV) eficiente. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se purificaron mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll (Lymphoflot, Biotest, Dreieich, Alemania). Después del enriquecimiento de las células-B utilizando micro-gránulos de CD22 anti-humano (Mitenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), las células-B se marcaron con los siguientes reactivos: a. CD19-FITC anti-humano (Mitenyi Biotec, Alemania); b. CD27-PE anti-humano (BD Bioscience Pharmigen, Basilea, Suiza); c. IgG-bio anti-humano (Jackson Immuno-Research, West Grove, PA, EUA); d. estreptavidina, conjugado Alexa Fluor® 350 (Molecular Probes Inc, Eugene, OR, EUA), y e. glicoproteína B marcada con Cy5 (100 nanogramos por 1×10^6 células-B). Las células-B de memoria positivas para IgG, específicas de gB, se aislaron mediante la selección de las células que cumplieron con los siguientes cuatro criterios: FITC+/PE+/Alexa Fluor® 350+ y Cy5+

132
172

(Véase la Figura 2). De una manera alternativa, se marcaron las células B con los siguientes reactivos: a. CD19-PerCP anti-humano (Dianova, Hamburgo, Alemania); b. CD27-PE anti-humano (BD Bioscience Pharmigen, Basilea, Suiza); c. IgG-FITC anti-humano (Dianova, Hamburgo, Alemania); d. glicoproteína B marcada con Cy5 (100 nanogramos por 1×10^6 células-B). Estas células B de memoria específica de gB, positivas para IgG, se analizaron cada una utilizando FACSCalibur® (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania) o se aislaron mediante la clasificación que satisficiera los criterios PerCP+/PE+/FITC+ y Cy5+.

Las células se clasificaron en una concentración de 5 ó 10 células/pozo, en microplacas de fondo plano de 96 pozos que contenían una capa confluyente de células alimentadoras irradiadas (fibroblastos de prepucio humano, HFFs), utilizando un clasificador de células MoFlo^{MR} (Cytomation, Freiburg, Alemania). Las células clasificadas crecieron en un medio completo RPMI-1640 complementado con glutamina 2 mM, penicilina 100 IU/mililitro, estreptomicina 100 microgramos/mililitro, 2-mercapto-etanol 50 µM, y suero fetal de becerro al 10 por ciento (inactivado por calor) (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania) en la presencia de EBV que contenía el sobrenadante del cultivo celular (30 por ciento del sobrenadante de la línea celular B95-8 producida por EBV), y CpG ODN 2006 (2,5 microgramos/mililitro) como se describió anteriormente (Rosén y colaboradores, 1977; Steinitz y colaboradores, 1977; Bernasconi y colaboradores, 2002; Jung y colaboradores, 2002; Traggiai y

colaboradores, 2004). Después de tres semanas, se seleccionaron los sobrenadantes del cultivo a partir de las líneas celulares generadas para determinar la especificidad de gB utilizando el análisis de inmunoabsorción enlazado a enzimas (ELISA). En breve,

5 las placas ELISA (Nunc) se recubrieron con 0.5 microgramos/mililitro de glicoproteína B en regulador de carbonato, pH de 9.6, durante 16 horas a 4°C. Las placas recubiertas de gB se lavaron seis veces con suero regulado con fosfato (PBS) complementado con Tween al 0.05 por ciento (regulador de lavado de ELISA), y se bloquearon durante 2

10 horas con suero regulado con fosfato complementado con Tween al 0.05 por ciento y suero fetal de becerro al 2 por ciento (regulador de ELISA). Se incubaron 50 microlitros de sobrenadantes de cultivo por pozo durante 1 hora a temperatura ambiente y, después de otro paso de lavado, se reveló el enlace del anticuerpo utilizando anticuerpos

15 secundarios específicos del fragmento Fcγ acoplados con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, EUA). Después de un período de incubación de 1 hora, se removió el anticuerpo secundario no enlazado mediante el lavado, y se determinó la actividad enzimática utilizando 50 microlitros/pozo de o-fenil-diamina en una

20 concentración de 0.04 miligramos/mililitro en regulador de fosfato-citrato 0.05 M (pH de 5.0), H₂O₂ al 0.05 por ciento. Después de la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, la reacción se interrumpió mediante la adición de 50 microlitros/pozo de H₂SO₄ 2M, y se midió la densidad óptica (OD) a 492 nanómetros con un

25 fotómetro SPECTRAmax^{MR} 190 ELISA (Molecular Devices,

Sunnyvale, CA, EUA). Se utilizó el Software Softmax Pro 3.0 (Molecular Devices, EUA) para el análisis.

Ejemplo 2: Ensayo de neutralización *in vitro* del citomegalovirus humano (hCMV)

5 Se seleccionaron los sobrenadantes de cultivo específicos de gB para determinar la actividad neutralizante utilizando el citomegalovirus humano (hCMV) cepa AD169 recombinante (HB15-UL84prluc) que contenía un casete de expresión del gen reportero de luciferasa en el genoma del citomegalovirus humano (hCMV), y lo
10 cual da como resultado la expresión de la enzima de luciferasa después de la infección de las células objetivo (amablemente proporcionadas por el Prof. Dr. Thomas Stamminger, Institute of Clinical and Molecular Virology, University Hospital Erlangen, Alemania). La titulación infecciosa en los sobrenadantes virales se
15 determinó mediante ensayos de TCID₅₀ en células de fibroblastos primarios (cualquiera de HFF o células MRC-5) sobre placas de 96 pozos, como se describe en Mahy y Kangro (1996). Para el ensayo de neutralización basada en luciferasa, se incubaron volúmenes iguales del sobrenadante de cultivo específico de gB y sobrenadante
20 de AD169ΔLuc titulado (300pfu) a 37°C durante 1 hora en 96 microplacas de fondo en U. Se transfirieron las mezclas de anticuerpo-virus en monocapas de HFF previamente sembradas. Después de una incubación adicional a 37°C durante 4 horas, las mezclas de anticuerpo-virus mezclas se remplazaron completamente
25 del medio. Siguiendo la incubación durante otras 42 horas a 37°C,

las células se lisaron con 100 microlitros de regulador de lisis Glo (Promega, Madison, WI) por pozo. 30 microlitros de cada pozo lisado se puso dentro de una placa LIA de 96 pozos blanca (Greiner Bio-ona, Frickenhausen, Alemania). Por pozo, se agregaron 50
5 microlitros de regulador de ensayo (KH_2PO_4 15 mM, glicil-glicina 25mM, MgSO_4 1 M, EGTA 0.5 M, ATP 5 mM, DTT 1 mM). Se llevó a cabo la inyección de 50 microlitros por pozo de solución de D-luciferina (P.J.K. Kleinbittersdorf, Alemania) (en glicil-glicina 25 mM, MgSO_4 1 M, EGTA 0.5 M, DTT 2 mM, y D-Luciferina 0.05 mM), y la
10 detección de la quimiluminiscencia mediante un luminómetro Centro LB 960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania). Se utilizó el Software MicroWin2000 (Mikrotek Laborsysteme, Overath, Alemania) para el análisis. Las unidades de luz relativa (RLU) medidas mediante el luminómetro, se expresaron en porcentaje de
15 neutralización utilizando el siguiente cálculo:

%-neutralización = $100 \times (V_0 - V_n)/V_0$, en donde V_n representa las RLU en los pozos que contenían virus y anticuerpo, y V_0 representa las RLU en los pozos que contenían virus solo. El primer rastreo reveló nueve sobrenadantes de cultivo específicos de gB que
20 neutralizaron la ineffectividad del hCMV, y un segundo rastreo reveló tres sobrenadantes de cultivo específicos de gB adicionales que neutralizaron la ineffectividad del hCMV. Las nueve líneas de células-B de memoria inmortalizadas por EBV y los anticuerpos neutralizantes producidos por ellas, se denominaron como SM1,
25 SM3, SM4, SM5, SM6, SM7, SM9, SM10 y SM11 (véase la Tabla 1

más adelante). Las tres líneas celulares B inmortalizadas por EBV adicionales y los anticuerpos neutralizantes producidos por ellas, se denominaron como SM12, 2C2 y 1G2 (véase la Tabla 1 más adelante).

5 Una titulación de neutralizante del 50 por ciento (IC_{50}) se indica como la concentración de anticuerpo que da como resultado una reducción del 50 por ciento de la infección por el citomegalovirus humano (hCMV). De una manera similar, una titulación de neutralizante del 90 por ciento (IC_{90}) se indica como la concentración
10 de anticuerpo que da como resultado una reducción del 90 por ciento de la infección por el citomegalovirus humano (hCMV). Para calcular las actividades neutralizantes de los anticuerpos, se determinaron las concentraciones de IgG de los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Para este propósito, las placas ELISA se recubrieron con IgG
15 anti-humano, el anticuerpo que atrapa específicamente el fragmento Fc γ (Jackson ImmunoResearch, EUA). Las diluciones dobles en serie de los sobrenadantes de cultivo del anticuerpo SM en regulador de ELISA se compararon con el estándar de IgG policlonal de la concentración conocida (concentración de suministro de 11.1
20 miligramos/mililitro; Cat No: 009-000-003, Jackson ImmunoResearch, EUA). Las concentraciones de IgG de las muestras se calcularon utilizando el software de ELISA Softmax Pro 3.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Las actividades de neutralización en relación con la concentración de IgG de los sobrenadantes de cultivo de la
25 línea celular de EBV se muestran en la siguiente Tabla 1:

5

10

15

20

25

138
139

5

Línea EBV	Concentrado de IgG del sobrenadante (µg/ml)	No. de células granuladas	Actividad de neutralización del 50% (µg/ml)	Actividad de neutralización del 90% (µg/ml)
1G2	25.5	n.d.	0.1	0.4

10

15

Habiendo determinado las concentraciones de IgG de los sobrenadantes de la línea de EBV, se llevó a cabo un ensayo de neutralización adicional para seis de los sobrenadantes de la línea celular; estos sobrenadantes mostraron valores IC₅₀ de entre 0.5 y 2.3 microgramos/mililitro (Tabla 2; véase más adelante). El ensayo de neutralización se llevó a cabo como se describe en el párrafo anterior, con la modificación de que se prepararon las diluciones dobles en serie de los sobrenadantes de anticuerpo, por triplicado, antes de la adición del virus.

Tabla 2: Actividades neutralizantes del citomegalovirus humano (hCMV) de los anticuerpos específicos de gB producidos mediante las líneas de células-B de memoria inmortalizadas por EBV

20

25

Línea EBV	Actividad Neutralizante del 50% (µg/ml)
SM1	1.3
SM3	0.8
SM4	0.6

139
140

5

Línea EBV	Actividad Neutralizante del 50% (µg/ml)
SM5	0.6
SM6	0.5
SM11	2.3
ITC88*	1.5

10

Los resultados reflejan los valores promedio de los tres ensayos independientes. Las variaciones entre ensayos estuvo en el intervalo del 10 al 20 por ciento.

15

* Se utilizó ITC88 como un control positivo (Ohlin y colaboradores, 1993).

Las líneas de células-B de memoria inmortalizadas por EBV se granularon produciendo los anticuerpos neutralizantes y se congelaron a -80°C, hasta que se requirieron para el procesamiento adicional.

20

Ejemplo 3: Clonación de las regiones variables del anticuerpo a partir de las líneas celulares anti-hCMV de EBV

25

En los Ejemplos 3.1 a 3.4 las regiones variables de los anti-anticuerpos neutralizantes del citomegalovirus humano (hCMV) a partir de nueve líneas de células-B humanas transformadas por EBV (SM1, 3-7, 9-11) se amplificaron mediante reacción en cadena de la

140
141

polimerasa (PCR) semi anidada y se clonaron en vectores pCDNA3 (Invitrogen) que contienen la región constante de inmunoglobulina apropiada. Estas construcciones subsiguientemente se utilizaron para transfectar las células CHO y los anticuerpos expresados se probaron utilizando tecnología de arreglos de suspensión y la resonancia de plasmón superficial (Biacore®, GE Healthcare)- (Ejemplo 5), y se neutralizaron los ensayos (Ejemplo 4), para las primeras proyecciones. En los Ejemplos 3.5-3.7, las regiones variables de anti-anticuerpos neutralizantes del citomegalovirus humano (hCMV) a partir de cuatro líneas de células-B humanas transformadas por EBV (SM10, SM12, 2C2 y 1G2) se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada y se clonaron en vectores de expresión que contienen la región constante de inmunoglobulina apropiada de acuerdo con el método descrito en Tiller y colaboradores, 2008. Estas construcciones subsiguientemente se utilizaron para transfectar células HEK 293T y los anticuerpos expresados se probaron en ensayos de neutralización (Ejemplo 4) como parte de las proyecciones iniciales.

El término 'región variable' significa Genes reconfigurados VDJ para cadenas pesadas y genes reconfigurados VJ para cadenas ligeras.

3.1 La purificación de ARN y la síntesis de ADNc de la primera cadena

Los gránulos de células congeladas de SM1 de líneas de células-B de memoria transformada por EBV, 3-7 y 9-11 se

141
142

sometieron a total purificación de ARN con TRIZOL[®] reactivo (Invitrogen). Los gránulos celulares se sacaron del congelador a -80°C y se lisaron inmediatamente con TRIZOL[®]. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se le agregaron 0.2 mililitros de cloroformo (Roth, Alemania) por 1 mililitro de TRIZOL[®] y los tubos se mezclaron gentilmente durante 1 minuto. Se incubaron los lisados durante 3 minutos sobre hielo y se centrifugaron a 14000rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase superior acuosa se transfirió a un tubo fresco y se le agregaron 0.5 mililitros de isopropanol (Roth, Alemania) por 1 mililitro de TRIZOL[®]. Después de la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, los tubos se centrifugaron a 14000 revoluciones por minuto durante 10 minutos a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes y los gránulos de ARN se lavaron con 1 mililitro de etanol al por ciento (Roth, Alemania). Los gránulos se secaron al aire durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente, y se disolvieron mediante la adición de 30 a 50 microlitros de agua doblemente destilada libre de ARNsa (Fermentas Life Sciences), y mediante la incubación durante 10 minutos a 55°C. La concentración de ARN se midió mediante espectrofotometría UV y las muestras de ARN se almacenaron a -80°C. Se realizó la síntesis de ADNc de primera cadena utilizando un kit de síntesis de ADNc de primera cadena RevertAid^{MR} (Fermentas Life Sciences) siguiendo el manual de fabricación.

3.2 PCR semi-anidada

Las regiones codificantes variables de anticuerpos humanos

fueron amplificadas por PCR semi-anidada. La PCR semi-anidada se realizó mediante la ejecución de dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) sucesivas (los parámetros de PCR se muestran en la Tabla 3 a continuación), ambos con el mismo programa (TDNPCR1; Tabla 4a abajo), con diferentes cebadores 5' hacia adelante y la misma mezcla de cebadores 3' en reversa (Tabla 5 abajo; todos los iniciadores de segmento J juntos). Como una plantilla para la primera PCR se usó 1 microlitro de ADNc. Para la segunda PCR se usó 1 microlitro del producto de PCR de la primera PCR (sin diluir o diluida 1:10 - 1:100, según el rendimiento de ADN después de la primera PCR). El ADNc de todas las líneas de la EBV se amplificaron mediante combinaciones de todos los cebadores V_H , V_K y V_λ . Se utilizaron cinco diferentes cebadores hacia adelante en combinación con cinco cebadores en reversa para amplificar las regiones variables de cadena ligera kappa (Tabla 5a). Se utilizaron tres diferentes cebadores hacia adelante en combinación con 4 cebadores en reversa diferentes para amplificar las regiones variables de cadena ligera lambda (Tabla 5b). Se utilizaron seis cebadores hacia adelante diferentes en combinación con cuatro cebadores en reversa diferentes para amplificar las regiones variables de cadena pesada (Tabla 5c).

En todas las líneas de EBV se amplificaron más de una región variable de cadena pesada y ligera. Las regiones variables amplificadas se digirieron con HindIII/Eco47III (cadenas pesadas y cadenas ligeras kappa) o con HindIII/AvrII (cadenas ligeras lambda)

143
144

y se clonaron en pCDNA3 (Invitrogen) que ya contenía las regiones codificantes constantes correspondientes para γ 1, κ o λ humanas, tal como se describe en el Ejemplo 3.4.

Los productos resultantes de la PCR de longitud predichos fueron ligados finales contundentes en PCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) y tras el análisis de la secuencia, las regiones variables se subclonaron en pCDNA3 (Invitrogen) como se describe en Ejemplo 3.4. Sin embargo, para aumentar además el rendimiento de las regiones variables de cadena ligera de λ amplificado, se optimizaron las condiciones de PCR (FWUWPCR de programa de PCR, ver Tabla 4b a continuación).

Tabla 3: Parámetros de PCR

Volumen por reacción: 30 μ l	Concentración final
Polimerasa: mezcla enzimática de PCR de alta fidelidad 5u/ μ l, Fermentas No. Cat. K0192	0,75u/30 μ l (0,15 μ l)
Mezcla de dNTP 10 mM cada una	300 μ M (0,9 μ l)
MgCl ₂ 25 mM	2mM (2,4 μ l)
Cebador hacia adelante 5' 10pmol/ μ l	0,5 μ M (1,5 μ l)

144
145

5

Volumen por reacción: 30 µl	Concentración final
Mezcla de cebador en reversa 3' (Todos los cebadores del segmento J juntos)	J _H 1-6: 2µM, o Jgκ1-5: 1µM, o Jλ1-7: 0,5µM

Tabla 4: Programas de PCR

10

a) TDNPCR1

15

1. Desnaturalización inicial	95°C	2min	10 ciclos
2. Desnaturalización	95°C	20s	
3. Templado	60°C	30s	
4. Elongación	72°C	1min	
10 ciclos con disminución de temperatura de templado (-0,5°C cada ciclo)			
5. Desnaturalización	95°C	20s	10 ciclos
6. Templado	55°C	30s	
7. Elongación	72°C	1min	
10 ciclos con temperatura de templado de 55°C			

20

25

145
146

5

8. Desnaturalización	95°C	20s	15 ciclos
9. Templado	53°C	30s	
10. Elongación	72°C	1min	
15 ciclos con temperatura de templado de 53°C			
11. Elongación final	72°C	10min	
12. Enfriamiento	10°C	Sostener	

10

b) FWUWPCR

15

1. Desnaturalización inicial	94°C	5min	
2. Templado	55°C	40s	
3. Elongación	72°C	1min	
4. Desnaturalización	94°C	40s	30 ciclos
5. Templado	55°C	40s	
6. Elongación	72°C	1min	
7. Elongación final	72°C	3min	
8. Enfriamiento	10°C	Sostener	

20

25

25

2. Cebadores hacia adelante (5') de PCR			
Nombre	Número	Secuencia	SEQ ID
Vk1 5'- neu hacia adelante	077-Je	5' CTG AAG CTT CCA TGG ACA TGA GGG TCC CCG CTC AGC TCC 3'	No:203

147
148

5

10

15

2. Cebadores hacia adelante (5') de PCR			
Nombre	Número	Secuencia	SEQ ID
Vk2 5'- hacia adelante	078-Je	5' CTG AGG CTT CCA TGA GGC TCC CTG CTC AGC TCC TGG GGC TG 3'	No:204
Vk3 5'- hacia adelante	007-Je	5' CTG AAG CTT CCA TGG AAG CCC CAG CGC AGC TTC TCT TCC TC 3'	No:205
Vk4 5'- hacia adelante	152-Je	5' CTG AAG CTT CCA TGG TGT TGC AGA CCC AGG TCT TCA TTT CTC 3'	No:206
Vk5 5'- hacia adelante	153-Je	5' CTG AAG CTT CCA TGG GGT CCC AGG TTC ACC TCC TCA GCT TCC 3'	No:207

20

1.+ 2. Cebadores en reversa de PCR (3')			
Mezcla "Jk1-5": 66-Je + 67-Je + 68-Je + 69-Je + 70-Je			
Nombre	Número	Secuencia	SEQ ID

25

148
144

5

10

15

20

25

1.+ 2. Cebadores en reversa de PCR (3')			
Mezcla "Jk1-5": 66-Je + 67-Je + 68-Je + 69-Je + 70-Je			
Nombre	Número	Secuencia	SEQ ID
Jk1 HindIII/ Eco47III	066-Je	5' TAG AGC GCT TGA TTT CCA CCT TGG TCC CTT GG 3'	No:208
Jk2 HindIII/ Eco47III	067-Je	5' TAG AGC GCT TGA TCT CCA GCT TGG TCC CCT GG 3'	No:209
Jk3 HindIII/ Eco47III	068-Je	5' TAG AGC GCT TGA TAT CCA CTT TGG TCC CAG GG 3'	No:210
Jk4 HindIII/ Eco47III	069-Je	5' TAG AGC GCT TGA TCT CCA CCT TGG TCC CTC CG 3'	No:211
Jk5 HindIII/ Eco47III	070-Je	5' TAG AGC GCT TAA TCT CCA GTC GTG TCC CTT GG 3'	No:212

149
150

Tabla 5b: Cebadores para amplificar la región variable de
cadena lambda λ

5	Cebadores hacia adelante (5') de PCR			
	Nombre	Número	Secuencia	SEQ ID
10	Vλ1- corriente arriba	258-Je	5' CAG GAC TCA GGA CAA TCT CCA GC 3'	No:213
	Vλ2- corriente arriba	259-Je	5' YYY CSG GAC GTC YYC ACC 3'	No:214
15	Vλ3- corriente arriba	260-Je	5' ATC TGG GGG KCT YYC RCC 3'	No:215
20	Cebadores hacia adelante (5') de PCR			
	Nombre	Número	Secuencia	SEQ ID
25	Vλ1-líder	261-Je	5' GAT AAG CTT CCA TGG CCT GST CCC CTC TCC TCC TCA C 3'	No:216

150
151

5

Cebadores hacia adelante (5') de PCR			
Nombre	Número	Secuencia	SEQ ID
Vλ2-líder	262-Je	5' GAT AAG CTT CCA TGG CCT GGG CTC TGC TCC TCC TC 3'	No:217
Vλ3-líder	263-Je	5' GAT AAG CTT CCA TGG CCT GGA CCC CTC TCC TSC TC 3'	No:218

10

15

20

25

1. + 2. Cebadores en reversa (3') de PCR, Mezcla "Jλ1-7": 264-Je + 265-Je + 266-Je + 267-Je			
Nombre	Número	Secuencia	SEQ ID
Jλ1,2,3,6	264-Je	5' GAG CCT AGG ACG GTG ACC TTG GTC CC 3'	No:219
Jλ4	265-Je	5' GAG CCT AGG ATG ATC AGC TGG GTT CCT CC 3'	No:220
Jλ5	266-Je	5' GAG CCT AGG ACG GTC AGC TCG CTC CCC TC 3'	No:221
Jλ7	267-Je	5' GAG CCT AGG GCG GTC AGC TGG GTG CCT CC 3'	No:222

151-
152

Tabla 5c: Cebadores para amplificar la región variable de cadena pesada

5	1. Cebadores hacia adelante (5') de PCR			
	Nombre	Número	Secuencia	SEQ No
10	nes V _H 1	84-B	5' CCC TGA GAG CAC AGY TCC TCA CC 3'	No:223
	nes V _H 2	155-Je	5' AGT GAC TCC TGT GCM CCA CC 3'	No:224
15	nes V _H 3	85-B	5' GCA CTG AAC ACA GAG GCA TCA CC 3'	No:225
	nes V _H 4 v1	161-Je	5' CMT GGA YCT CMT GYR CRA GAA C 3'	No:226
20	nes V _H 5	162-Je	5' AGG GCT TCA TTT TCT GTC CTC CAC CAT C 3'	No:227
25	nes V _H 6	154-Je	5' GGG CAG TCA CCA GAG CTC CAG ACA 3'	No:228

152
153

5

10

15

20

25

2. Cebadores hacia adelante (5') de PCR			
Nombre	Número	Secuencia	SEQ ID
V _H 1 5' hacia adelante	001-Je	5' CTG AAG CTT CCA TGG ACT GGA CCT GGA GGA TCC TCT TCT TG 3'	No:229
V _H 2 5' neu hacia adelante	158-Je	5' CTG AAG CTT CCA TGG ACA CAC TTT GCT CCA CGC TCC TG 3'	No:230
V _H 3 5' hacia adelante	003-Je	5' CTG AAG CTT CCA TGG AGT TTG GGC TGA GCT GGG TTT TCC TTG 3'	No:231
V _H 4 5' neu hacia adelante	159-Je	5' CTG AAG CTT CCA TGA AAC ACC TGT GGT TCT TCC TCC TSC TGG 3'	No:232
V _H 5 5' hacia adelante	156-Je	5' CTG AAG CTT CCA TGG GGT CAA CCG CCA TCC TCG CCC TCC TCC 3'	No:233
V _H 6 5' hacia adelante	157-Je	5' CTG AAG CTT CCA TGT CTG TCT CCT TCC TCA TCT TCC TGC CCG 3'	No:234

153
154

5

10

15

1. + 2. Cebadores en reversa (3') de PCR, Mezcla "J _H 1-6": 62-Je + 63-Je + 65-Je + 64-Je			
Nombre	Número	Secuencia	SEQ ID
J _H 1,4,5 HindIII/ Eco47III	062-Je	5' TAG AGC GCT GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC CTG G 3'	No:235
J _H 2 HindIII/ Eco47III	063-Je	5' TAG AGC GCT GGA GAC AGT GAC CAG GGT GCC ACG 3'	No:236
J _H 3 HindIII/ Eco47III	065-Je	5' TAG AGC GCT AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC TTGG 3'	No:237
J _H 6 HindIII/ Eco47III	064-Je	5' TAG AGC GCT GGA GAC GGT GAC CGT GGT GCC TTT TT 3'	No:238

20

3.3 Vector de preparación de columna vertebral

25

Las regiones variables amplificadas se clonaron en un vector de pCDNA3 (Invitrogen) que contenía las regiones constantes de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina apropiado. Para la clonación de regiones variables de cadena pesada de construcción pd1612-Je (pCDNA3-EGFP-Cy) se digirió con HindIII/Eco47III.

(genera dos bandas de 6505bp y 727bp), se desfosforiló con CIP y el fragmento 6505bp se purificó con gel. Para la clonación de las regiones variables de cadena ligera lambda, la construcción pd1864-Je (Vλ2-AvrII(-) pCDNA3-2-4 se digirió con HindIII/AvrII (genera dos
5 bandas de 5858bp y 394bp), se desfosforiló con CIP y el fragmento 5858bp se purificó con gel. Para la clonación de las regiones variables de cadena ligera kappa, la construcción pd703-Je (pCDNA3-ITC88 Vκ) se digirió con HindIII/Eco47III (genera dos
10 bandas de 6050 bp y 392 bp), se desfosforiló con CIP y la banda de 6050 bp se purificó con gel.

3.4 Preparación de inserción

Los productos de PCR de las regiones variables de anticuerpo amplificado se purificaron con gel, se digirieron con HindIII/Eco47III
15 (regiones de variable de cadena pesada y cadena ligera kappa) o con HindIII/AvrII (regiones variables de cadena ligera lambda) y entonces, se ligaron al marco en un vector pCDNA3 que contiene la región constante de inmunoglobulina apropiada utilizando ligasa de T4 de ADN según lo recomendado por el fabricante de la enzima. La
20 ligadura de ADN se realizó durante la noche a 16°C. Como una excepción a este método, los productos de PCR de las regiones variables de anticuerpos Vλ1 de SM1 y SM4 Vλ1 Vλ2 SM9 primeramente se ligaron en los extremos romos en PCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) siguiendo el manual de usuario del kit de ligadura de
25 extremo romo (Invitrogen). Después de analizar las secuencias de

diversas mini-preparaciones, únicamente los clones que contienen secuencias V λ de buena fe se digirieron con HindIII/AvrII y las regiones variables fueron purificadas con gel y se sub-clonaron en el vector pCDNA3 adecuado (pd 1864-Je; ver más abajo). Se revistió 1
5 microlitro de cada ligadura electroporada en células DH10B (1900V/5 ms). Luego se revistieron 200 microlitros de las bacterias electroporadas en placas LB-agar + 100 microgramos/mililitro de ampicilina. De cada construcción, se recogieron aproximadamente 10
10 colonias, que crecieron durante la noche y se realizaron mini-preparaciones (cada colonia también se trató con placa de LB-agar + 100 microgramos/mililitro de ampicilina). Se realizó una digestión de control para identificar clones positivos con HindIII/Eco47III (H/E) para las construcciones con una cadena pesada o una cadena ligera kappa y con HindIII/AvrII (H/A) para las construcciones con la
15 cadena ligera lambda. Se analizaron los clones positivos en secuenciación de ADN con cebador 179-Je (secuencia: 5' AGA GAA CCC GCT TAC TG 3'; SEQ ID No: 196).

Como se mencionó anteriormente, una minoría de regiones variables se clonaron primero en una red troncal de vector de
20 pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen). Después del análisis de la secuencia, los clones positivos se sub-clonaron en vectores de pCDNA3 como se describió anteriormente. Para la preparación de inserto, se digirieron Pd1887-Je (V λ 1_J pCR4Blunt-TOPO-SM9L7 # 2) y pd1888-Je (pCR4Blunt-TOPO-SM1 V λ 1_JI7 # 4) con HindIII/AvrII. Las
25 regiones variables (394 bp) fueron purificadas con el gel y se ligaron

a pCDNA3. Se electroporó 1 microlitro de cada ligadura en células DH10B (1900V/5 ms). Se revistieron 250 microlitros de las bacterias electroporadas en placas de LB-agar + 100 microgramos/mililitro de ampicilina. Se recogieron cinco colonias de cada ligadura, se
5 realizaron mini-preparaciones y se digirió el ADN con HindIII/AvrII para identificar los clones positivos.

En la Tabla 6 a continuación, se presenta un compendio del número de regiones variables de cadena pesada (HC) de anticuerpos y regiones variables de cadena ligera (LC) clonadas a partir de
10 células humanas de B transformadas por EBV. Los anticuerpos neutralizantes 46 (última columna) son el resultado de diferentes combinaciones de 18 cadenas pesadas únicas y 18 cadenas ligeras lambda únicas. Ninguna de las combinaciones de cadenas pesadas con cadenas ligeras kappa resulta en los anticuerpos neutralizantes
15 del citomegalovirus humano (hCMV). Todas las cadenas pesadas (familia V_H1; 151 aminoácidos, incluyendo la secuencia líder) se derivan de un gen V-línea germinal: IFN-1. Todas las cadenas ligeras lambda (familia V_λ1; 128 aminoácidos, incluyendo la secuencia líder) se derivan de un gen V-línea germinal: IGV_λ1-51. Estas regiones
20 variables de los anticuerpos neutralizantes del citomegalovirus humano (hCMV) están marcadas en negrita en la Tabla 6. Las cadenas ligeras y pesadas, derivadas de otros genes V-línea germinal también se recuperaron pero no tuvo como resultado la generación de anticuerpos neutralizantes.

Tabla 6: Compendio de anticuerpos anti-CMV clonados a partir de nueve líneas de EBV

Línea de EBV	HC (aminoácidos)	No. de HCs	LC kappa (aminácidos)	LC lambda (aminácidos)	No. de LCs	Combinaciones teóricas de H y L	Anticuerpos expresados	Anticuerpos neutralizantes
SM 1	Vh1 (151)	2	Vk1 (130)		1	5	2	
	Vh3 (142)	3		V11 (130) V11 (128)*	1 2	5 10		3
SM 3	Vh1 (151)	3		V11 (128)	8	24	6	4
SM 4	Vh1 (151)	2		V11 (128*, 129, 133)	10	20	16	13
			Vk1 (131) Vk3 (129)	2 1	4 2	1 1		
SM 5	Vh1 (151)	3		V11 (128)	4	12	9	9
SM 6	Vh1 (151)	3		V11 (128, 129, 130, 131), V12 (130, 131)	15	75	25	12
	Vh5 (148)	2				28	9	
SM 7	Vh1 (151)	4	Vk1 (130)		2	8	2	0
SM 9	Vh1 (142)	2		V11 (128), V12 (130)	5	10	4	0
SM 10	Vh1 (138)	3	Vk2 (133)		2	6	2	0
SM 11	Vh1 (151)	10	Vk1 (130)		2	20	9	
				V11 (128)*	6	60	5	5
				V11 (130)	1	10		
		37			62	295	100	46

* Indica la cadena clonada a partir de 3 líneas SM diferentes.

118 152

158
159

La siguiente Tabla 7 da una visión general de todas las combinaciones de cadena ligera y pesada lambda que dan como resultado los anticuerpos neutralizantes. La Tabla 19, que se encuentra más adelante, resume los números de SEQ ID del listado de secuencias adjunto, para las cadenas ligeras y pesadas de CDRs de los anticuerpos neutralizantes que se muestran en la siguiente Tabla 7.

Tabla 7: Combinaciones de anticuerpos de cadena Pesada y Ligera

10

15

20

25

	V _L					
V _H	SM5-1	SM4-10	SM6-5	SM1-6	SM3-1	SM5-6
SM5-1	Ab-28					Ab-03
SM4-10		Ab-02				
SM6-5			Ab-04			
SM1-6				Ab-11		
SM3-1					Ab-14	
SM11-17				Ab-42		
SM11-21				Ab-46		

159
160

5

10

15

20

25

	V _L					
V _H	SM5-1	SM4-10	SM6-5	SM1-6	SM3-1	SM5-6
SM6-11			Ab-01			
SM4-3		Ab-20		Ab-27		
SM5-9	Ab-10					Ab-31
SM1-7				Ab-12		
SM1-8				Ab-13		
SM3-4						
SM6-23			Ab-35			
SM11-18				Ab-43		
SM11-19				Ab-44		
SM5-3	Ab-29					
SM11-20				Ab-45		

160
161

5

Cont.	V _L					
V _H	SM6-48	SM4-3	SM5-9	SM4-12	SM5-5	SM3-2
SM5-1			Ab-32		Ab-30	
SM4-10		Ab-26		Ab-08		
SM6-5	Ab-37					
SM3-1						Ab-15
SM6-11	Ab-05					
SM4-3		Ab-06		Ab-22		
SM5-9			Ab-07		Ab-09	
SM3-4						Ab-17
SM6-23	Ab-38					

10

15

20

Cont.	V _L					
V _H	SM3-4	SM4-1	SM4-5	SM4-7	SM6-6	SM6-51
SM4-10		Ab-25	Ab-23	Ab-24		

25

161
162

5

10

Cont.	V _L					
V _H	SM3-4	SM4-1	SM4-5	SM4-7	SM6-6	SM6-51
SM6-5					Ab-33	Ab-39
SM6-11					Ab-34	Ab-40
SM4-3		Ab-18	Ab-19	Ab-21		
SM3-4	Ab-16					
SM6-23					Ab-36	Ab-41

15

3.5 Purificación del ARN y síntesis de la primera cadena del ADNc

20

La purificación del ARN de los gránulos de células congelados a partir de las líneas de células-B de memoria SM10, SM12, 2C2, 1G2 transformadas por EBV, se llevó a cabo utilizando el Mini Kit RNeasy® (Qiagen) de acuerdo con el manual del fabricante. La síntesis del ADNc se llevó a cabo utilizando el Kit de Síntesis de ADNc del Transcriptor de Alta Fidelidad (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25

3.6 PCR anidada

A partir del ADNc sintetizado en el Ejemplo 3.5 anterior, se

amplificaron las regiones codificantes variables de anticuerpos humanos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada ejecutando dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) sucesivas (los parámetros de la PCR se muestran en la Tabla 8) empezando a partir de 1 a 2 microlitros de ADNc como plantilla. Ambas reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) se realizaron con el mismo programa (Tabla 9) con diferentes cebadores hacia adelante 5' y cebadores en reversa 3' (Tabla 10). Como una plantilla, para la primera ronda de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizaron 50 nanogramos de ADNc de plantilla y, para la segunda ronda de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizaron de 1 a 2 microlitros del producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (purificado mediante el Kit de Purificación de PCR QIAGEN) desde la primera ronda de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADNc de todas las líneas de EBV se amplificó mediante las combinaciones de cebadores V_H , V_K y V_λ para la primera ronda de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como se muestra en la Tabla 10a, y las combinaciones de cebadores V_H , V_K y V_λ para la segunda ronda de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como se muestra en la Tabla 10b. Para la segunda ronda de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se seleccionó un cebador de 'ajuste óptimo' para la secuencia obtenida a partir de la primera ronda de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tabla 2, Tiller y colaboradores., *ibíd.*).

164
165

Tabla 10a: Cebadores para la primera ronda de amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

1ª Ronda de cebadores hacia adelante (5') de PCR			
5	Línea EBV	Nombre del Cebador	Secuencia SEQ ID No:
	SM10 VH	5' Ig L Cadena VH 4/6	5' CCC AGA TGG GTC CTG TCC CAG GTG CAG 3'
10	SM10 Vk	5' Ig L Cadena Vk 1/2	5' ATG AGG STC CCY GCT CAG CTG CTG G 3'
	SM12 VH	como SM10 VH	como SM10 VH
15	SM12 Vk	como SM10 Vk	como SM10 Vk
	SM12 Vλ	5' Ig L Cadena Vλ 3	5' GCT CTG TGA CCT CCT ATG AGC TG 3'
20	2C2 VH	como SM10 VH	como SM10 VH
	2C2 Vk	como SM10 Vk	como SM10 Vk
	1G2 VH	como SM10 VH	como SM10 VH
25	1G2 Vλ	5' Ig L cadena	5' GGT CCT GGG CCC AGT

165
166

5

1ª Ronda de cebadores hacia adelante (5') de PCR			
Línea EBV	Nombre del Cebador	Secuencia	SEQ ID No:
	Vλ 1	CTG TGC TG 3'	

10

15

20

25

1ª Ronda de cebadores en reversa (3') de PCR			
Línea EBV	Nombre del Cebador	Secuencia	SEQ ID No:
SM10 VH	3' Ig Cy cadena CH 1	5' GGA AGG TGT GCA CGC CGC TGG TC 3'	300
SM10 Vk	3' Ig cadena Cκ 543	5' GTT TCT CGT AGT CTG CTT TGC TCA 3'	301
SM12 VH	como SM10 VH	como SM10 VH	300
SM12 Vk	como SM10 Vk	como SM10 Vk	301
SM12 Vλ	como 1G2 Vλ	como 1G2 Vλ	302

166-
167

5

10

1ª Ronda de cebadores en reversa (3') de PCR			
Línea EBV	Nombre del Cebador	Secuencia	SEQ ID No:
2C2 VH	como SM10 VH	como SM10 VH	300
2C2 Vκ	como SM10 Vκ	como SM10 Vκ	301
1G2 VH	como SM10 VH	como SM10 VH	300
1G2 Vλ	3' Ig cadena Cλ	5' CAC CAG TGT GGC CTT GTT GGC TTG 3'	302

15

Tabla 10b: Cebadores para la segunda ronda de amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

20

25

2ª Ronda de cebadores hacia adelante (5') de PCR			
Línea EBV	Nombre del Cebador	Secuencia	SEQ ID No:
SM10 VH	5' Ig Agel VH 4	5' CTG CAA CCG GTG TAC ATT CCC AGG TGC AGC TGC AGG AG 3'	303
SM10 Vκ	5' Ig Agel Vκ 2-24	5' CTG CAA <u>CCG</u> <u>GTG</u> TAC ATG GGG ATA TTG TGA TGA CCC	304

5
10
15
20
25

5

2ª Ronda de cebadores hacia adelante (5') de PCR			
Línea EBV	Nombre del Cebador	Secuencia	SEQ ID No:
1G2 Vλ	5' Ig Agel Vλ 1	5' CTG CTA CCG GTT CCT GGG CCC AGT CTG TGC TGA CKC AG 3'	309

10

2ª Ronda de cebadores en reversa (3') de PCR			
Línea EBV	Nombre del Cebador	Secuencia	SEQ ID No:
SM10 VH	3' Ig Sall JH 1/2/4/5	5' TGC GAA <u>GTC</u> <u>GAC</u> GCT GAG GAG ACG GTG ACC AG 3'	310
SM10 Vk	3' Ig BsiWI Jk 2	5' GCC ACC <u>GTA</u> <u>CGT</u> TTG ATC TCC AGC TTG GTC 3'	311
SM12 VH	3' Ig Sall JH 6	5' TGC GAA <u>GTC</u> <u>GAC</u> GCT GAG GAG ACG GTG ACC GTG 3'	312
SM12 Vk	como SM10 Vk	como SM10 Vk	311

25

5

10

15

2ª Ronda de cebadores en reversa (3') de PCR			
Línea EBV	Nombre del Cebador	Secuencia	SEQ ID No:
SM12 Vλ	como 1G2 Vλ	como 1G2 Vλ	314
2C2 VH	como SM12 VH	como SM12 VH	312
2C2 Vκ	3' Ig Bsi WI Jk 1/4	5' GCC ACC <u>GTA</u> <u>CGT</u> TTG ATY TCC ACC TTG GTC 3'	313
1G2 VH	como SM10 VH	como SM10 VH	310
1G2 Vλ	3' Ig XhoI Cλ	5' CTC CTC <u>ACT</u> <u>CGA</u> <u>GGG</u> YGG GAA CAG AGT G 3'	314

Se subrayan los sitios de corte de enzimas de restricción

20

3.7 Clonación del vector de expresión

25

Antes de la clonación, las alícuotas de las cadenas V_H, V_κ y V_λ de segundos productos de PCR se purificaron con el kit de purificación de PCR de QUIAGEN según las instrucciones del fabricante y en secuencia con el cebador hacia adelante o en reversa respectivo (Tabla 10). Se analizaron las secuencias mediante

17/

IgBLAST (GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) para identificar segmentos de línea germinal V (D) J con mayor identidad.

Las regiones variables amplificadas de las líneas de EBV
5 fueron digeridas con africanas/Sall (cadena pesada $\gamma 1$),
africanas/BsiWI (cadena ligera κ) o africanas/XhoI (cadena ligera λ) y
clonadas en los vectores de expresión humanos Igy1, Igk y Ig λ que
contienen una secuencia del péptido señal Ig de gen murino (Número
de adhesión de GenBank: DQ407610) y un sitio de clonación
10 múltiples sobre la corriente de las regiones constantes de humanos,
Igy1, Igk o Ig λ . También está presente en el vector de expresión un
promotor del citomegalovirus (CMV) humano para conducir un gen de
resistencia a ampicilina para la selección y transcripción. Se realizó
la ligadura en un volumen total de 20 microlitros con tipo 1U T4 DNA-
15 ligasa (Invitrogen), 7.5 microlitros de digerido y purificado por medio
del producto de PCR y 25 nanogramos del vector alineado. Las
bacterias de *E.coli* DH10B (Invitrogen) competentes se transformaron
en 42°C con 2 microlitros del producto de ligadura en placas de 96
pozos por electroporación o por transformación de choque térmico.
20 Las colonias fueron examinadas mediante PCR usando el cebador
hacia adelante 5' (5'-GCT TCG TTA GAA CGC GGC TAC-3'; SEQ ID
No: 315) y cebador en reversa 3' de IgG interno (5'-GTT CGG GGA
AGT AGT CCT TGA C - 3'; No SEQ ID: 316), el cebador en reversa
3'Ck494 (5' GTG CTG TCC TTG CTG TCC TGC T 3'; SEQ ID No:
25 317) o el cebador en reversa 3' de C λ (5' CAC CAG TGT CGG CTT

171
172

GTT CGG TTG 3'; No SEQ ID: 318), respectivamente. Los productos de PCR del tamaño esperado fueron secuenciados para confirmar la identidad con los productos PCR originales.

5 En la Tabla 11, a continuación, se presenta un resumen del
número de las regiones variables de cadena pesada (HC) de
anticuerpos y regiones variables de cadena ligera (LC) clonadas a
partir de células humanas de B transformadas por EBV. Los cuatro
anticuerpos neutralizantes (última columna) son el resultado de la
10 combinación de 4 cadenas pesadas únicas y singulares lambda o
cadenas ligeras kappa. Las cadenas pesadas se derivan de dos
genes V-línea germinal: IGHV4-39 y IGHV4-59. Las cadenas ligeras
kappa se derivan de dos genes V-línea germinal: IGKV2D-28 y 33 de
la IGKV1D y la cadena ligera lambda se deriva del gen V-línea
15 germinal: humanizada-47. La cadena ligera lambda derivada del gen
V-línea germinal IGLV3-10 no tuvo como resultado el reconocimiento
de antígenos cuando se combinó con una cadena pesada. Las
combinaciones del anticuerpo neutralizante de cadenas ligera y
pesada se describen en la Tabla 12 que se encuentra más adelante.

20

25

Tabla 11: Compendio de anticuerpos anti-hCMV clonados a partir de cuatro líneas de EBV

SM 10	Vh4-39 (125)	1	Vk2-24 (112)		1	1	1	1
SM 12	Vh4-59 (125)	1	Vk2-28 (112)	Vl3-10 (109)	2	2	1	1
2C2	Vh4-59 (130)	1	Vk1D-33 (107)		1	1	1	1
1G2	Vh4-39 (120)	1		Vl1-47 (108)	1	1	1	1
		4			5	5	4	4

123
174

Tabla 12: Combinaciones de anticuerpo de cadena Pesada y Ligera

	Anticuerpo	Cadena Pesada	Cadena Ligera
5	Ab-47	SM10 Vh	SM10 Vk
	Ab-48	SM12 Vh	SM12 Vk
	Ab-49	2C2 Vh	2C2 Vk
10	Ab-50	1G2 Vh	1G2 Vλ

La Tabla 19, mostrada más adelante, resume los números de la SEQ ID de la lista de secuencia de acompañamiento, para las cadenas ligeras y pesadas de CDRs de los anticuerpos neutralizantes que se muestra en la Tabla 12 anterior.

Ejemplo 4: Expresión y purificación de anticuerpos recombinantes

La caracterización adicional de los anticuerpos anti-CMV clonados requiere su expresión y posterior purificación.

Cuarenta y seis de los anticuerpos recombinantes (Ab-01 a Ab-46) se expresaron por transfección transitoria de células CHO (DSMZ, Braunschweig, DE). Brevemente, las células se sembraron en placas de cultivo celular (diámetro de 10 centímetros; Greiner Bio-One, GmbH) con una densidad de 2.2 x 10⁶ células cada plato en medio de SF-IMDM (Invitrogen) que contenía 2% de FCS (Sigma).

Después de 24 horas, se preparó la mezcla de transfección preparada por medio de la mezcla de 1 mililitro MEM (PAA Laboratories) con 6.45 microgramos de plásmidos de expresión de cadena pesada, 6.45 microgramos de vector de expresión de cadena ligera y 12.9 microlitros de reactivo de transfección de MATra (IBA GmbH, Göttingen, DE) por placa. Esta mezcla de transfección se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. El medio de las células sembradas se intercambió por 10 mililitros de MEM y la mezcla de transfección se añadió a las células gota a gota. Posteriormente, el plato del cultivo se incubó en una placa magnética (IBA GmbH) durante 15 minutos. El medio, luego, se aspiró y se le agregaron 10 mililitros de medio de SF-IMDM con 2% de FCS que contenían niveles ultra bajos de IgG bovina (Lonza) a las células. 24 horas más tarde, se renovó el medio. Después de dos días adicionales, se renovó el medio y el sobrenadante de anticuerpos recombinantes que contenía se cosechó por centrifugación a 244 gramos durante 5 minutos. El sobrenadante de cultivo de células se cosechó tres días más tarde, condicionado nuevamente por centrifugación y despejado, se combinaron los sobrenadantes que contenían anticuerpos.

Un dispositivo de ultrafiltración Vivacell 70 (MWCO 10kDa; Sartorius Stedim Biotech) se utilizó para concentrar el sobrenadante de cultivo de células acondicionado 100 veces por centrifugación a 1.000 gramos y 20°C durante 1 hora. Para la purificación de anticuerpos recombinantes, una columna de proteína A HP de trampa

Spin (GE Healthcare) se equilibró con el regulador de enlace (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH de 7.5) y se cargaron a 300 microlitros del concentrado. La columna se selló con una tapa y se incubó en un mezclador más extremo a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la columna de centrifugado se centrifugó durante 1 minuto a 150g. Después de lavar la columna con 400 microlitros de regulador de enlace y centrifugación a 150g por 1 minuto, el proceso de carga se repitió otras tres veces hasta que todo el concentrado había sido cargado. Después del paso de la carga final, se lavó la columna cuatro veces mediante aplicación de 400 microlitros de regulador vinculante y posteriormente, centrifugación a 150g por 1 minuto. El anticuerpo recombinante unido se eluyó de la columna de giro dos veces añadiendo regulador de 200 microlitros de elución 100 mM glicina/HCl (pH 2.5) y centrifugación a 150g por 1 minuto. Los eluatos se neutralizaron inmediatamente con 30 microlitros de regulador de neutralización (Tris-HCl pH 9.0 1 M). El regulador se intercambió mediante la carga de los eluatos combinados en una columna sobre Zeba. La columna Spin desalada (Pierce) se equilibró con PBS y posterior mediante centrifugación a 150g durante 2 minutos. Se almacenaron los anticuerpos recombinantes monoclonales en tubos de LoBind de proteína (Eppendorf) a 4°C hasta el procesamiento adicional para estudios de caracterización.

Los sobrenadantes del cultivo de anticuerpos producidos se analizaron para gB de reconocimiento por ELISA o Biacore, como se describe en los Ejemplos 1 y 5. Después se determinaron las

106
127

concentraciones de IgG, tal como se describe en los Ejemplos 2 y 5, se analizaron los sobrenadantes de cultivo específico de gB para la actividad neutralizante, utilizando el ensayo de la luciferasa como se describe en el Ejemplo 2 (ensayo de luciferasa) utilizando células HFF de fibroblastos primarias. Se eligieron siete anticuerpos anti-CMV que mostraron actividades eficientes neutralizando el 50% para nuevos experimentos (ver Tabla 13 a continuación).

Tabla 13: Actividades neutralizantes de 50 por ciento de los anticuerpos monoclonales SM producidos por células CHO

10

15

20

25

Anticuerpo Monoclonal	Actividad Neutralizante del 50% (mg/ml)
Ab-02	0.3
Ab-04	0.5
Ab-11	1.3
Ab-14	0.4
Ab-19	0.6
Ab-28	0.3
Ab-42	1.0
ITC88*	1.5
Cytotect [®]	200

Los resultados reflejan los valores promedio de tres ensayos independientes. Las variaciones entre los ensayos fueron en el rango 10-20%. * Ohlin y colaboradores., (1993); ² Cytotect (bioensayo) es una agrupación del citomegalovirus humano (hCMV) hiperinmune IgG.

Para la expresión de los cuatro anticuerpos recombinantes Ab-47 a Ab-50, se siguió el método de acuerdo con Tiller y colaboradores, *ibid.* Dicho de una manera breve, las células HEK 293T (DSMZ, Braunschweig, DE) se cultivaron en matraces de 75cm² (Greiner Bio-one, GmbH) bajo condiciones convencionales en un medio de DMEM (GibcoBRL) complementado con FCS inactivado por calor al 10 por ciento (PAN Biotech GmbH), 350 microgramos/mililitro de L-glutamina (Merck), y 100 microgramos/mililitro de gentamicina (SERVA Electroforesis GmbH). Se llevaron a cabo las transfecciones transitorias de crecimiento exponencial de células 293T mediante precipitación de la confluencia celular CaPO₄ al 80 por ciento. Se mezclaron cantidades iguales (12.5-20 microgramos de cada una) de ADN de vector de expresión de cadena pesada y ligera correspondientemente en 1 mililitro agua estéril y se agregó por goteo CaCl₂ 2.5M a una concentración de 250mM. Se mezcló un volumen igual de regulador salino de HEPES dos veces con la solución de calcio-ADN en vórtex lento y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto (temperatura ambiente 1 minuto + 1 minuto 37°C) para permitir la formación de precipitados. La mezcla de precipitación se distribuyó más tarde al plato de cultivo. Las

178
179

células se lavaron con 10 mililitros de suero regulado con fosfato después de 6-8 horas y se cultivaron durante 6-7 días en 15 mililitros de DMEM antes de cosechar los sobrenadantes.

Los sobrenadantes cultivados se analizaron para el reconocimiento de gB mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 1. Después se determinaron las concentraciones de IgG, como se explica en el Ejemplo 2, se analizaron los sobrenadantes del cultivo específico de gB para neutralizar la actividad, utilizando el ensayo de luciferasa (como se describe en el Ejemplo 2) utilizando HFF de células de fibroblasto primario. Las actividades de neutralización del 50 por ciento de los anticuerpos monoclonales producidos mediante células HEK-293T se muestran en la siguiente Tabla 14:

Tabla 14: Actividades neutralizantes del 50 por ciento de los anticuerpos monoclonales producidos por células HEK-293T

Anticuerpo Monoclonal	Actividad Neutralizante del 50% (mg/ml)
Ab-47	0.14
Ab-48	0.33
Ab-49	0.53
Ab-50	0.23
C23*	0.23

Los resultados reflejan los valores promedio de dos ensayos independientes.

*C23 es un anticuerpo específico de gB utilizado como control
5 (T123; un tipo de donación a partir de Teijin Pharma Limited, Japón)

Ejemplo 5: Caracterización de los anticuerpos anti-hCMV

5.1: Cuantificación de los anticuerpos de citomegalovirus humano (hCMV) utilizando tecnología de arreglos de la suspensión (Luminex®)

10 Los sobrenadantes del cultivo celular que contienen IgG humano, se diluyeron en el regulador de ensayo (Roche, Cat# 1112589), y las diluciones se establecieron por duplicado en una placa de 96 medios pozos (Corning, Cat#3 884). Dicho de una manera breve, las muestras de 25 microlitros se incubaron en la
15 oscuridad (20°C, 650rpm) durante 1 hora con 5 microlitros que contienen 1200 cuentas de Luminex-COOH cargadas por emparejamiento de amina con IgG-Fc específico anti-humana (Caltag, Cat#H10500). Se generaron las Curvas Estándares utilizando duplicados de 25 microlitros de una serie de dilución 1:3
20 (0.08 – 60 nanogramos/mililitro) de IgG humano ChromPure de toda la molécula (Jackson Immuno-Research, EUA Cat# 009-000-003). La detección se hizo mediante la adición de 30 microlitros de IgG-Fc específico anti-humano, marcado con R-PE (5 microgramos/mililitro; JIR Cat# 109-116-098), e incubación adicional durante 1 hora.
25 Entonces se leyeron las placas y se analizaron en un instrumento

Luminex® 200 (Millipore) utilizando las siguientes posiciones: 100 cuentas, 50 microlitros del tamaño de muestra.

5.2: Cuantificación de proteína gB (hCMV) utilizando tecnología de arreglo de la suspensión

5 Los sobrenadantes del cultivo celular que contienen gB (hCMV) se diluyeron en regulador de ensayo (Roche Cat# 1112589), y las diluciones se establecieron por triplicado en una placa de filtro de 96 pozos (Millipore Cat# MABVN 1250). Dicho de una manera breve, 25 microlitros de las muestras se incubaron en la oscuridad (20°C,
10 650rpm) durante 1.5 horas con 5 microlitros que contienen 1500 cuentas Luminex-COOH cargadas por emparejamiento de amina con el anticuerpo V_H3/65-V_K1/19 de hCMV-IgG anti-humano, un anticuerpo específico hCMV no neutralizado, pero de muy alta afinidad, previamente identificado en casa. Se generaron las curvas
15 estándares utilizando triplicados de 25 microlitros de una serie de dilución de gB 1:3 (6–1458 nanogramos/mililitro). Se lavaron las placas dos veces (100 microlitros de suero regulado con fosfato por pozo) utilizando un recolector al vacío y para la detección de 50 microlitros del anticuerpo ITC52 se le agregó anti-hCMV-IgG
20 biotinilado (5 microgramos/mililitro; generado en casa; Ohlin y colaboradores, 1993), durante 1.5 horas adicionales. Después de dos pasos de lavado (con 100 microlitros de suero regulado con fosfato cada uno) con 50 microlitros, se agregaron 1.2 microgramos/mililitro de Neutravidina marcada con R-PE (Invitrogen, Cat# A2660), durante
25 30 minutos antes de leer las placas y de analizar utilizando el

instrumento Luminex® 200 (características: 100 cuentas, 40 microlitros por tamaño de muestra).

5.3: Biacore

Se analizaron las interacciones de proteína-proteína mediante
5 técnica de resonancia de plasmón superficial utilizando un
instrumento Biacore® T100 (Biacore, GE Healthcare, Munich) con
software de control v 2.0.1 de Biacore® T100. Todas las
interacciones se analizaron a 25°C en DPBS una vez con P20 (0.05
por ciento). Se ensayó cada interacción de enlace cuando menos dos
10 veces. La proteína gB de hCMV se acopló al flujo celular de un chip
sensor CM5 (matriz de dextrano carboximetilada, GE Healthcare) por
medio del procedimiento de emparejamiento de amina estándar. La
matriz de dextrano carboximetilada se activó con 1-etil-3-(3-dimetil-
amino-propil)-carbodi-imida (EDC) 0.4M, y N-hidroxisuccinimida
15 (NHS) 0.1M de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE
Healthcare). Se activaron dos flujos celulares y la proteína gB se
diluyó con acetato de sodio 10mM, pH 5.0, hasta 50
microgramos/mililitro y se inyectó a una velocidad de flujo de 5
microlitros/minuto hasta que se alcanzó un nivel apropiado de
20 emparejamiento para los experimentos de enlace (5,000 unidades de
resonancia) o para los experimentos cinéticos (2,000 unidades de
resonancia). Se inactivaron los grupos no reactivos mediante la
inyección dietanolamina-HCl 1M, pH 8.5. Se preparó un control de
flujo celular de conformidad con lo anterior, con ovalbúmina (Imject,
25 Pierce, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, lote JF124260) a un pH

de 4.0. Antes de los experimentos de enlace, se lavaron a fondo los flujos celulares con regulador de corriente.

Para los análisis de enlace, se ajustaron los sobrenadantes del cultivo celular que contienen anticuerpos anti-gB específicos a 2.5 microgramos/mililitro de IgG mediante dilución en IgG de SF-IMDM ultra ligero al 2 por ciento, y se inyectaron durante 90 segundos en suero regulado con fosfato con albúmina de suero bovino al 0.02 por ciento y Tween 20 al 0.05 por ciento a 10 microlitros/minuto. Después de un tiempo de disociación de 90 segundos, se representó la estabilidad del enlace utilizando la Evaluación T100 del Software versión 2.0.1 de Biacore®.

Para el análisis cinético, se prepararon los fragmentos de Fab de los anticuerpos Ab-02, Ab-04, Ab-11, Ab-14, Ab-28, Ab-42 y ITC88, como control positivo, a partir de la proteína IgG humana purificada por A, utilizando papaína inmovilizada de acuerdo con el protocolo estándar del fabricante (Pierce, Thermo Fisher Scientific). Los productos de disociación se confirmaron mediante SDS-PAGE con la detección del teñido con plata y mediante Fab/Fc de arreglo de gránulos Luminex®. Para los análisis cinéticos, se elevó la velocidad de flujo hasta 70 microlitros/minuto y se introdujeron tres curvas de blanco (concentraciones de cero) en cada proceso. La superficie se regeneró con glicina/HCl 10mM a un pH de 2.0. Se evaluaron las curvas de enlace utilizando el Software Biacore® T100 Evaluation versión 2.0.1 aplicando un modelo Langmuir 1:1 con ajuste global de $R_{\max}$.

Tabla 15: Compendio de índices de encendido y apagado, y K_D calculada.

Fab anti-gB	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$
Ab-02	$3.8(\pm 0.3) \times 10^5$	$1.3(\pm 0.1) \times 10^{-4}$	$3.5(\pm 0.1) \times 10^{-10}$
Ab-04	$7.7(\pm 0.3) \times 10^4$	$1.2(\pm 0.1) \times 10^{-4}$	$1.5(\pm 0.1) \times 10^{-9}$
Ab-11	$7.6(\pm 0.4) \times 10^4$	$5.1(\pm 0.1) \times 10^{-4}$	$6.8(\pm 0.4) \times 10^{-9}$
Ab-14	$5.6(\pm 0.3) \times 10^4$	$8.4(\pm 0.1) \times 10^{-4}$	$1.5(\pm 0.1) \times 10^{-8}$
Ab-28*	$4.0(\pm 0.6) \times 10^5$	$2.4(\pm 0.8) \times 10^{-5}$	$5.7(\pm 1.2) \times 10^{-11}$
Ab-42	$5.7(\pm 0.1) \times 10^4$	$3.2(\pm 0.01) \times 10^{-4}$	$5.6(\pm 0.1) \times 10^{-9}$
ITC88**§	$4.5(\pm 0.04) \times 10^4$	$4.7(\pm 0.1) \times 10^{-5}$	$1.0(\pm 0.01) \times 10^{-9}$

Basándose en tres mediciones sobre dos superficies de chip Biacore

* Alcanza la limitación del método

** Basándose en dos mediciones sobre dos superficies de chip

Biacore

§ La afinidad publicada (K_D) para ITC88 sobre el antígeno pHM90-5 es de 2 nM (Ohlin y colaboradores, 1993)

Ejemplo 6: Neutralización de diferentes genotipos de gB hCMV

Se clasificaron las cepas de HCMV de laboratorio y aisladas clínicas en varios genotipos de gB (Chou y Dennison, 1991). Las

actividades de los anticuerpos anti-hCMV neutralizados al 50 por ciento se determinaron utilizando genotipos de gB hCMV diferentes adicionales, utilizando inmunofluorescencia indirecta como una lectura. Las cepas de virus Towne, AD169 y el Altu aislado clínico se clasificaron como el genotipo gB 1, el genotipo gB 2, y el genotipo gB 3, respectivamente. Se propagaron todas las cepas de virus en los fibroblastos de prepucio humano (HFFs) mediante procedimientos estándares y se determinaron las titulaciones de infectividad en los sobrenadantes virales mediante el método como se describe en Mahy y Kangro (1996). Un ensayo de inmunofluorescencia indirecta se llevó a cabo como se describe en Andreoni y colaboradores (1989). En breve, se incubaron diluciones en serie dos veces de seis anticuerpos monoclonales (Anticuerpos Ab-04, Ab-11, Ab-14, Ab-19, Ab-28 y Ab-42) con una cantidad de titulación del genotipo de gB hCMV respectivo (300 unidades formadoras de placas (pfu)) durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, se le agregaron mezclas de virus-anticuerpo al cultivo creciente de HFF para la confluencia en microplacas de 96 pozos. Se probaron todas las muestras por triplicado. Los sobrenadantes virales se removieron del HFFs, después de una incubación de 4 horas a 37°C y se reemplazaron del medio completamente. Después de otro periodo de incubación de 16 horas a 20 horas, las células se lavaron y se ajustaron con etanol. Las células infectadas se tiñeron utilizando el anticuerpo monoclonal p63-27, el cual es específico para la proteína temprana inmediata (IE) mayor, UL123, del citomegalovirus humano (hCMV) y los

185-
186

anticuerpos secundarios de IgG de anti-ratón conjugados por Cy3 (Jackson ImmunoResearch, EUA). Siguiendo el lavado extensivo, se contaron los núcleos IE positivos bajo un microscopio de fluorescencia y se calculó el porcentaje de neutralización como sigue:

%-neutralización = $100 \times (V_0 - V_n)/V_0$, en donde V_n es el número de núcleos positivos de IE en los pozos que contienen virus y anticuerpo, y V_0 es el número de núcleos positivos de IE en los pozos que se incubaron con virus solo. En general, se ajustó la dosis infecciosa para producir 1000 células infectadas por pozo. La Tabla 16 más adelante resume la actividad neutralizante del 50 por ciento de varios de los anticuerpos recombinantes sobre el citomegalovirus humano (hCMV) representando diferentes genotipos de gB. Los anticuerpos monoclonales probados se encontraron para analizar los genotipos gB 1, 2 y 3 del citomegalovirus humano (hCMV) con una eficiencia comparable.

Tabla 16: Actividades neutralizantes del 50 por ciento de los anticuerpos monoclonales recombinantes contra 3 genotipos de gB de hCMV

Anticuerpo Monoclonal	Actividad neutralizante del 50 por ciento (µg/ml)		
	Genotipo de gB 1 (cepa Towne)	Genotipo de gB 2 (cepa AD169)	Genotipo de gB 3 (Altu aislado)
Ab-04	0.5	0.7	0.3

186
187

5

10

Anticuerpo Monoclonal	Actividad neutralizante del 50 por ciento (µg/ml)		
	Genotipo de gB 1 (cepa Towne)	Genotipo de gB 2 (cepa AD169)	Genotipo de gB 3 (Altu aislado)
Ab-11	1.0	1.9	0.7
Ab-14	1.3	1.5	0.6
Ab-19	0.6	1.4	0.4
Ab-28	0.4	0.5	0.1
Ab-42	2.0	2.9	0.5
ITC88*	1.0	1.9	0.4

*(Ohlin y colaboradores, 1993)

15

Ejemplo 7: Neutralización del citomegalovirus humano (hCMV) introducido en las células endoteliales, epiteliales y dendríticas de los anticuerpos recombinantes

20

Todos los ensayos de neutralización descritos en los ejemplos anteriores se llevaron a cabo utilizando fibroblastos como células objetivo. Para investigar si los anticuerpos recombinantes neutralizantes anteriormente identificados son capaces de neutralizar también la infección de las células endoteliales, epiteliales y dendríticas, se utilizó un aislado de HCMV endotelio- y epiteliotrópico TB40E (una donación generosa proveniente del Dr.

25

Christian Sinzger, Instituto de Virología y Epidemiología Médica de Enfermedades Virales, Universidad de Tübingen, Alemania). Se propagó el TB40E en HFFs y se determinaron las titulaciones de la infectividad en sobrenadantes virales como es descrito por Mahy y Kangro (1996). Se cultivaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) en un medio basal de células endoteliales EBM-2 complementado con el kit EGM-2MV (Lonza, Verviers, Bélgica), y se utilizaron para los experimentos en los pasajes 4–7. Se propagaron células epiteliales de pigmento de retina ARPE-19 humanas (ATCC CRL-2302) en un medio Eagle modificado por Dulbecco: Mezcla Nutriente F12, mezcla de 1:1, complementado con glutamina 2.5 mM, regulador Hepes 15 mM, HCl de piridoxina, 55 miligramos/litro de piruvato de sodio, suero de becerro fetal al 10 por ciento (inactivado por calor), 100 Unidades Internacionales/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania). Las células dendríticas primarias (DC) se aislaron como sigue: Las células purificadas mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donantes de sangre seronegativos para HCMV se incubaron en un medio RPMI-1640 complementado con 2mM de glutamina, 10 mM de regulador Hepes, 100 Unidades Internacionales / mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de estreptomina en la presencia de suero autólogo (2 por ciento por volumen/volumen, inactivado por calor) durante 2 horas a 37°C. Después del periodo de incubación, se removieron las células no adherentes mediante lavado con medio de cultivo de células y monocitos

adherentes diferenciados en DCs después de la adición de IL-4 (25U/mililitro), y GM-CSF (800U/mililitro) (CellGenix Technologie Transfer GmbH, Freiburg, Alemania) el día dos y cuatro después del aislamiento. En el día seis, se llevaron a cabo ensayos de neutralización mediante la incubación del anticuerpo y el virus durante 1 hora a 37°C como se describe anteriormente. La infección de DCs requirió una cantidad 500-veces mayor de partículas de virus. Las mezclas de anticuerpo-virus se agregaron a los DCs seguido por otro periodo de incubación de 12 horas. Después de la fijación y la permeabilización con Metanol enfriado en hielo, las células infectadas se tiñeron usando utilizando el anticuerpo monoclonal E13 (Morfosys AbD GmbH, Dusseldorf, Alemania), el cual es específico para la proteína mayor inmediata temprana (IE), UL123, del citomegalovirus humano (hCMV) y los anticuerpos secundarios IgG anti-ratón FITC-conjugados (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Se utilizó la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) como lector. Se usaron tanto el FlowJo 5.7.2. (Tree Star Inc. Ashland, OR), como el Graph Pad Prism 4 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) para el análisis. Los resultados se resumen en las Tablas 17a y 17b.

Los ensayos de neutralización con células endoteliales y células epiteliales se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 6 utilizando una prueba de inmunofluorescencia indirecta como lector; sin embargo se hicieron las siguientes modificaciones a ese método: se incubaron HUVECs en EBM-2 complementado con EGM-

189
190

2MV-kit sin hFGF-B durante 1 hora a 37°C antes de la infección. Esto fue necesario para remover la heparina asociada a FGF, el cual mostró un efecto inhibidor sobre la infección. Adicionalmente, una cantidad 10 veces mayor de partículas virales (3000 unidades formadoras de placas (pfu)) se aplicó tanto para la infección de HUVECs como de ARPE.

Se observó que todos los anticuerpos probados neutralizan la infección de las células endoteliales, epiteliales y dendríticas con una eficiencia comparable con la neutralización de HFFs (véanse las Tablas 17a y 17b más adelante).

Tabla 17a: Comparación de las actividades de neutralización al 50 por ciento de los anticuerpos monoclonales probados en diferentes tipos de células

15

20

25

mAb	50 por ciento de actividad neutralizante (microgramos/mililitro)			
	Células de fibroblastos (HFFs)	Células endoteliales (HUVECs)	Células epiteliales (ARPE-19)	Células dendríticas (dependientes del donante°)
Ab-02	0.3	0.3	0.3	0.2/0.4

190
191

5

10

15

20

25

mAb	50 por ciento de actividad neutralizante (microgramos/mililitro)			
	Células de fibroblastos (HFFs)	Células endoteliales (HUVECs)	Células epiteliales (ARPE-19)	Células dendríticas (dependientes del donante°)
Ab-04	0.5	0.4	0.3	0.3/0.5
Ab-11	1.3	1.3	0.3	0.2/1.0
Ab-14	0.4	1.0	0.4	0.2/1.0
Ab-19	0.6	0.6	0.9	n.d.
Ab-28	0.3	0.2	0.2	0.3/0.5
Ab-42	1.0	1.0	0.3	0.6/1.0
ITC88*	1.2	0.6	0.4	0.3/0.9

* (Ohlin y colaboradores, 1993)

° Se analizaron las células dendríticas de seis diferentes donantes seronegativos de HCMV. Se muestran las concentraciones más baja y más alta de IgG para la neutralización al 50 por ciento.

n.d.: no determinado

191
192

Tabla 17b: Comparación de las actividades de neutralización al 50 por ciento de los anticuerpos monoclonales probados en diferentes tipos de células

5

10

15

mAb	50 por ciento de actividad neutralizante (microgramos/mililitro)			
	Células de fibroblastos (HFFs)	Células endoteliales (HUVECs)	Células epiteliales (ARPE-19)	Células dendríticas (dependientes del donante)
Ab-47	0.1	0.4	1.0	n.d.
Ab-48	0.3	0.7	n.d.	n.d.
Ab-49	0.5	1.8	n.d.	n.d.
Ab-50	0.2	0.5	1.5	n.d.
C23*	0.2	0.6	0.8	n.d.

*C23 anticuerpo de control; n.d.: no determinado

20

Ejemplo 8: Caracterización del Epítipo de los anticuerpos neutralizantes del citomegalovirus humano (hCMV)

8.1 Ensayo de competición de enlace al epítipo mediante Biacore de anticuerpos novedosos anti-hCMV

25

Para el análisis de competición de enlace al epítipo, se

acoplaron los anticuerpos Ab-02 (18'900 RU), Ab-04 (16'800 RU), y Ab-28 (18'300 RU) a las células de flujo de un chip sensor CM5 por medio de acoplamiento estándar de amina. Se preparó una célula de control de conformidad con lo anterior, utilizando un anticuerpo irrelevante IgG₁ humano (12'500 RU). Antes de los experimentos de enlace, se lavaron minuciosamente las células de flujo con regulador corriente. Se capturó la proteína gB de hCMV sobre los anticuerpos anti-gB inmovilizados durante 180 segundos a una velocidad de flujo de 5 microlitros/minuto a partir del sobrenadante de una línea celular 6-H5 de CHO produciendo gB (lote 080527 KS), la cual contenía aproximadamente 13 microgramos/mililitro de gB. Se aplicaron los anticuerpos secundarios de referencia ITC48 (AD-1 epítipo gB de reconocimiento), ITC52 (AD-1 epítipo gB de reconocimiento), y ITC88 (AD-2 epítipo gB de reconocimiento) en una concentración de 1000nM. Se analizó el enlace en suero regulado con fosfato con albúmina de suero bovino al 0.02 por ciento y Tween 20 al 0.05 por ciento a una velocidad de flujo de 30 microlitros/minuto. Se regeneró la superficie con 10 mM de glicina a un pH de 1.8. Se evaluaron las curvas de enlace utilizando el Software de evaluación Biacore® T100 versión 2.0.1. Los resultados se resumen en la Tabla 18 más adelante en donde '+' indica que el anticuerpo de enlace secundario podría enlazar una proteína gB al mismo que el anticuerpo de captura inmovilizado.

Todos los anticuerpos probados (anticuerpo de captura inmovilizado Ab-02, Ab-04 y Ab-28) parece que se enlazan a los

143
794

epítopos gB que están fuera de los AD-1 y AD-2 epítipo gB reconocido por los anticuerpos de referencia ITC48, ITC52, ITC88, ya que los anticuerpos de referencia fueron capaces de enlazar eficientemente a la proteína gB al mismo tiempo que los anticuerpos probados.

Tabla 18: resumen del mapeo del anticuerpo epítipo mediante Biacore®

	Anticuerpo de Enlace Secundario	ITC88	ITC52	ITC48
10	Anticuerpo de captura inmovilizado			
	Ab-02	+	+	+
15	Ab-04	+	+	+
	Ab-28	+	+	+

8.2 Análisis del epítipo novedoso reconocido por los anticuerpos anti-hCMV

Para investigar adicionalmente si los anticuerpos de la presente invención reconocen o no los dominios antigénicos conocidos en gB, dominio antigénico-1 (AD-1), y dominio antigénico-2 (AD-2), se realizó un ELISA. Con este fin, AD-1 (una proteína de fusión expresada procarióticamente), y AD-2 (un péptido sintético,

pep90, secuencia de aminoácidos: NETIYNTTLKYGDVVG (SEQ ID No: 197), Meyer y colaboradores, 1992) ambos se recubrieron a 1 microgramo/mililitro en placas de ELISA. Se incubaron 50 microlitros de sobrenadante no diluido por pozo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó el ELISA como se describe en el Ejemplo 1 anteriormente. El análisis ELISA reveló que los anticuerpos de la presente invención son específicos para AD-1- ni para AD-2, mediante lo cual se confirma el ensayo de competición de Biacore del Ejemplo 8.1.

10 Con el objeto de identificar positivamente los epítomos reconocidos por los anticuerpos de la presente invención, se construyó un vector de expresión de mamífero que codifica los aminoácidos 100-447 de gB. Esta región comprende todos los aminoácidos entre los epítomos gB AD-1 y AD-2. Se llevó a cabo la transfección transitoria de las células Cos-7 con esta construcción de expresión con Lipofectamina^{MR} 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A las 48 horas después de la transfección, las células se lavaron dos veces con suero regulado con fosfato, se fijaron y se permeabilizaron con metanol frío. Después de lavar con suero regulado con fosfato, las células se incubaron con anticuerpo primario (anticuerpos probados o anticuerpos de control) durante 45 minutos a 37°C en una atmósfera húmeda. Después de otro paso de lavado, se incubaron los porta objetos con IgG anti-humana conjugada con o IgG anti-ratón conjugada con FITC (Jackson ImmunoResearch, EUA) durante

15

20

25

45 minutos a 37°C en una atmósfera húmeda. Después de lavar los porta objetos con suero regulado con fosfato, se aplicaron cubiertas de porta objetos utilizando el DAPI que contiene medio de montaje VECTASHIELD® (LINARIS GmbH, Wertheim-Bettingen, Alemania).

5 Se documentó el enlace de anticuerpo mediante microscopia de fluorescencia (Axioplan 2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena). Se mostró que los anticuerpos monoclonales Ab-02, Ab-04, Ab-28 recombinantes, neutralizantes específicamente reaccionan con la proteína gB truncada que cubre los aminoácidos 100-447 (AD169; SEQ ID NO: 239). Por consiguiente, el dominio de enlace de anticuerpos monoclonales neutralizantes, recombinantes Ab-02, Ab-04, Ab-28 se ha identificado positivamente que se localiza dentro de una región codificada por los aminoácidos 100-447 de gB (numerados de la cepa AD169 de gB; SEQ ID NO: 239). Esto
10 demuestra inequívocamente que los anticuerpos monoclonales Ab-01 a Ab-46 de la presente invención reaccionan con un epítipo antigénico novedoso de la proteína gB y no con epítopos conocidos AD-1 y AD-2 de la proteína gB que son reconocidos por los anticuerpos monoclonales humanos identificados anteriormente en
15 la técnica anterior.
20 la técnica anterior.

8.3: La competición ELISA con anticuerpos anti-hCMV

Con el fin de determinar la competición potencial entre un número de anticuerpos anti-hCMV versus el anticuerpo Ab-50 anti-hCMV para enlazarse a la proteína gB, se realizó un ELISA utilizando
25 un método similar al descrito en el Ejemplo 1. En breve, una dilución

en secuencia de los anticuerpos Ab-47, Ab-48, Ab-49, C23 (control), ITC52 (específico para AD-1), ITC88 (específico para AD-2), 89-104 (específico para gH) o 89-109 (específico para gH) se incubó previamente en suero regulado con fosfato/2 por ciento FCS, con una

5 concentración constante de Ab-50 (0.5ng por pozo; denominado 'Mezcla de Anticuerpos') en una placa de 96-pozos para prevenir el enlace prematuro de gB por cualquiera de anticuerpos investigados. En adición, se prepararon cinco pozos de Ab-50 solo en una concentración de 5ng por pozo para determinar el OD₄₅₀ de Ab-50 sin

10 un anticuerpo de competición potencial. Placas ELISA de 96-pozos (Nunc) se recubrieron con 25ng por pozo de proteína gB en regulador de carbonato, pH de 9.6 durante 16 horas a 4°C. Las placas cubiertas de gB se lavaron tres veces con suero regulado con fosfato complementado con 0.1 por ciento Tween (regulador de

15 lavado de ELISA), y se bloquearon durante 2 horas con suero regulado con fosfato/2 por ciento FCS (regulador de ELISA regulador), y se lava nuevamente tres veces con regulador de lavado de ELISA. Las placas se incubaron luego con 50 microlitros de la mezcla de Anticuerpos diluida en suero regulado con fosfato/2 por

20 ciento FCS durante 1 hora a 37°C. Después de otro paso de lavado, se reveló el enlace de Ab-50 utilizando anticuerpos secundarios específicos anti-λ acoplados con peroxidasa (anticuerpos-online.com). Después de un periodo de incubación de 1 hora, se removió el anticuerpo secundario no enlazado mediante lavado y se

25 determinó la actividad enzimática utilizando reactivo de tetrametil-

bencidina (TMB) en una concentración de 100 microlitros por pozo (1:1 mezcla de sustrato de peroxidasa TMB y solución de peroxidasa B, (KPL, Inc. EUA). Después de la incubación durante 5min a temperatura ambiente, se detuvo la reacción con 100µl 1M de ácido fosfórico por pozo. Se detectó la absorción (densidad óptica (OD)) a 450 nanómetros utilizando un lector de microplacas Emax y el software Softmax Pro 3.0 (Molecular Devices, EUA) se utilizó para el análisis.

En donde existió competición entre los anticuerpos probados y el Ab-50, se observó una reducción de la señal de OD₄₅₀ en cada Mezcla de Anticuerpos cuando se compara con el Ab-50 solo. Adicionalmente, se realizó un ELISA de gB con idénticas concentraciones de IgG con el objeto de visualizar el enlace de todos los anticuerpos probados a gB. Aquí se realizó la detección utilizando anticuerpos secundarios específicos del fragmento Fcγ acoplados con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, EUA). Los resultados se muestran en la Figura 4 y demuestran que Ab-50 compite para enlazarse a la proteína gB con los anticuerpos Ab-47 y Ab-49. No se observó competición entre Ab-48 y Ab-50 (Figura 4a). En adición, no se observó competición para enlazarse a la proteína gB entre Ab-50 y los anticuerpos ITC52 (específico para AD-1), ITC88 (específico para AD-2), 89-104 (específico para gH), 89-109 (específico para gH)-(Figura 4b), indicando que Ab-50 reconoce un diferente epítipo sobre hCMV que estos anticuerpos y por consiguiente, no se enlaza a AD-1 o AD-2 en la proteína gB.

Ejemplo 9: Modelo estructural del citomegalovirus humano
(hCMV) gB

Ya que actualmente no hay información estructural disponible
5 para la proteína gB del hCMV, se generó un modelo tridimensional
de la conformación trimérica del ectodominio del citomegalovirus
humano (hCMV) la cepa AD169 de gB (SEQ ID NO: 239) basado en
la estructura de cristal del HSV-1 gB, el cual más probablemente
representa la conformación de post-fusión (Heldwein y
10 colaboradores, 2006). Este modelo de la estructura de post-fusión
del gB de hCMV fue generado mediante procedimientos de
modelación de homología estándares utilizando el programa
MODELLER (Eswar y colaboradores, 2006), basándose en una
alineación de secuencias con la estructura de plantilla del HSV-1 gB
15 (Heldwein y colaboradores, *ibid*).

La glicoproteína B (gB) es la más conservada de todas las
glicoproteínas de la envoltura del virus de herpes, y las secuencias
de proteínas de HSV-1 y gB de hCMV comparten el 28 por ciento de
identidad y 40 por ciento de similitud. El monómero gB de hCMV
20 consiste en 906 aminoácidos (gB cepa AD169; SEQ ID NO: 239), de
los cuales casi el ectodominio entero (residuos Tyr₈₉ a Val₇₀₀) se
incluye en el modelo (Figura 3). Los dominios individuales I a V, los
cuales se definieron anteriormente basándose en la estructura de
HSV-1 gB, se pueden identificar claramente a partir del modelo de
25 homología del citomegalovirus humano (hCMV) gB. El Dominio I

(Dom I) (Ile₁₃₃ a Thr₃₄₃) constituye parte de la interfase del trímero y se localiza proximal a la membrana. El Dom II discontinuo está compuesto de los residuos Leu₁₂₁ a Asn₁₃₂ y Cys₃₄₄ a Ser₄₃₈ (Figura 3). Los bucles flexibles los cuales comprenden residuos Val₃₀₆ a Glu₃₁₇ y Leu₄₃₉ a His₄₆₈ no se incluyen en el modelo, ya que no son resueltos en la estructura de la plantilla del HSV-1 gB. El Dom III comprende tres segmentos discontinuos, Ser₉₅ a Cys₁₁₁, Asn₄₇₇ a Ser₅₄₉, y Leu₆₃₈ a Ser₆₄₆ (Figura 3). Así como en HSV-1 gB, sus larga hélice α forma, junto con los segmentos respectivos a partir de los otros monómeros, la Forma la interfase del trímero. Dom IV (Tyr₈₉ a Cys₉₄ y Cys₅₅₀ a Asp₆₃₇) se localiza en la parte superior de la molécula y contiene el epítipo AD-1, mientras que el Dom V (Met₆₄₇ a Asp₆₉₈) representa el elemento de puente entre la parte extracelular y la hélice de la transmembrana. La estructura global del monómero del gB de hCMV y también el arreglo de las subunidades en el trímero so por consiguiente, sugeridas para que sean muy similares a las de HSV-1 gB, como se esperaría a partir del grado de similitud de secuencias.

La estructura de cristal del HSV-1 gB se eligió como plantilla para los estudios de modelación, como dos estructuras de cristal de las proteínas gB del HSV-1 (Heldwein y colaboradores, *ibid*), y EBV (Backovic y colaboradores, 2009) ya existen. Estas proteínas exhiben una identidad de secuencia del 30 por ciento y muestran una estructura terciaria muy similar. La identidad de secuencia de la gB del citomegalovirus humano (hCMV) a estas dos proteínas de

200-
201

estructura conocida es del 28 al 33 por ciento, sugiriendo fuertemente que la gB de hCMV también comparte el mismo pliegue tridimensional. Se eligió HSV-1 gB como plantilla de modelación porque la resolución de la estructura del cristal es mucho mejor que la de EBV gB. El modelo resultante de gB del citomegalovirus humano (hCMV) se encontró que exhibe una buena geometría local y no se detectaron choques estéricos. En adición, pares de cisteínas se localizan en distancia de enlace disulfuro, indicando que no solamente las características globales, sino también los detalles estructurales locales fueron reflejados correctamente por el modelo. Este modelo también proporcionó la base para el diseño de una construcción que permitió la expresión de Dom II como una cadena de péptidos continua simple. Para este dominio, el cual es discontinuo en la secuencia de aminoácidos primaria, se designó un enlazador de cinco residuos para conectar las dos partes del dominio como se describe en el Ejemplo 10 más adelante.

Ejemplo 10: Reconocimiento de la proteína gB de hCMV mediante suero humano

Para investigar el Dom I y Dom II para enlazar el anticuerpo, se construyeron los plásmidos de expresión que permitieron la síntesis de cualquiera de los dos dominios en células eucarióticas. En ambos casos la estrategia de clonación involucró la unión de una etiqueta de epítipo HA en la terminal amino del péptido respectivo con el fin de facilitar la detección.

201
202

Ejemplo 10.1: Expresión de la proteína gB de hCMV Dom II y reconocimiento mediante suero humano

Basándose en el modelo estructural del citomegalovirus humano (hCMV) gB, se analizó, si el gB Dom II expresado recombinantemente sería inmunogénico durante una infección natural. Para este fin se construyó un vector de expresión eucariótico que permitió la expresión de Dom II células de mamífero. Dom II es un epítipo discontinuo que es generado por los aminoácidos 121-132 y los aminoácidos 344-438 de la cepa AD169 de gB (SEQ ID NO: 239). Para expresar Dom II, las secuencias de nucleótidos que codifican para los residuos 121-132 y 344-438 específicos para gB se juntaron mediante un tramo de nucleótidos que codifica un enlazador flexible de cinco aminoácidos (Ile-Ala-Gly-Ser-Gly; SEQ ID NO: 319). Esta secuencia de nucleótidos se insertó hacia dentro del vector de expresión pcUL132sigHA, un vector basado en pcDNA3.1 que contiene la secuencia de señales auténtica de la glicoproteína de envoltura gpUL132 del citomegalovirus humano (hCMV) (aminoácidos 1-27; SEQ ID No: 320; Spaderna y colaboradores, 2005), seguida por una etiqueta de epítipo (HA) de hemaglutinina de influenza (YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 321). El Dom II que codifica la secuencia de nucleótidos se insertó corriente abajo de la secuencia de la etiqueta HA utilizando los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI*. La expresión de proteína correcta a partir del plásmido da lugar a una proteína de fusión de Dom II etiquetada HA, la cual es transportada a través del retículo endoplásmico y la red trans-golgi, y, por

consiguiente, apropiadamente modificada por la glicosilación. La región de codificación para el Dom II discontinuo acoplado con enlazador fue sintetizado químicamente (GeneArt, Regensburg, Alemania).

5 Para analizar el péptido Dom II para el reconocimiento del anticuerpo, Dom II se expresó transitoriamente en las células Cos7 células y fue analizado para determinar su reactividad en inmunofluorescencia indirecta utilizando 13 sueros a partir de donantes seropositivos al hCMV seleccionados al azar. Las células
10 Cos7 cultivadas sobre cubiertas de porta objetos de vidrio en placas de 24 pozos fueron transfectadas con 0.8µg del ADN del plásmido de expresión que codifica al Dom II utilizando Lipofectamina (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). 48 horas después de transfección las células se fijaron y permeabilizaron con metanol enfriado con hielo. Los
15 sueros de los pacientes se agregaron entonces as el anticuerpo primario. Los anticuerpos del suero no enlazados se removieron mediante tres pasos de lavado pasos utilizando PBS. El enlace del anticuerpo primario a partir de sueros humanos se detectó con el anticuerpo secundario conjugado con FITC (isotiocianato de
20 fluoresceína) (Dako, Hamburgo, Alemania). Se hizo contra teñido de núcleos celulares con DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol). Se reunieron imágenes utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan 2 adaptado con una cámara de dispositivo acoplado a la carga Visitron Systems (Puchheim, Alemania). Se procesaron las
25 imágenes utilizando MetaView software y Adobe Photoshop.

Anticuerpos: Controles: monoclonal anticuerpo C23 humano específico para gB (TI-23; Meyer y colaboradores, 1990), monoclonal anticuerpo 14-16A murino específico para gN (Mach y colaboradores, 2000), y monoclonal anticuerpo SA4 murino específico para gH (Urban y colaboradores, 1992), murino anti-HA (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), y murino anti-GST (BIOZOL, Eching, Alemania). Un plásmido con expresión total de gB (aminoácidos 1-906) sirvió como control adicional. Aunque todos los sueros mostraron una reacción positiva con el gB entero, solamente cuatro de 13 sueros tiñeron positivo para Dom II. Esto demuestra que Dom II es responsable de inducir anticuerpos durante la infección natural por el citomegalovirus humano (hCMV).

Para probar la frecuencia de que el suero del paciente que contiene anticuerpos dirigidos contra Dom II de gB sobre un panel más grande de sueros humanos y compararlo con la frecuencia de sueros que contienen anticuerpos contra los dominios antigénicos conocidos de gB, AD-1 y AD-2, la secuencia de codificación de Dom II fue expresada bacterianamente como una proteína de fusión GST, se purificó y se usa en ELISA. Los plásmidos para la expresión de las proteínas de fusión de Dom II-GST (Glutathione-S-transferasa) en *E. coli* se generaron utilizando el vector de expresión pGEX-6P-1 (Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania). El DNA del plásmido se utilizó para transformar DH10B de *E. coli* para la expresión de las proteínas de fusión GST. Las respectivas proteínas de fusión fueron inducidas y la forma soluble de la proteína se purificó a partir de

lisados de *E. coli* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para preparar una matriz de afinidad, 2.6mg de proteína de fusión purificada Dom II-GST fue dializada contra un regulador de acoplamiento y conjugada a la Resina de Acoplamiento AminoLink Plus (Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 4 mililitros de una preparación de globulina hiperinmune de hCMV, se diluye 1:3 (volumen/volumen) con suero regulado con fosfato, se pasó sobre 2 mililitros de cuentas acopladas al antígeno, seguida por el lavado extensivo con suero regulado con fosfato. Se eluyó IgG enlazada con 0.2M Glicina-HCl, pH de 3.0, en fracciones de 1 mililitro y las fracciones fueron dializadas contra PBS. Se determinó la concentración total de IgG mediante un ELISA. En breve, placas de poliestireno de 96-pozos se recubrieron con 100 nanogramos de IgG anti-humano de cabra anti-humano AffiniPure, específico para Fc γ (Jackson Immuno Research, West Grove, EUA) en 0.5M de regulador de carbonato, pH 9.6, durante la noche a 4°C. Diluciones en serie log₂ de las fracciones eluidas en un volumen de 50 microlitros se le agregaron y se detectó la IgG enlazada utilizando una IgG anti-humana fragmento monoclonal F (ab)₂ de cabra conjugada con peroxidasa policlonal, específica para Fc γ . (Jackson Immuno Research, West Grove, EUA). Una preparación de IgG humana (Jackson Immuno Research, West Grove, EUA) con concentración conocida se utilizó como norma.

La pureza de la proteína de fusión Dom II-GST fue >90 por ciento estimada a partir del teñido Coomassie de la proteína después

del PAGE. Un total de 80 sueros aleatoriamente seleccionados a partir de individuos seropositivos al hCMV, como se determina mediante una prueba disponible comercialmente, fueron analizados. Diez sueros a partir de donantes negativos a hCMV sirvieron como

5 controles negativos. Dentro del panel de sueros a partir de individuos seropositivos para hCMV la reactividad para gB fue del 100 por ciento, resaltando la alta inmunogenicidad de esta proteína (Figura 5). De acuerdo con nuestras observaciones previas, la reacción positiva con AD-1 de gB también fue del 100 por ciento. 57 por

10 ciento de los sueros contenían anticuerpos contra AD-2 (Schoppel y colaboradores, 1996). La proteína de fusión Dom II fue reconocida por 94 por ciento de los sueros. Por consiguiente, Dom II representa otro dominio muy inmunogénico de gB. Ya que podría usarse como antígeno una proteína de fusión expresada procarióticamente, esto

15 sugeriría que la glicosilación de la proteína no es esencial para el enlace del anticuerpo. Las diferencias en la frecuencia de reconocimiento entre el análisis de inmunofluorescencia es que inicialmente se usaron para el análisis de los anticuerpos que enlazan a Dom II y el ELISA puede deberse a las diferentes

20 sensibilidades de los ensayos.

En aras de la consistencia en nomenclatura de los dominios antigénicos gB, Dom II se designó AD-4.

Ejemplo 10.2: Expresión de la proteína gB de hCMV Dom I con una etiqueta HA y reconocimiento por sueros humanos

25 Para expresar Dom I, la secuencia de nucleótidos que codifica

para los aminoácidos 132-343 de la cepa AD169 de gB (SEQ ID NO: 239) se insertó en el vector de expresión pcUL132sigHA (descrito anteriormente) para generar el vector pcAD-5. Para analizar el péptido Dom I para el reconocimiento de anticuerpo, Dom I se
5 expresó transitoriamente en células Cos7 y se analizó para determinar su reactividad mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando el mismo método que el descrito en el Ejemplo 10.1 anterior.

Los anticuerpos específicos de Dom I en sueros humanos se
10 midieron en un ELISA de captura. Para la producción de anticuerpos recombinantes, células 293T en matraces de 75cm² se transfectaron con 20 microgramos de ADN de plásmido pcAD-5 mediante precipitación de fosfato de calcio. Los matraces se incubaron durante 6 días y entonces las células y sus sobrenadantes se cosecharon.
15 Para el ELISA de captura, se recubrieron placas de ELISA con 125ng/pozo de anticuerpo monoclonal anti-HA de ratón (Sigma), se lava, bloquea y se lava nuevamente, como se describe en el Ejemplo 8.3 anterior, y entonces se incuba con sobrenadante de células transfectadas 293T (que contienen HA-etiquetado Dom I) durante 2
20 horas a 37°C. Luego se enjuagan las placas y se incuban con suero humano en una dilución 1:50 durante 2 horas a 37°C. El anticuerpo no ligado se removió mediante lavado e IgG anti-humana o anti-ratón peroxidasa-conjugada (Dako, Hamburgo, Alemania), se le agregó a una dilución apropiada durante 1 hora. La placa se lavó entonces y
25 100µl de sustrato de peroxidasa de TMB diluido 1:1 en una solución

de sustrato de peroxidasa B (KPL, Inc. EUA), se le agregó durante 5min. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 microlitros 1M H_3PO_4 y se determinó la OD_{450} utilizando un lector de microplacas Emax (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Alemania).

5 Las placas se lavaron y revelaron como se describe en el Ejemplo 10.1 anterior. Todos los anticuerpos se diluyeron en suero regulado con fosfato con 2 por ciento FCS. El enlace de anticuerpos analizado mediante inmunofluorescencia indirecta confirmó que los cuatro anticuerpos probados (Ab-47, Ab-48, Ab-49 y Ab-50) fueron reactivos
10 con el péptido específico para Dom I- (los resultados no se muestran).

Habiendo identificado a Dom I como un nuevo objetivo para los anticuerpos neutralizantes, se volvieron a probar los sobrenadantes del anticuerpo clonal a partir de cuatro individuos para obtener
15 información aproximadamente la frecuencia global de los anticuerpos específicos para Dom I en individuos infectados con hCMV. La frecuencia de memoria específica de Dom I en células-B fue variable entre diferentes donantes; sin embargo el 100 por ciento de los anticuerpos de Dom I (6/6) que fueron probados, mostraron actividad
20 neutralizante (los resultados no se muestran).

Para obtener información sobre la frecuencia de reconocimiento de los anticuerpos Dom I, se determinó la reactividad de los anticuerpos contra Dom I en un panel de sueros más grande de individuos infectados (hCMV) citomegalovirus humano y
25 comparándose con dominios antigénicos conocidos. Como se

describe en el Ejemplo 10.1 anterior, un total de 80 sueros seleccionados al azar a partir de individuos hCMV seropositivos fueron analizados (Figura 5). Dom I fue reconocido por 57 por ciento de los sueros por consiguiente, indicando que este dominio
5 representa un dominio antigénico sobre la proteína gB donde induce anticuerpos con alta frecuencia durante la infección.

En aras de consistencia en nomenclatura de los dominios antigénicos de gB, Dom I fue designado AD-5.

10 Ejemplo 11: Correlación entre la titulación del anticuerpo AD-4 (Dom II) y la capacidad de neutralización en sueros humanos

Datos en la literatura apoyan la hipótesis de que gB es uno de los antígenos dominantes con respecto a la inducción de los anticuerpos neutralizantes durante la infección natural y se ha reportado una correlación entre la titulación de anti-gB y la
15 capacidad de neutralización (Marshall y colaboradores, 1992). No está claro si esta correlación reside en una variedad de diferentes especificidades de anticuerpos dirigidas contra un número de diferentes epítopos o si un número limitado de dominios es responsable. Para investigar si los anticuerpos específicos Ad-4
20 (Dom II) contribuyen significativamente a la capacidad de neutralización global de un suero dado, determinamos la titulación de la neutralización en el panel de sueros y la correlacionamos con la titulación ELISA contra gB, AD-1, AD-2 y AD-4 recombinantes, respectivamente. Las proteínas se diluyeron entre 25ng y 200ng
25 (dependiendo del antígeno) en 0.5M regulador de carbonato de

sodio, pH 9.6, o en 6M urea (AD-1), y 50µl se utilizaron para recubrir placas de microtitulación durante la noche a 4°C. Todos los siguientes pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Los pozos de reacción fueron enjuagados con suero regulado con fosfato complementado con 0.1 por ciento Tween 20 y bloqueados durante 2 horas con suero regulado con fosfato que contiene 2 por ciento de FCS. Se enjuagaron nuevamente las placas con suero regulado con fosfato complementado con 0.1 por ciento Tween 20 y se incubaron con anticuerpos monoclonales, suero humano, reacciones de anticuerpo policlonal eluído o suero de ratón (50µl/pozo) durante 2 horas. El anticuerpo no enlazado se removió mediante lavado e IgG anti-humana o anti-ratón conjugada con peroxidasa (Dako, Hamburgo, Alemania) se le agregó a una dilución apropiada durante 1 hora. La placa se lavó y 100µl de sustrato de peroxidasa tetrametil-bencidina (TMB) diluida 1:1 en solución de sustrato de peroxidasa B (KPL, Inc. EUA), se le agregó durante 5min. La reacción fue detenida mediante la adición de 100µl 1M H₃PO₄ y se determinó OD₄₅₀ utilizando Lector de microplacas Emax (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Alemania). La dilución de todos los anticuerpos se hizo en suero regulado con fosfato con 2 por ciento de FCS. En todos los ensayos que incluyeron las proteínas de fusión gB, se examinó el respectivo compañero de fusión procariótico en paralelo y la densidad óptica sustraída de los valores obtenidos con la proteína de fusión con el gB.

Como se reporta anteriormente, hubo una correlación entre el

210
21

reconocimiento de gB en ELISA y la capacidad de neutralización (Marshall y colaboradores, *ibíd.*). El análisis también mostró una correlación estadísticamente significativa entre la capacidad de neutralización y la titulación de enlace de anticuerpos contra AD-1 y AD-4 (Dom II) pero no AD-2 (Figura 6).

Ejemplo 12: AD-4 (Dom II) induce los anticuerpos neutralizantes de virus durante la infección natural

Para investigar con mayor detalle la cuestión de si AD-4 induce los anticuerpos neutralizantes de virus durante la infección natural usamos dos enfoques: Primero, aislamos anticuerpos policlona anti-AD-4 a partir de una preparación de IgG humana combinada utilizando la proteína de fusión AD-4-GST (Dom II-GST) purificada como matriz de afinidad. Como se esperaba, la preparación de IgG humana contenía anticuerpos reactivos con un número de diferentes glicoproteínas de envoltura específicas para hCMV e un análisis de inmunofluorescencia indirecta después de la expresión transitoria de los respectivos complejos de glicoproteínas en las células Cos-7.

Segundo, probamos los anticuerpos monoclonales humanos específicos para gB que se dan a conocer en esta invención para enlazarse a AD-4. Se encontró que todos los anticuerpos recombinantes se enlazaron a AD-4 en inmunofluorescencia indirecta utilizando la proteína AD-4 transitoriamente expresada en células Cos7. Por consiguiente, AD-4 representa un epítipo conformacional que es reconocido por los anticuerpos monoclonales humanos que se dan a conocer en esta invención.

Para preparar una matriz para el aislamiento de los anticuerpos específicos para AD-4, 2.6mg de la proteína de fusión AD-4-GST purificada se acopla covalentemente con Sepharose y se utiliza para purificar por IgG específica para AD-4 a partir de 4 mililitros de la preparación de IgG humana. Se obtuvo un total de 127µg IgG. Las pruebas ELISA verificaron que la fracción (E3) de IgG purificada por afinidad (E3) mostró enlace específico con AD-4 y gB pero no con AD-1 y AD-2 (Figura 7a). Para excluir además la contaminación con la aminación de los anticuerpos AD-4 purificados por afinidad con anticuerpos dirigidos contra antígenos adicionales relevantes para la neutralización sobre hCMV realizamos análisis de inmunofluorescencia indirecta con células Cos7 que expresan transitoriamente gH o el complejo gM/gN; proteínas de envoltura viral que se sabe que inducen anticuerpos neutralizantes durante la infección natural (Shimamura y colaboradores, 2006; Urban y colaboradores, 1996). La fracción de IgG anti-AD-4 policlonal purificada no contiene anticuerpos detectables específicos contra complejos de envoltura no-gB. Más aún, la fracción de IgG estaba libre de IgM (no mostrado). La preparación de IgG purificada por afinidad (E3) se probó entonces en ensayos de neutralización. Se logró el 50 por ciento neutralización de la ineffectividad del virus en concentraciones de IgG de aproximadamente 0.2 microgramos/mililitro, lo cual está dentro del intervalo de los anticuerpos monoclonales humanos específicos para gB más potentes que se dan a conocer en esta invención (Figura 7b). En

282
273

cambio, la combinación de sueros originales a partir de la cual se derivó la fracción IgG purificada por afinidad mostró el 50 por ciento de neutralización del virus de entrada a aproximadamente 200 microgramos/mililitro IgG (Figura 7b). En resumen, estos datos proporcionan más evidencia de que AD-4 no solamente representa a un dominio inmunogénico de gB, sino que también es el objetivo de los anticuerpos neutralizantes del virus.

Ejemplo 13: Especificidad de enlace de anticuerpos recombinantes humanos

10 13.1: Fina especificidad de enlace de anticuerpos recombinantes humanos con AD-4

El tamaño de AD-4 (>100 aminoácidos) es suficientemente grande para albergar varios epítopos que enlazan anticuerpos. Se ha encontrado cercana proximidad de epítopos que se pueden unir mediante anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes para AD-1 y AD-2 de gB y se han implicado como un mecanismo para evadir neutralización efectiva del virus. Por consiguiente, era de interés obtener más información sobre los epítopos potenciales dentro de AD-4. Intentos iniciales para recortar AD-4 mediante la omisión de los aminoácidos 121-132 en el extremo terminal amino o los últimos cinco aminoácidos en el extremo terminal carboxilo dio como resultado la pérdida completa del enlace del anticuerpo, lo que indica que solamente el dominio completo es capaz de formar la estructura de enlace de anticuerpo. Para identificar los residuos de contacto del anticuerpo potencialmente críticos dentro de AD-4, se construyó un

15
20
25

número (n=17) de plásmidos de expresión eucariótica que expresó péptidos mutantes AD-4, en cada uno de los cuales dos residuos expuestos a la superficie adyacentes fueron cambiados a alanina (Figura 8). La superficie de exposición de los residuos fue
5 identificada del modelo de gB de hCMV como se describe en el Ejemplo 9.

Cuando los anticuerpos monoclonales humanos Ab-11, Ab-14, y Ab-28 se examinaron en inmunofluorescencia indirecta, después de la expresión transitoria de las proteínas AD-4 respectivas, se
10 encontraron dos patrones de reconocimiento. El anticuerpo Ab-28 se enlazó a todas las proteínas mutantes de AD-4, mientras que los anticuerpos restantes no reconocieron a los mutantes en donde los residuos de lisina 378 y 379 fueron intercambiados por alanina. Esto demuestra que AD-4 es reconocido por los anticuerpos
15 recombinantes monoclonales humanos que se dan a conocer en esta memoria descriptiva.

En adición, estos datos indican que la secuencia de di-lisina (K378K379) dentro de AD-4 representa un sitio crítico de enlace de anticuerpo. Sin embargo, es difícil cuantificar las señales obtenidas
20 en inmunofluorescencia indirecta y hubo una posibilidad de que la falta de reacción con el péptido mutante AD-4G sólo estaba reflejando enlace reducido de los anticuerpos por debajo del límite de detección del ensayo. Por consiguiente, para obtener más datos cuantitativos y confirmar los resultados obtenidos por
25 inmunofluorescencia indirecta, cinco de las proteínas mutantes AD-4

se expresaron como proteínas de fusión GST, purificadas y se utilizaron en un ELISA. La pureza de las proteínas de fusión GST fue comparable para todos los péptidos de AD-4 de tipo natural mostrados anteriormente en la Figura 5. Además del mutante AD-4G (K378K379), las proteínas de fusión incluyeron AD-4H (Q380E381), AD-4E (E359D362), y AD-4I (N383S385), los cuales afectan estéricamente los residuos adyacentes, así como el mutante más distantemente localizado AD-4L (N405T406). Los resultados obtenidos por el ELISA estuvieron de acuerdo con los datos de inmunofluorescencia. Con la excepción de AD-4G, las proteínas mutantes fueron reconocidas por los anticuerpos monoclonales con comparable eficiencia. AD-4G sin embargo, solamente fue reconocida por el anticuerpo Ab-28 (Figura 9a). De manera interesante, la fracción IgG purificada por afinidad mostró reactividad similar con todas las proteínas de fusión AD-4 indicando que la mayoría de los anticuerpos enlazan independientemente de la mutación AD-4G (Figura 9b). La preparación de IgG purificada por afinidad se derivó de una combinación de un número desconocido de donantes y, por consiguiente, se esperaba que se promediaran las diferencias individuales en el reconocimiento de los epítomos AD-4.

Para obtener más información de la especificidad potencial del epítomo AD-4, examinamos si dos lisinas en las posiciones 378 y 379 son también residuos importantes para la reactividad con los anticuerpos presentes en sueros humanos individuales. Para este fin, se examinaron los cinco péptidos mutantes AD-4 con el mismo panel

de sueros que lo anterior y se calculó un cociente entre el valor más alto y más bajo de absorbencia para cada suero. Como se puede ver en la Figura 10, la mayoría de los sueros reconocieron a los cinco péptidos AD-4 con similar eficiencia dando como resultado una
5 diferencia máxima baja de 1 a 5 veces. Sin embargo, cinco sueros mostraron diferencias máximas en el intervalo de 10 a 100 veces. De manera interesante, la diferencia se debió a un reconocimiento reducido de la proteína mutante AD-4G con una excepción. El suero con la diferencia máxima más alta mostró enlace reducido con la
10 proteína mutante AD-4H (Q380E381), el cual en el modelo 3D de AD-4 se sitúa en cercana proximidad con el motivo di-lisina en AD-4G (K378K379). Por consiguiente, aunque el enlace de unos pocos sueros mostró una dependencia casi completa en la secuencia del péptido gB original entre 378 y 381, el reconocimiento de AD-4 por
15 sueros humanos individuales fue en gran medida independiente de esta secuencia. En línea con este resultado fue el hallazgo de las fracciones IgG purificadas por afinidad utilizando la proteína mutante AD-4G como antígeno tuvieron un patrón de reconocimiento similar en ELISA de las proteínas mutantes AD-4 y titulación de la
20 neutralización comparable con IgG purificada sobre AD-4 del tipo natural.

13.2: Fina especificidad de enlace de anticuerpos recombinantes humanos con AD-5 (Dom I)

Experimentos similares a los descritos en el Ejemplo 13.1
25 anterior no pudieron ser realizados con AD-5 (Dom I) porque, en

contraste con AD-4, AD-5 no se pliega correctamente después de la expresión procariótica y por consiguiente, no se puede generar antígeno por purificación por afinidad purificación. Sin embargo, fue posible subdividir AD-5 en dos dominios, los cuales fueron probados para determinar el reconocimiento de anticuerpos. Basándose en información estructural, AD-5 fue dividido en Subdominio 1 (AD-5-S1), el cual comprende los aminoácidos 133-144 y 251-343 de la proteína gB AD169 (SEQ ID No: 239), y Subdominio 2 (AD-5-S2), el cual comprende los aminoácidos 140-255 de la proteína gB AD169 (SEQ ID No: 239).

Con el objeto de determinar si los anticuerpos AD-5 descritos en la presente invención reconocieron estos subdominios, se realizó un ELISA de captura como se describe en el Ejemplo 10.2 en donde células 293T fueron transfectadas con subdominios AD-5-S1 y AD-5-S2, así como AD-4 + AD-5. Los anticuerpos Ab-47 a Ab-50 recombinantes de AD-5 se utilizaron para la detección en vez de sueros de pacientes. Los resultados de la inmunofluorescencia indirecta realizada mostró que los anticuerpos Ab-47 y Ab-50 reconocieron a AD-5-S1 (los resultados no se muestran). Los resultados a partir del ELISA de captura se muestran en la Figura 11, y éstos muestran que todos de los anticuerpos Ab-47 a Ab-50 reconocieron gB AD-4 + AD-5 y que los anticuerpos Ab-47, Ab-49 y Ab-50 reconocieron gB AD-5 y en particular AD-5-S1. Ninguno de los anticuerpos Ab-47 a Ab-50 reconocieron gB AD-5 -S2. A partir de estos resultados se puede deducir por consiguiente, que los

217
218

anticuerpos Ab-47, Ab-49 y Ab-50 reconocen un epítipo en la proteína gB que se localiza en AD-5-S1, es decir, dentro de los aminoácidos 133-144 y 251-343 de la proteína gB (cepa AD169; SEQ ID No: 239).

5 Ejemplo 14: Modelo de conformación por fusión previa de gB de hCMV

Dentro de la estructura gB del citomegalovirus humano (hCMV) que fue modelado de acuerdo con HSV-1 gB, se sitúa AD-4 en un montecito en medio de la molécula. El motivo di-lisina es fácilmente
10 accesible en la superficie. En ausencia de datos sobre la orientación de los anticuerpos de enlace AD-4 en el espacio tridimensional se puede predecir que el enlace de anticuerpo en esta conformación de proteína puede influenciar la interacción de gB con proteínas vecinas. Para varios virus de herpes, incluyendo hCMV, se sabe que
15 gB necesita interactuar con glicoproteínas de envoltura adicionales con el objeto de funcionar adecuadamente durante el proceso de fusión (Avitabile y colaboradores, 2009; Patrone y colaboradores, 2007). Más probablemente, sin embargo, la HSV-1 gB representa la conformación de post-fusión. Este supuesto se basa en la homología
20 estructural de la HSV-1 gB al VSV-G para lo que las estructuras tanto pre- como post-fusión previa están disponibles (Roche y colaboradores, 2006 y 2007). Se piensa que la forma de fusión previa es prevaeciente sobre el virión, mientras que la fusión posterior reside principalmente en algún, todavía indefinido,
25 compartimiento celular. Los anticuerpos específicos para AD-4

aparentemente pueden reconocer ambas conformaciones de gB ya que se enlazan a formas celulares así como virales de gB. Ya que para VSV-G las formas de pre- y post-fusión muestran reconfiguraciones estructurales extensas de dominios de proteína individuales, modelamos la forma de fusión previa de gB del citomegalovirus humano (hCMV) con el objeto de obtener mayor percepción de la localización potencial de AD-4 dentro del trimero de la fusión previa y la posición de los residuos que son importantes para el enlace de anticuerpos.

Se tomaron dominios gB de hCMV simples I, II, III y IV a partir del modelo de la fusión posterior, y se sobrepusieron sobre la estructura de la fusión previa de VSV-G (Roche y colaboradores, 2007) utilizando el algoritmo MultiProt (Shatsky y colaboradores, 2004). El gB de hCMV dominio V y los residuos Leu469 a Arg496 del dominio III fueron excluidos, ya que ellos no son globulares y no hay estructuras equivalentes presentes en la plantilla de VSV-G. Los bucles de conexión entre los dominios ajustados individualmente fueron modelados con ModLoop (Fiser y colaboradores, 2003). El modelo de fusión previa trimérica se obtuvo mediante la aplicación de la geometría de fusión previa de VSV-G.

Aunque la conformación de la fusión posterior de gB de hCMV se puede modelar fácilmente basándose en la estructura de cristales homóloga de HSV-gB, no hay información estructural experimental todavía disponible para la conformación de perfusión de esta familia de moléculas. A partir de las dos conformaciones de VSV-G, se sabe

que los dominios de proteína individuales mantienen sus pliegues pero el arreglo relativo de los dominios cambia drásticamente después de la transición entre el estado de pre-fusión y post-fusión. Con el objeto de obtener más percepciones dentro de la localización potencial de AD-4 dentro del trímero de la fusión previa y de la posición de los residuos, lo cual es importante para el enlace de los anticuerpos, se creó un modelo hipotético de la conformación de la fusión previa de gB de hCMV. Para este fin, se obtuvieron los pliegues de dominio individuales a partir del modelo de fusión posterior y la información empleada sobre el arreglo del dominio a partir de la estructura de fusión previa de la glicoproteína G a partir de VSV-G (Roche y colaboradores, ibíd.). El modelo resultante no exhibe choques estéricos y las secuencias de unión son suficientemente largas para conectar los dominios en esta geometría alternativa sugiriendo que este arreglo de dominio es estructuralmente factible en gB de hCMV. El arreglo de dominio de la estructura de fusión previa de gB de hCMV es muy parecida a la del modelo previo de la conformación de perfusión de EBV gB que se generó basándose en la estructura de cristal post-fusión respectiva (Backovic y colaboradores, 2009).

Una diferencia clave entre la conformación de pre-fusión y post-fusión de gB de hCMV se encuentra en la composición de la parte apical de la proteína. En la conformación post-fusión esta región se forma mediante el dominio IV, en donde se localiza AD-1. En contraste, en modelo de pre-fusión Dom II/AD-4 se sitúa en la

parte superior de la molécula, con el motivo di-lisina (Lys378, Lys379) localizado en una posición central sobre la superficie apical de Dom II/AD-4. Por consiguiente, la organización espacial de las moléculas de IgG enlazadas a la forma de pre-fusión de gB
5 probablemente será diferente a la forma de post-fusión y podrá interferir con el enlace de gB a los componentes de la célula objetivo. Aparte de bloquear las interacciones con las moléculas no-gB, las moléculas de IgG enlazadas a Dom II/AD-4 también podrían ser caces de restringir los cambios de conformación dentro de la
10 proteína que podrían ser necesarias para la función adecuada.

Ejemplo 15: Ensayos de neutralización en la presencia de sueros humanos

En un escenario clínico, los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar de una manera profiláctica o
15 terapéutica por medio de infusión intravenosa. Por consiguiente, es necesario excluir la posibilidad de que la función del anticuerpo se deteriore por la presencia de anticuerpos en el suero humano. Tres tipos diferentes de sueros se examinaron: suero negativo para los anticuerpos específicos para el citomegalovirus humano (hCMV),
20 suero positivo los anticuerpos específicos para el citomegalovirus humano (hCMV) e Intratect® (Biotest AG), una preparación de suero hCMV enriquecida con anticuerpos específicos para CMV. Primero se determinó por titulación la concentración de IgG y la actividad neutralizante del 50 por ciento de cada suero analizado. Dicho de
25 una manera breve, placas de ELISA se recubrieron con anticuerpo

222

atrapador específico del fragmento Fcy de IgG anti-humano, (Jackson ImmunoResearch, EUA). Diluciones en serie de dos-veces de sueros en regulador de ELISA se compararon con un estándar de IgG de concentración conocida (Jackson ImmunoResearch, EUA). La
5 concentración de IgG se calculó usando el software de ELISA Softmax Pro 3.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Se determinó el 50 por ciento de actividades de neutralización de los sueros realizando un ensayo de neutralización basado en luciferasa como se describe anteriormente en el Ejemplo 2.

10 En seguida, en un ensayo de neutralización competitiva como se describió anteriormente en el Ejemplo 2, se tituló el anticuerpo Ab-28 de tal manera que cruzaría la marca del 50 por ciento de neutralización, antes de la adición de suero a una concentración constante. Se añadieron sueros que fueran cualquiera de negativos o
15 positivos para los anticuerpos específicos para el citomegalovirus humano (hCMV e Intratect® al anticuerpo Ab-28 titulado a una concentración constante alrededor de su respectivo 50 por ciento-de actividad neutralizante. Como se muestra en la Figura 12, pareció no haber inhibición de la potencia neutralizante de Ab-28 por los
20 anticuerpos de los sueros. Después de agregar suero negativo para hCMV al anticuerpo Ab-28 titulado, la curva se veía idéntica a la curva de Ab-28 solo. Este resultado indica que no hay un reactivo inespecífico en el suero humano que pudiera dañar la capacidad neutralizante de Ab-28. Al añadir suero positivo para hCMV o
25 Intratect® al Ab-28, se observó un realce en la actividad neutralizante

de Ab-28 y del suero. La actividad neutralizante del suero se incrementó en aproximadamente 20-40 por ciento en la presencia de Ab-28 y la capacidad neutralizante de Ab-28 se incrementó aproximadamente 15 por ciento después de la adición de suero
5 positivo para hCMV o Intratect®.

Ejemplo 16: Ensayo de neutralización post-adsorción

Con el fin de determinar si los anticuerpos de la presente invención podrían bloquear una etapa temprana de penetración del virus en las células, realizamos un ensayo de neutralización post-
10 adsorción. El método del ensayo de neutralización fue similar al descrito en el Ejemplo 2; sin embargo inicialmente HFFs y hCMV que expresa luciferasa se incubaron durante 1 hora a 4°C para permitir sólo la adsorción del virus pero no la fusión del virus- y la membrana celular. Después de este periodo de adsorción, el virus no adsorbido
15 se desechó lavándolo con 1xPBS. Los anticuerpos se titularon a partir de concentraciones muy altas de IgG de 150 microgramos/mililitro a 5 microgramos/mililitro en una placa separada y entonces se agrega a las mezclas de virus-células pre-adsorbidas. Los anticuerpos Ab-02, Ab-28, Ab-04 y un anticuerpo de control C23
20 (T123; una generosa donación de Teijin Pharma Limited, Japón) se utilizaron para este experimento y cada anticuerpo se incubó durante 30, 80 ó 120min a 4°C con las mezclas de virus-células pre-adsorbidas. Se ha demostrado que el anticuerpo C23 específico para AD-2 inhibe la penetración del virus en las células (Ohizumi y
25 colaboradores, 1992). Después de los periodos de incubación de 30,

80 ó 120 minutos, se lavaron las placas una vez más y entonces se incubaron durante 48 horas a 37°C. A partir de este punto en adelante, el ensayo se continuó como el del Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Figura 13 y se resumen como sigue.

- 5 Después de un periodo de incubación de 30 minutos, cuando menos 100 microgramos/mililitro de cada anticuerpo se requirió que lograra el 50 por ciento de reducción de infectividad del virus. C23, por otra parte, pareció inhibir la penetración del virus incluso en concentraciones muy bajas de 5 microgramos/mililitro después de
- 10 una incubación de 30 minutos. Después de 80 minutos solamente 20 microgramos/mililitro de Ab-02 y Ab-28 se necesitaron para el 50 por ciento de neutralización. Para Ab-04 sin embargo, se requirieron 55 microgramos/mililitro para neutralizar la infectividad del virus en 50 por ciento. La curva de 80 minutos del anticuerpo de control C23 no
- 15 mostró el resultado esperado. Se esperaba que este anticuerpo fuera cuando menos tan bueno, si no es que mejor, después de un tiempo de incubación más largo. También, los errores estándar de la media fueron muy dispersos para C23 en el periodo de incubación 80 minutos y por consiguiente, este punto de tiempo fue excluido de los
- 20 resultados. Cuando se incubó el virus pre adsorbido con los anticuerpos durante 120 minutos solamente alrededor de 5-15 microgramos/mililitro de cada anticuerpo o C23 se requiere para una reducción del 50 por ciento de la infectividad viral. En conclusión, los anticuerpos Ab-02, Ab-28 y Ab-04 son capaces de prevenir la
- 25 penetración de los virus ya adsorbidos en las células.

224
225

Ejemplo 17: Ensayos de neutralización competitiva con otros anticuerpos específicos para gB

Se ha reportado la competición por el enlace del epítipo gB entre anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes para los anticuerpos específicos para AD-1 (Ohlin y colaboradores, 1993).
5 Para investigar los posibles efectos competitivos o hasta sinérgicos entre los anticuerpos de la presente invención y otros anticuerpos específicos para gB, se llevaron a cabo ensayos de neutralización competitiva para determinar el efecto de los anticuerpos específicos para AD-1 (ITC52), y AD-2 (ITC88) anticuerpos sobre la actividad
10 neutralizante de los anticuerpos de la presente invención. Para hacer esto, se tituló un anticuerpo y se añadió el otro anticuerpo a una concentración constante aproximada al 50 por ciento de su actividad neutralizante. Estos ensayos de neutralización competitiva se
15 llevaron a cabo con cada uno de los anticuerpos: Ab-11, Ab-14, Ab-19, Ab-28, Ab-04, Ab-42. Se compararon dos enfoques diferentes en donde se tituló el anticuerpo de prueba y se agregaron ITC52 ó ITC88 a una concentración constante o los anticuerpos ITC se titularon y el anticuerpo de prueba anticuerpo se agregó a una
20 concentración constante. Ya que ITC52 es un anticuerpo no neutralizante, se agregó en una concentración de 3 microgramos/mililitro, la misma concentración a la cual se le agregó el anticuerpo neutralizante ITC88. Solamente se muestran los datos para Ab-28, ya que los demás anticuerpos probados se comportaron de una
25 manera similar. También, se muestra solamente un enfoque, es

225
226

decir, dejando Ab-28 a una concentración constante y titulando el anticuerpo ITC, porque el enfoque alternativo mostró resultados comparables (Figura 14).

Los resultados indican que parece haber una leve dificultad de actividad neutralizante de Ab-28 en la presencia de una concentración alta del anticuerpo ITC52 específico para AD1. Se observó este efecto para cada anticuerpo probado y se ha reproducido en otro experimento independiente (los datos no se muestran). Sin embargo, una concentración alta de ITC52 parece no disminuir la actividad de neutralización de ITC88. Ab-28 e ITC88 juntos dieron como resultado una actividad de neutralización mejorada. Esto es visible en particular en el segundo punto de datos de ITC88 solo al contrario de cuando se mezcla. Se observa en este punto un aumento del 40 por ciento de la actividad neutralizante de ITC88 ante la presencia de Ab-28 mostrando el Ab-28 un aumento en la neutralización de aproximadamente el 15 por ciento con ITC88 que solo.

En adición al experimento anterior que analiza los efectos inhibidores, aditivos o sinérgicos potenciales entre diferentes anticuerpos específicos para AD-4 y específicos para AD-1 o AD-2, también investigamos si se podrían observar efectos similares entre los anticuerpos específicos para AD-4 (Dom II), y AD-5 (Dom I). Ab-28 (específico para AD-4) se mezcló con cualquiera de Ab-50 ó Ab-49 (específico para AD-5) en una proporción de 50:50 en primer pozo y continuó con 1:2 diluciones en serie antes de agregar hCMV con

226
228

expresión de luciferasa. Las actividades neutralizantes de estas mezclas de anticuerpos se compararon con las titulaciones simples de los anticuerpos respectivos (Figura 15). Solamente se observó un ligero efecto entre los anticuerpos específicos para AD-4 y AD-5 sin efectos inhibidores o sinérgicos. Se repitió este experimento en otras dos ocasiones con resultados comparables (los datos no se muestran).

Tabla 19: Compendio de los números de las SEQ ID en el Listado de Secuencias acompañante, para CDRs de cadena pesada y ligera de los anticuerpos neutralizantes mostrados en las Tablas 7 y 13 anteriores.

Anti-cuerpo	SEQ ID NO:					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDR11	CDR12	CDR13
Ab-01	38	39	40	103	104	105
Ab-02	8	9	10	98	99	100
Ab-03	3	4	5	118	119	120
Ab-04	13	14	15	103	104	105
Ab-05	38	39	40	123	124	125
Ab-06	43	44	45	128	129	130
Ab-07	53	54	55	133	134	135

5
10
15
20
25

228
229

5

10

15

20

25

Anti- cuerpo	SEQ ID NO:					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDR11	CDR12	CDR13
Ab-23	8	9	10	163	164	165
Ab-24	8	9	10	168	169	170
Ab-25	8	9	10	158	159	160
Ab-26	8	9	10	128	129	130
Ab-27	43	44	45	108	109	110
Ab-28	3	4	5	93	94	95
Ab-29	48	49	50	93	94	95
Ab-30	3	4	5	143	144	145
Ab-31	53	54	55	118	119	120
Ab-32	3	4	5	133	134	135
Ab-33	13	14	15	173	174	175
Ab-34	38	39	40	173	174	175
Ab-35	73	74	75	103	104	105
Ab-36	73	74	75	173	174	175
Ab-37	13	14	15	123	124	125

5
10
15
20
25

Tabla 20a

[illegible]

231
232

Tabla 20b

5

10

15

20

25

	LCDR1														LCDR2												LCDR3															
Kabat No.	24	25	26	27	27A	27B	28	29	30	31	32	33	34	50	51	52	53	54	55	56	89	90	91	92	93	94	95	95A	95B	96	97											
Ab28	S	G	S	S	S	N	I	G	K	N	Y	V	S	D	N	N	K	R	P	S	G	T	P	D	R	S	L	S	-	V	I											
Ab02				R																			W		S						V											
Ab04																					A		W		S			G			V											
Ab11																							W		S						V											
Ab14																					A		W								V											
Ab42																							W		S						V											
Ab46																							W		S						V											
Ab03																															V											
Ab01																					A		W		S			G			V											
Ab20				R																			W		S						V											
Ab27																							W		S						V											
Ab10																															V											
Ab31																															V											
Ab12																							W		S						V											
Ab13																							W		S						V											
Ab35																					A		W		S			G			V											
Ab43																							W		S						V											
Ab44																							W		S						V											
Ab29																																										
Ab45																							W		S						V											
Ab32																															V											
Ab30																															V											
Ab26				R																			W		S						V											
Ab08				R																			W		S						V											
Ab37																					A		W		S			G			V											
Ab15																			P		A		W								V											
Ab05																					A		W		S			G			V											
Ab06				R																			W		S						V											
Ab22				R																			W		S						V											
Ab07																															V											
Ab09																															V											
Ab17																			P		A		W								V											
Ab38																					A		W		S			G			V											
Ab25				R																			W		S						V											
Ab23				R																			W		S	D			A	Y	V											
Ab24				R																			W		S						V											
Ab33			N																		A		W		S			G			V											
Ab39																					A		W		S			G			V											
Ab34			N																		A		W		S			G			V											
Ab40																					A		W		S			G			V											
Ab18				R																			W		S						V											
Ab19				R																			W		S	D			A	Y	V											
Ab21				R																			W		S						V											
Ab16																					A		W								V											
Ab36			N																		A		W		S			G			V											
Ab41																					A		W		S			G			V											

Secuencias

Se muestran el dominio V_H, el dominio V_L y las secuencias de CDR de los miembros enlazadores en el listado de secuencias adjunto, en donde las SEQ ID NOS corresponden como sigue:

5	1	SM5-1 V _H nucleótidos
	2	SM5-1 V _H aminoácidos
	3	SM5-1 V _H CDR 1 aminoácidos
	4	SM5-1 V _H CDR 2 aminoácidos
	5	SM5-1 V _H CDR 3 aminoácidos
10	6	SM4-10 V _H nucleótidos
	7	SM4-10 V _H aminoácidos
	8	SM4-10 V _H CDR 1 aminoácidos
	9	SM4-10 V _H CDR 2 aminoácidos
	10	SM4-10 V _H CDR 3 aminoácidos
15	11	SM6-5 V _H nucleótidos
	12	SM6-5 V _H aminoácidos
	13	SM6-5 V _H CDR 1 aminoácidos
	14	SM6-5 V _H CDR 2 aminoácidos
	15	SM6-5 V _H CDR 3 aminoácidos
20	16	SM1-6 V _H nucleótidos
	17	SM1-6 V _H aminoácidos
	18	SM1-6 V _H CDR 1 aminoácidos
	19	SM1-6 V _H CDR 2 aminoácidos
	20	SM1-6 V _H CDR 3 aminoácidos
25	21	SM3-1 V _H nucleótidos

223
274
21

	22	SM3-1 VH aminoácidos
	23	SM3-1 VH CDR 1 aminoácidos
	24	SM3-1 VH CDR 2 aminoácidos
	25	SM3-1 VH CDR 3 aminoácidos
5	26	SM11-17 VH nucleótidos
	27	SM11-17 VH aminoácidos
	28	SM11-17 VH CDR 1 aminoácidos
	29	SM11-17 VH CDR 2 aminoácidos
	30	SM11-17 VH CDR 3 aminoácidos
10	31	SM11-21 VH nucleótidos
	32	SM11-21 VH aminoácidos
	33	SM11-21 VH CDR 1 aminoácidos
	34	SM11-21 VH CDR 2 aminoácidos
	35	SM11-21 VH CDR 3 aminoácidos
15	36	SM6-11 VH nucleótidos
	37	SM6-11 VH aminoácidos
	38	SM6-11 VH CDR 1 aminoácidos
	39	SM6-11 VH CDR 2 aminoácidos
	40	SM6-11 VH CDR 3 aminoácidos
20	41	SM4-3 VH nucleótidos
	42	SM4-3 VH aminoácidos
	43	SM4-3 VH CDR 1 aminoácidos
	44	SM4-3 VH CDR 2 aminoácidos
	45	SM4-3 VH CDR 3 aminoácidos
25	46	SM5-3 VH nucleótidos

235

	47	SM5-3 VH aminoácidos
	48	SM5-3 VH CDR 1 aminoácidos
	49	SM5-3 VH CDR 2 aminoácidos
	50	SM5-3 VH CDR 3 aminoácidos
5	51	SM5-9 VH nucleótidos
	52	SM5-9 VH aminoácidos
	53	SM5-9 VH CDR 1 aminoácidos
	54	SM5-9 VH CDR 2 aminoácidos
	55	SM5-9 VH CDR 3 aminoácidos
10	56	SM1-7 VH nucleótidos
	57	SM1-7 VH aminoácidos
	58	SM1-7 VH CDR 1 aminoácidos
	59	SM1-7 VH CDR 2 aminoácidos
	60	SM1-7 VH CDR 3 aminoácidos
15	61	SM1-8 VH nucleótidos
	62	SM1-8 VH aminoácidos
	63	SM1-8 VH CDR 1 aminoácidos
	64	SM1-8 VH CDR 2 aminoácidos
	65	SM1-8 VH CDR 3 aminoácidos
20	66	SM3-4 VH nucleótidos
	67	SM3-4 VH aminoácidos
	68	SM3-4 VH CDR 1 aminoácidos
	69	SM3-4 VH CDR 2 aminoácidos
	70	SM3-4 VH CDR 3 aminoácidos
25	71	SM6-23 VH nucleótidos

	72	SM6-23 VH aminoácidos
	73	SM6-23 VH CDR 1 aminoácidos
	74	SM6-23 VH CDR 2 aminoácidos
	75	SM6-23 VH CDR 3 aminoácidos
5	76	SM11-18 VH nucleótidos
	77	SM11-18 VH aminoácidos
	78	SM11-18 VH CDR 1 aminoácidos
	79	SM11-18 VH CDR 2 aminoácidos
	80	SM11-18 VH CDR 3 aminoácidos
10	81	SM11-19 VH nucleótidos
	82	SM11-19 VH aminoácidos
	83	SM11-19 VH CDR 1 aminoácidos
	84	SM11-19 VH CDR 2 aminoácidos
	85	SM11-19 VH CDR 3 aminoácidos
15	86	SM11-20 VH nucleótidos
	87	SM11-20 VH aminoácidos
	88	SM11-20 VH CDR 1 aminoácidos
	89	SM11-20 VH CDR 2 aminoácidos
	90	SM11-20 VH CDR 3 aminoácidos
20	91	SM5-1 VL nucleótidos
	92	SM5-1 VL aminoácidos
	93	SM5-1 VL CDR 1 aminoácidos
	94	SM5-1 VL CDR 2 aminoácidos
	95	SM5-1 VL CDR 3 aminoácidos
25	96	SM4-10 VL nucleótidos

256
23X

	97	SM4-10 VL aminoácidos
	98	SM4-10 VL CDR 1 aminoácidos
	99	SM4-10 VL CDR 2 aminoácidos
	100	SM4-10 VL CDR 3 aminoácidos
5	101	SM6-5 VL nucleótidos
	102	SM6-5 VL aminoácidos
	103	SM6-5 VL CDR 1 aminoácidos
	104	SM6-5 VL CDR 2 aminoácidos
	105	SM6-5 VL CDR 3 aminoácidos
10	106	SM1-6 VL nucleótidos
	107	SM1-6 VL aminoácidos
	108	SM1-6 VL CDR 1 aminoácidos
	109	SM1-6 VL CDR 2 aminoácidos
	110	SM1-6 VL CDR 3 aminoácidos
15	111	SM3-1 VL nucleótidos
	112	SM3-1 VL aminoácidos
	113	SM3-1 VL CDR 1 aminoácidos
	114	SM3-1 VL CDR 2 aminoácidos
	115	SM3-1 VL CDR 3 aminoácidos
20	116	SM5-6 VL nucleótidos
	117	SM5-6 VL aminoácidos
	118	SM5-6 VL CDR 1 aminoácidos
	119	SM5-6 VL CDR 2 aminoácidos
	120	SM5-6 VL CDR 3 aminoácidos
25	121	SM6-48 VH nucleótidos

	122	SM6-48 VH aminoácidos
	123	SM6-48 VH CDR 1 aminoácidos
	124	SM6-48 VH CDR 2 aminoácidos
	125	SM6-48 VH CDR 3 aminoácidos
5	126	SM4-3 VL nucleótidos
	127	SM4-3 VL aminoácidos
	128	SM4-3 VL CDR 1 aminoácidos
	129	SM4-3 VL CDR 2 aminoácidos
	130	SM4-3 VL CDR 3 aminoácidos
10	131	SM5-9 VL nucleótidos
	132	SM5-9 VL aminoácidos
	133	SM5-9 VL CDR 1 aminoácidos
	134	SM5-9 VL CDR 2 aminoácidos
	135	SM5-9 VL CDR 3 aminoácidos
15	136	SM4-12 VL nucleótidos
	137	SM4-12 VL aminoácidos
	138	SM4-12 VL CDR 1 aminoácidos
	139	SM4-12 VL CDR 2 aminoácidos
	140	SM4-12 VL CDR 3 aminoácidos
20	141	SM5-5 VL nucleótidos
	142	SM5-5 VL aminoácidos
	143	SM5-5 VL CDR 1 aminoácidos
	144	SM5-5 VL CDR 2 aminoácidos
	145	SM5-5 VL CDR 3 aminoácidos
25	146	SM3-2 VL nucleótidos

	147	SM3-2 VL aminoácidos
	148	SM3-2 VL CDR 1 aminoácidos
	149	SM3-2 VL CDR 2 aminoácidos
	150	SM3-2 VL CDR 3 aminoácidos
5	151	SM3-4 VL nucleótidos
	152	SM3-4 VL aminoácidos
	153	SM3-4 VL CDR 1 aminoácidos
	154	SM3-4 VL CDR 2 aminoácidos
	155	SM3-4 VL CDR 3 aminoácidos
10	156	SM4-1 VL nucleótidos
	157	SM4-1 VL aminoácidos
	158	SM4-1 VL CDR 1 aminoácidos
	159	SM4-1 VL CDR 2 aminoácidos
	160	SM4-1 VL CDR 3 aminoácidos
15	161	SM4-5 VL nucleótidos
	162	SM4-5 VL aminoácidos
	163	SM4-5 VL CDR 1 aminoácidos
	164	SM4-5 VL CDR 2 aminoácidos
	165	SM4-5 VL CDR 3 aminoácidos
20	166	SM4-7 VL nucleótidos
	167	SM4-7 VL aminoácidos
	168	SM4-7 VL CDR 1 aminoácidos
	169	SM4-7 VL CDR 2 aminoácidos
	170	SM4-7 VL CDR 3 aminoácidos
25	171	SM6-6 VL nucleótidos

239
240

	172	SM6-6 VL aminoácidos
	173	SM6-6 VL CDR 1 aminoácidos
	174	SM6-6 VL CDR 2 aminoácidos
	175	SM6-6 VL CDR 3 aminoácidos
5	176	SM6-51 VL nucleótidos
	177	SM6-51 VL aminoácidos
	178	SM6-51 VL CDR 1 aminoácidos
	179	SM6-51 VL CDR 2 aminoácidos
	180	SM6-51 VL CDR 3 aminoácidos
10	181	VH FWR1
	182	VH FWR3
	183	VH FWR3 (*02,*03,*04)
	184	VH FWR4 (*01)
	185	VL FWR1
15	186	VL FWR2
	187	VL FWR3
	188	IGHJ6*02 aminoácidos
	189	IGHJ3*02 aminoácidos
	190	IGHJ5*01 aminoácidos
20	191	IGHJ5*02 aminoácidos
	192	IGLJ1*01 aminoácidos
	193	IGLJ2*01 aminoácidos
	194	IGLJ3*01 aminoácidos
	195	IGLG3*02 aminoácidos
25	196	Cebador 179-Je

	197	Péptido sintético
	198	Cebador 074-Je
	199	Cebador 075-Je
	200	Cebador 076-Je
5	201	Cebador 150-Je
	202	Cebador 151-Je
	203	Cebador 077-Je
	204	Cebador 078-Je
	205	Cebador 007-Je
10	206	Cebador 152-Je
	207	Cebador 153-Je
	208	Cebador 066-Je
	209	Cebador 067-Je
	210	Cebador 068-Je
15	211	Cebador 069-Je
	212	Cebador 070-Je
	213	Cebador 258-Je
	214	Cebador 259-Je
	215	Cebador 260-Je
20	216	Cebador 261-Je
	217	Cebador 262-Je
	218	Cebador 263-Je
	219	Cebador 264-Je
	220	Cebador 265-Je
25	221	Cebador 266-Je

241
242

	222	Cebador 267-Je
	223	Cebador 84-B
	224	Cebador 155-Je
	225	Cebador 85-B
5	226	Cebador 161-Je
	227	Cebador 162-Je
	228	Cebador 154-Je
	229	Cebador 001-Je
	230	Cebador 158-Je
10	231	Cebador 003-Je
	232	Cebador 159-Je
	233	Cebador 156-Je
	234	Cebador 157-Je
	235	Cebador 062-Je
15	236	Cebador 063-Je
	237	Cebador 065-Je
	238	Cebador 064-Je
	239	gB Cepa AD169
	240	gB cepa Towne
20	241	SM10 V _H nucleótidos
	242	SM10 V _H aminoácidos
	243	SM10 V _H CDR 1 aminoácidos
	244	SM10 V _H CDR 2 aminoácidos
	245	SM10 V _H CDR 3 aminoácidos
25	246	SM12 V _H nucleótidos

242
243

	247	SM12 V _H aminoácidos
	248	SM12 V _H CDR 1 aminoácidos
	249	SM12 V _H CDR 2 aminoácidos
	250	SM12 V _H CDR 3 aminoácidos
5	251	2C2 V _H nucleótidos
	252	2C2 V _H aminoácidos
	253	2C2 V _H CDR 1 aminoácidos
	254	2C2 V _H CDR 2 aminoácidos
	255	2C2 V _H CDR 3 aminoácidos
10	256	1G2 V _H nucleótidos
	257	1G2 V _H aminoácidos
	258	1G2 V _H CDR 1 aminoácidos
	259	1G2 V _H CDR 2 aminoácidos
	260	1G2 V _H CDR 3 aminoácidos
15	261	SM10 V _L nucleótidos
	262	SM10 V _L aminoácidos
	263	SM10 V _L CDR 1 aminoácidos
	264	SM10 V _L CDR 2 aminoácidos
	265	SM10 V _L CDR 3 aminoácidos
20	266	SM12 V _L nucleótidos
	267	SM12 V _L aminoácidos
	268	SM12 V _L CDR 1 aminoácidos
	269	SM12 V _L CDR 2 aminoácidos
	270	SM12 V _L CDR 3 aminoácidos
25	271	2C2 V _L nucleótidos

238
244

	272	2C2 V _L aminoácidos
	273	2C2 V _L CDR 1 aminoácidos
	274	2C2 V _L CDR 2 aminoácidos
	275	2C2 V _L CDR 3 aminoácidos
5	276	1G2 V _L nucleótidos
	277	1G2 V _L aminoácidos
	278	1G2 V _L CDR 1 aminoácidos
	279	1G2 V _L CDR 2 aminoácidos
	280	1G2 V _L CDR 3 aminoácidos
10	281	IGHV4-39 FWR1
	282	IGHV4-39 FWR2
	283	IGHV4-39 FWR3
	284	IGHV4-59 FWR1
	285	IGHV4-59 FWR2
15	286	IGHV4-59 FWR3
	287	IGKV2D-28 FWR1
	288	IGKV2D-28 FWR2
	289	IGKV2D-28 FWR3
	290	IGKV1D-33 FWR1
20	291	IGKV1D-33 FWR2
	292	IGKV1D-33 FWR3
	293	IGLV1-47 FW1
	294	IGLV1-47 FW2
	295	IGLV1-47 FW3
25	296	Cebador 5'Ig L VH 4/6

284
245

	297	Cebador 5'Ig L Vk 1/2
	298	Cebador 5'Ig L Vλ 3
	299	Cebador 5'Ig L Vλ 1
	300	Cebador 3'Ig Cy CH 1
5	301	Cebador 3'Ig Ck 543
	302	Cebador 3'Ig Cλ cadena
	303	Cebador 5'Ig Agel VH4
	304	Cebador 5'Ig Agel Vk 2-24
	305	Cebador 5'Ig Agel Vk 2-28
10	306	Cebador 5'Ig Agel Vλ 3
	307	Cebador 5'Ig Agel Vk 1-5
	308	Cebador 5'Ig Agel VH 4-39
	309	Cebador 5'Ig Agel Vλ 1
	310	Cebador 3'Ig Sall JH
15	311	Cebador 3'Ig BsiWI Jk 2
	312	Cebador 3'Ig Sall JH 6
	313	Cebador 3'Ig Bsi WIJk 1/4
	314	Cebador 3'Ig XhoI Cλ
	315	Cebador 5' Ausente
20	316	Cebador 3'IgG Interno
	317	Cebador 3'Ck494
	318	Cebador 3'Cλ
	319	Enlazador sintético
	320	gpUL132 Secuencia de señal
25	321	HA marca de epítopo

246

Referencias

Todas las referencias citadas en donde sea en esta memoria descriptiva, incluyendo aquéllas citadas en cualquier parte
5 anteriormente, se incorporan a la presente como referencia en su totalidad y para todos los propósitos.

- Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C. (1997) J. Mol. Biol. 273(4): 927-948.
- 10 • Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990) J. Mol. Biol. 215(3): 403-10.
- Amit AG, Mariuzza RA, Phillips SE, Poljak RJ. (1986) Science 233(4765): 747-53.
- 15 • Andersen DC y Krummen L. (2002) Curr. Op. Biotech. 13: 117.
- Andreoni M, Faircloth M, Vugler L, Britt WJ. (1989) J. Virol. Methods 23(2): 157-67.
- Ausubel y colaboradores, Editores Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 4^a edición 1999.
- 20 • Avitabile E, Forghieri C, Campadelli-Fiume G. (2009) J. Virol. 83: 10752-10760.
- Backovic M, Longnecker R, Jardetzky TS. (2009) PNAS USA 106: 2880-5.
- 25 • Bagshaw SM, Crabtree T, Green F, Stewart DA. (1991)

246
247

Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922.

- Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, y colaboradores, (1991) DNA Seq. 2(1): 1-12.
- Barbas CF 3rd, Hu D, Dunlop N, Sawyer L, Cababa D. (1994) PNAS EUA 91: 3809-3813.
- Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. (2002) Science 298: 2199-2202.
- Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, y colaboradores, (1998) Science 242(4877): 423-6.
- Boeckh M, Bowden RA, Storer B, Chao NJ, Spielberger R, Tierney DK, Gallez-Hawkins G, Cunningham T, Blume KG, Levitt D, Zaia JA. (2001) Biol. Blood Marrow Transplant. 7: 343-351.
- Britt WJ, Vugler L, Butfiloski EJ, Stephens EB. (1990) J. Virol. 64(3): 1079-85.
- Borucki MJ, Spritzler J, Asmuth DM, Gnann J, Hirsch MS, Nokta M, Aweeka F, Nadler PI, Sattler F, Alston B, Nevin TT, Owens S, Waterman K, Hubbard L, Caliendo A, Pollard RB; AACTG 266 Team. (2004) Antiviral Res. 64(2): 103-111.
- Casali P. (1986) Science 234: 476-9.
- Caton AJ, Herlyn D, Ross AH, Koprowski H. (1990) J. Immunol. 144(5): 1965-8.
- Chadd HE y Chamow SM. (2001) Curr. Op. Biotech. 12: 188-194.
- Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, y colaboradores, (1990) Curr. Top Microbiol. Immunol. 154:125-69.

242
248

- Chothia C, Lesk AM, Levitt M, Amit AG, Mariuzza RA, y colaboradores, (1986) Science 223: 755-758.
- Chothia C, Lesk AM. (1987) J. Mol. Biol. 196(4): 901-17.
- Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill SJ, y colaboradores, (1989) Nature 342(6252): 877-83.
- Chothia C, Lesk AM, Gherardi E, Tomlinson IM, Walter G, y colaboradores, (1992) J. Molecular Biology 227, 799-817.
- Chou SW, Dennison KM. (1991) J. Infect. Dis. 163(6): 1229-34.
- Davies J, Jiang L, Pan LZ, LaBarre MJ, Anderson D, Reff M. (2001) Biotechnol. Bioeng. 74(4): 288-94.
- Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, Pieper U, Sali A. (2006) Curr. Protoc. Bioinformatics, Capítulo 5: Unidad.
- Fiser A y Sali A. (2003) Bioinformatics 19(18): 2500-1.
- Gram H, Marconi LA, Barbas CF 3rd, Collet TA, Lerner RA, Kang AS. (1992) PNAS EUA 89(8): 3576-80.
- Guex N. y Peitsch MC. (1997) Electrophoresis 18: 2714-2723.
- Haan y Maggos (2004) BioCentury, 12(5): A1-A6.
- Hamilton AA, Manuel DM, Grundy JE, Turner AJ, King SI, Adair JR, White P, Carr FJ, Harris WJ. (1997) J. Infect. Dis. 176: 59-68.
- Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., páginas. 726,

248
249

1988.

- Heldwein EE, Lou H, Bender FC, Cohen GH, Eisenberg RJ, Harrison SC. (2006) Science 313: 217-220.

- Hieter PA, Maizel JV Jr, Leder P. (1982) J. Biol. Chem. 257(3): 1516-22.

- Holliger P, Prospero T, Winter G. (1993) PNAS EUA. 90(14): 6444-8.

- Holliger P y Winter G. (1993) Curr. Op. Biotech. 4: 446-449.

- Holliger P y Bohlen H. (1999) Cancer & Metastasis Rev. 18: 411-419.

- Holliger P y Hudson PJ. (2005) Nature Biot. 23(9): 1126-1136.

- Holt LJ, Herring C, Jespers LS, Woolven BP, Tomlinson IM. (2003) Trends in Biotechnology 21: 484-490.

- Hu S, Shively L, Raubitschek A, Sherman M, Williams LE, y colaboradores, (1996) Cancer Res. 56: 3055-3061.

- Hunter WM y Greenwood FC. (1962) Nature 194: 495-6.

- Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotný J, y colaboradores, (1988) PNAS EUA, 85: 5879-5883.

- Jung J, Yi AK, Zhang X, Jongseon C, Li L Choi YS. (2002) J. Immunol. 169: 2368-73.

- Kabat, EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Edición. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH,

244
250

Washington.

- Kabatt EA y Wu TT. (1991) J. Immunol. 147: 1709-1719.
- Kari B, Gehrz R. (1991) J. Gen. Virol. 72: 1975-83.
- Kenneson A, Cannon MJ. (2007) Rev. Med. Virol. 17: 253-
5 276.
- Kniess N, Mach M, Fay J, Britt WJ. (1991) J. Virol. 65:
138-46.
- Köhler G y Milstein C. (1975) Nature 256(5517): 495-7.
- Koide A, Bailey CW, Huang X, Koide S. (1998) J. Mol.
10 Biol. 284: 1141- 1151.
- Kontermann R y Dubel S. (2001) Antibody Engineering,
Springer-Verlag Nueva York, LLC; ISBN: 3540413545.
- Kozbor D, Roder JC. (1981) J. Immunol. 127(4): 1275-80.
- Kufer P, Lutterbüse R, Baeuerle PA. (2004) TRENDS in
15 Biotechnology 22(5): 238-244.
- Lanzavecchia A. (1985) Nature 314(6011): 537-9.
- Larrick JW y Thomas DW (2001) Curr. Op. Biotech. 12:
411-418.
- Ledermann JA, Begent RH, Massof C, Kelly AM, Adam T,
20 Bagshawe KD. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664.
- Lundgren K, Wahlgren M, Troye-Blomberg M, Berzins K,
Perlmann H, y colaboradores, (1983) J. Immunol. 131(4): 2000-3.
- Mach M, Kropff B, Dal-Monte P, Britt WJ. (2000) J. Virol.
74: 11881-11892.
- 25 • Mahy BWJ, Kangro HO. (1996) Virology Methods Manual,

páginas 35–37. San Diego: Academic Press.

- Marks JD, Griffiths AD, Malmqvist M, Clackson TP, Bye JM, Winter G. (1992) *Biotechnology* 10(7): 779-83.
- Marshall GS, Rabalais GP, Stout GG, Waldeyer SL. (1992) *J. Infect. Dis.* 165: 381-384.
- Martin, ACR. (1996) *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, 25, 130-133.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. (1990) *Nature* 348(6301): 552-4.
- Mendez MJ, Green LL, Corvalan JR, Jia XC, Maynard-Currie CE (1997) *Nature Genet.* 15(2): 146-156.
- Meyer H, Masuho Y, Mach M. (1990) *J. Gen. Virol.* 71: 2443-50.
- Meyer H, Sundqvist VA, Pereira L, Mach M. (1992) *J. Gen. Virol.* 73(9): 2375-83.
- Milhavet O, Gary DS, Mattson MP (2003) *Pharmacol. Rev.* 55(4): 629-48.
- Moss P, Rickinson A. (2005) *Nat. Rev. Immunol.* 5: 9-20.
- Nigro G, Adler SP, La TR, Best AM. (2005) *N. Engl. J. Med.* 353: 1350-1362.
- Nygren PA, Uhlén M. (1997) *Curr. Op. Struct. Biol.* 7: 463-469.
- Ohizumi Y, Suzuki H, Matsumoto Y, Masuho Y, Numazaki Y. (1992) *J. Gen. Virol.* 73(10): 2705-7.
- Ohlin M, Sundqvist VA, Mach M, Wahren B, Borrebaeck

CA. (1993) J. Virol. 67(2): 703-10.

- Opalinska JB y Gewirtz AM (2003) Sci. STKE 206: pe47
- Patrone M, Secchi M, Bonaparte E, Milanesi G, Gallina A.

(2007) J. Virol. 81: 11479-11488.

- 5
- Pearson WR, Lipman DJ. (1988) PNAS USA 85(8): 2444-8.

- Plückthun A. (1991) BioTechnology 9: 545-551.

• Posner MR, Hideshima T, Cannon T, Mukherjee M, Mayer KH, Byrn RA. (1991) J. Immunol. 146(12): 4325-32.

- 10
- Qiu XQ, Wang H, Cai B, Wang LL, Yue ST. (2007) Nat. Biotechnol. 25: 921-929.

• Raanani P, Gaftor-Gvili A, Paul M, Ben-Bassat I, Leibovici L, Shpilberg O. (2009) J. Clin. Oncol. 27: 770-781.

- 15
- Raff HV, Siscoe PJ, Wolff EA, Maloney G, Shuford W. (1988) J. Exp. Med. 168(3): 905-17.

• Ravetch JV, Siebenlist U, Korsmeyer S, Waldmann T, Leder P. (1981) Cell 3(2): 583-91.

- Razonable RR, Paya CV. (2003) Herpes 10: 60-65.

- 20
- Reiter Y, Brinkmann U, Lee B, Pastan I. (1996) Nature Biotech, 14: 1239-1245.

• Robinson JR. Editor, (1978) Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., Nueva York.

• Roche S, Bressanelli S, Rey FA, Gaudin Y. (2006) Science 313: 187-191.

- 25
- Roche S, Rey FA, Gaudin Y, Bressanelli S. (2007)

Science 315: 843-8.

- Rosén A, Gergely P, Jondal M, Klein G, Britton S. (1977) Nature 267(5606): 52-4.
- Rosén A, Persson K, Klein G. (1983) J. Immunol. 130(6): 2899-902.
- Sambrook y Russell, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3^a edición, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schier R, McCall A, Adams GP, Marshall KW, Merritt H, y colaboradores, (1996) J. Mol. Biol. 263: 551-567.
- Schoppel K, Kropff B, Schmidt C, Vornhagen R, Mach M. (1997) J. Infect. Dis. 175: 533-544.
- Schreiber A, Harter G, Schubert A, Bunjes D, Mertens T, Michel D. (2009) Expert. Opin. Pharmacother. 10: 191-209.
- Segal DM, Padlan EA, Cohen GH, Rudikoff S, Potter M, Davies DR. (1974) Proc Natl Acad Sci EUA. 71(11): 4298-302.
- Sharon J. (1990a) PNAS EUA. 87(12): 4814-7.
- Sharon J. (1990b) J. Immunol. 144: 4863-4869.
- Shatsky M, Nussinov R, Wolfson HJ. (2004) Proteins 56(1): 143-156.
- Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, y colaboradores, (2002) J. Biol. Chem. 277(30): 26733-40.
- Shimamura M, Mach M, Britt WJ. (2006) J. Virol. 80: 4591-4600.
- Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, y colaboradores, (2003) J. Biol. Chem. 278(5): 3466-73.

- Smith TF, y Waterman MS. (1981) J. Mol. Biol. 147(1): 195-7.
- Sokos DR, Berger M, Lazarus HM. (2002) Biol. Blood Marrow Transplant. 8: 117-130.
- 5 • Spaderna S, Kropff B, Kodel Y, Shen S, Coley S, Lu S, Britt W, Mach M. (2005) J Virol 79: 11837-11847.
- Steenbakkers PG, Van Wezenbeek PM, van Zanten J, The TH. (1993) Hum. Antibodies Hybridomas 4(4): 166-73.
- Steenbakkers PG, Hubers HA, Rijnders AW. (1994) Mol. 10 Biol. Rep. 19(2):125-34.
- Steinitz M, Klein G, Koskimies S, Makel O. (1977) Nature 269(5627): 420-2.
- Steinitz M, Izak G, Cohen S, Ehrenfeld M, Flechner I. (1980) 287(5781): 443-5.
- 15 • Steinitz M, Tamir S, Goldfarb A. (1984) J. Immunol. 132(2): 877-82.
- Streblow DN, Orloff SL, Nelson JA. (2007) Curr. Opin. Immunol. 19: 577-582.
- Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, 20 Wardemann H. (2008) J. Immunol. Methods 329: 112-24 y Corrigendum (2008) J. Immunol. Methods 334: 142.
- Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. (2004) Nat. Med. 10(8): 871-5.
- 25 • Udey JA, Blomberg B. (1987) Immunogenetics 25(1): 63-

254
255

70.

- Umaña P, Jean-Mairet J, Moudry R, Amstutz H, Bailey JE. (1999) Nat. Biotechnol. 17(2): 176-80.
- Urban M, Britt W, Mach M. (1992) J. Virol. 66: 1303-1311.
- 5 • Urban M, Klein M, Britt WJ, Hassfurth E, Mach M. (1996) J. Gen. Virol. 77(7): 1537-1547.
- Vasicek TJ, Leder P. J. Exp. Med. 172(2): 609-20.
- Voet y Voet, Biochemistry, 3ª edición, (Wiley) 2004.
- Wagner B, Kropff B, Kalbacher H, Britt W, Sundqvist VA, 10 Ostberg L, Mach M. (1992) J. Virol. 66: 5290-5297.
- Ward ES, Güssow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. (1989) Nature 341(6242): 544-6.
- Wess L. (2004) In: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7.
- 15 • Whitelegg NRU y Rees AR. (2000) Prot. Eng. 12: 815-824.
- Yamaguchi H, Furukawa K, Fortunato SR, Livingston PO, Lloyd KO, Oettgen HF, Old LJ. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci EUA 84: 2416-20.
- 20 • EP0120694A: Boss MA y colaboradores.
- EP0125023A: Cabilly S y colaboradores.
- EP0184187A: Kudo A y colaboradores.
- EP0239400A: Winter GP.
- EP0664834B: Harris WJ y colaboradores.
- 25 • US4,275,149: Litman DJ y colaboradores.

- US4,318,980: Boguslaski RC y colaboradores.
- US4,424,200: Crockford DR, Rhodes BA
- US4,479,930: Hnatowich DJ.
- US5,043,281: Masuho Y y colaboradores.
- 5 • US5,750,106: Ostberg L.
- US5,814,468: Sliman O y colaboradores.
- US6,602,684: Umaña P y colaboradores.
- US6,998,253: Presta LG, Snedecor BR
- US20030157108: Presta LG y colaboradores.
- 10 • US2009004198: Nakajima K y colaboradores.
- WO 91/009967 A1: Adair JR y colaboradores.
- WO 92/001047 A1: McCafferty J y colaboradores.
- WO 93/011161 A1: Whitlow MD y colaboradores.
- WO 93/021952 A1: Borrebaeck C y colaboradores.
- 15 • WO 00/034784 A1: Lipovsek D.
- WO 03/068819 A1: Grawunder U y Melchers GF.
- WO 04/006955 A1: Foote J.
- WO 04/076677 A2: Lanzavecchia A.
- WO 04/106375 A1: Hoogenboom HRJM y colaboradores.
- 20 • WO 07/068758 A1: Funaro A y colaboradores.
- WO 08/084410 A2: Lanzavecchia A, Macagano A.
- WO 08/071806 A1: Funaro A y colaboradores.
- WO 09/003975 A1: Funaro A y colaboradores.
- 25 • WO 09/024445 A1: Funaro A y colaboradores.

256
257

- WO 09/114560 A2: Olsen O.
- WO 10/007463 A1: Lanzavecchia A, Macagano A.
- WO 10/007533 A2: Lanzavecchia A, Macagano A.
- WO 10/114105 A1: Takada K, Kurino R, Watanabe M.
- 5 • WO 10/114106 A1: Takada K, Kurino R, Torashima T.

10

15

20

25

257
258**REIVINDICACIONES**

1. Un miembro enlazador aislado para la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV), el cual se enlaza a la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV) en una región dentro de los residuos 100 a 447, siendo definida la numeración de residuos de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de gB de la cepa AD169 de longitud completa SEQ ID No: 239.
2. Un miembro enlazador aislado para la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV), el cual se enlaza a la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV) con una K_D de no más de 1 nM, como se define mediante resonancia de plasmón superficial.
3. Un miembro enlazador de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la K_D no es mayor de 0.5 nM.
4. Un miembro enlazador de acuerdo con la reivindicación 2 o con la reivindicación 3, en donde la K_D no es mayor de 0.1 nM.
5. Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el miembro enlazador no se enlaza a un dominio antigénico 1 (AD-1) o a un dominio antigénico 2 (AD-2) de la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV).
6. Un miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración del miembro enlazador requerida para una neutralización del 50 por ciento de un aislado clínico del citomegalovirus humano (hCMV) es de 10 microgramos/mililitro o menos en un ensayo de neutralización

258
25a

para la neutralización de la infección por el citomegalovirus humano (hCMV) de fibroblastos de prepucio humano.

7. Un miembro enlazador aislado para el citomegalovirus humano (hCMV), el cual comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde el conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) tiene 22 o menos alteraciones de aminoácidos a partir de un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) en donde:
- 10 HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 3;
HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 4;
HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 5;
LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 93;
- 15 LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 94; y
LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 95,
- y en donde el miembro enlazador tiene una K_D de no más de 50 nM como se define mediante resonancia de plasmón superficial.
- 20

8. Un miembro enlazador aislado para el citomegalovirus humano (hCMV) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el cual comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1,
- 25

LCDR2 y LCDR3, en donde el conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) tiene 22 o menos alteraciones de aminoácidos a partir de un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) en donde:

- 5 HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 3;
 HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 4;
 HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 5;
 LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No:
 93;
10 LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No:
 94; y
 LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No:
 95.

9. Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las
15 reivindicaciones 7 u 8, el cual comprende una HCDR1 en donde:
 el residuo de Kabat 31 es Asp o Gly;
 el residuo de Kabat 32 es His, Phe o Tyr;
 el residuo de Kabat 33 es Tyr;
 el residuo de Kabat 34 es Met, Ile o Leu; y
20 el residuo de Kabat 35 es Val o Asn.

10. Un miembro enlazador de acuerdo con la reivindicación 9,
en donde la HCDR1 es la SEQ ID No: 3.

11. Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las
reivindicaciones 7 a 10, el cual comprende una HCDR2 en donde:
25 el residuo de Kabat 50 es Trp, Ser o Cys;

el residuo de Kabat 53 es Gin, Asn o His;

el residuo de Kabat 54 es Ser o Thr;

el residuo de Kabat 58 es Gly, Lys, Asn o His;

el residuo de Kabat 60 es Gly o Ala; y

5 el residuo de Kabat 64 es Gin o Arg.

12. Un miembro enlazador de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 4.

10 13. Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual comprende una HCDR3 en donde:

el residuo de Kabat 99 es Thr o Ala;

el residuo de Kabat 100 es Val o Met;

el residuo de Kabat 100A es Ser o Thr

el residuo de Kabat 100B es Asn o Thr;

15 el residuo de Kabat 100C es Ser o Phe;

el residuo de Kabat 100E es Leu, Met o Ala;

el residuo de Kabat 100F es Ser o Gly;

el residuo de Kabat 100K es His o Tyr;

el residuo de Kabat 100L es Asn, Ser o Asp;

20 el residuo de Kabat 100M es Arg, Val o Ile;

el residuo de Kabat 100N es Leu o Met;

el residuo de Kabat 101 es Asp o Gly; y

el residuo de Kabat 102 es Ala, Val o Ile.

14. Un miembro enlazador de acuerdo con la reivindicación 25 13, en donde la HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID

26/2

No: 5.

15. Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, en donde el residuo de Kabat 26 en la LCDR1 es Ser o Asn, o en donde el residuo de Kabat 27 en la
5 LCDR1 es Ser o Arg.

16. Un miembro enlazador de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la LCDR1 es la SEQ ID No: 93.

17. Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16, en donde el residuo de Kabat 56 en la
10 LCDR2 es Ser o Pro.

18. Un miembro enlazador de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la LCDR2 es la SEQ ID No: 94.

19. Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual comprende una LCDR3 en donde:
15 el residuo de Kabat 89 es Gly o Ala;
el residuo de Kabat 91 es Pro o Trp;
el residuo de Kabat 93 es Arg o Ser;
el residuo de Kabat 94 es Ser o Asp;
el residuo de Kabat 95a es Ser, Gly o Ala;
20 el residuo de Kabat 96 es Val o Tyr; y
el residuo de Kabat 97 es Ile o Val.

20. Un miembro enlazador de acuerdo con la reivindicación 19, el cual comprende una LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 95.

25 21. Un miembro enlazador aislado para la proteína gB del

262
263

citomegalovirus humano (hCMV), el cual comprende una HCDR3, una LCDR3, y/o un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cualquiera de los anticuerpos Ab-01 a Ab-46.

5 **22.** Un miembro enlazador aislado de acuerdo con la reivindicación 21, el cual se enlaza a la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV) en una región dentro de los residuos 121 a 132 y 344 a 438, siendo definida la numeración de residuos de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de gB de la
10 cepa AD169 de longitud completa SEQ ID No: 239.

23. Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde:

15 HCDR1 es la SEQ ID No: 3;
 HCDR2 es la SEQ ID No: 4;
 HCDR3 es la SEQ ID No: 5;
 LCDR1 es la SEQ ID No: 93;
 LCDR2 es la SEQ ID No: 94; y
20 LCDR3 es la SEQ ID No: 95.

24. Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el miembro enlazador comprende una molécula de anticuerpo o un fragmento funcional de la misma, la cual comprende un dominio de anticuerpo V_H , y en
25 donde el dominio V_H tiene la secuencia de aminoácidos del dominio

V_H mostrada en la SEQ ID No: 2.

25. Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el miembro enlazador comprende una molécula de anticuerpo o un fragmento funcional de la misma, la cual comprende un dominio de anticuerpo V_L en donde el dominio V_L tiene la secuencia de aminoácidos del dominio V_L mostrada en la SEQ ID No: 92.

26. Una molécula de anticuerpo aislada, la cual comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 2, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 92.

27. Una molécula de anticuerpo aislada, que se enlaza a la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV), en donde la molécula de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos del dominio V_H cuando menos el 90 por ciento idéntica a la SEQ ID No: 2, y una secuencia de aminoácidos del dominio V_L cuando menos el 90 por ciento idéntica a la SEQ ID No: 92.

28. Un miembro enlazador aislado para la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV), el cual comprende una HCDR3, una LCDR3, y/o un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cualquiera de los anticuerpos Ab-47 a Ab-50.

29. Un miembro enlazador aislado de acuerdo con la reivindicación 28, el cual se enlaza a la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV) en una región dentro de los

264
265

residuos 133 a 343, siendo definida la numeración de residuos de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de gB de la cepa AD169 de longitud completa SEQ ID No: 239.

5 **30.** Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 28 y 29, el cual comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde:

HCDR1 es la SEQ ID No: 243;

HCDR2 es la SEQ ID No: 244;

10 HCDR3 es la SEQ ID No: 245;

LCDR1 es la SEQ ID No: 263;

LCDR2 es la SEQ ID No: 264; y

LCDR3 es la SEQ ID No: 265.

15 **31.** Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 28 y 29, el cual comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde:

HCDR1 es la SEQ ID No: 248;

HCDR2 es la SEQ ID No: 249;

20 HCDR3 es la SEQ ID No: 250;

LCDR1 es la SEQ ID No: 268;

LCDR2 es la SEQ ID No: 269; y

LCDR3 es la SEQ ID No: 270.

25 **32.** Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 28 y 29, el cual comprende un conjunto de

regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde:

- 5 HCDR1 es la SEQ ID No: 253;
HCDR2 es la SEQ ID No: 254;
HCDR3 es la SEQ ID No: 255;
LCDR1 es la SEQ ID No: 273;
LCDR2 es la SEQ ID No: 274;
LCDR3 es la SEQ ID No: 275.

10 **33.** Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 28 y 29, el cual comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde:

- 15 HCDR1 es la SEQ ID No: 258;
HCDR2 es la SEQ ID No: 259;
HCDR3 es la SEQ ID No: 260;
LCDR1 es la SEQ ID No: 278;
LCDR2 es la SEQ ID No: 279; y
LCDR3 es la SEQ ID No: 280.

20 **34.** Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 28 a 30, en donde el miembro enlazador comprende una molécula de anticuerpo o un fragmento funcional de la misma, el cual comprende un dominio de anticuerpo V_H , y en donde el dominio V_H tiene la secuencia de aminoácidos del dominio V_H mostrada en la SEQ ID No: 242.

25 **35.** Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 6, 28, 29 y 31, en donde el miembro enlazador comprende una molécula de anticuerpo o un fragmento funcional de la misma, el cual comprende un dominio de anticuerpo V_H , y en donde el dominio V_H tiene la secuencia de aminoácidos del dominio V_H mostrada en la SEQ ID No: 247.

36. Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 28, 29 y 32, en donde el miembro enlazador comprende una molécula de anticuerpo o un fragmento funcional de la misma, el cual comprende un dominio de anticuerpo V_H , y en donde el dominio V_H tiene la secuencia de aminoácidos del dominio V_H mostrada en la SEQ ID No: 252.

37. Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 28, 29 y 33, en donde el miembro enlazador comprende una molécula de anticuerpo o un fragmento funcional de la misma, el cual comprende un dominio de anticuerpo V_H , y en donde el dominio V_H tiene la secuencia de aminoácidos del dominio V_H mostrada en la SEQ ID No: 257.

38. Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 28 a 30 y 34, en donde el miembro enlazador comprende una molécula de anticuerpo o un fragmento funcional de la misma, que comprende un dominio de anticuerpo V_L , en donde el dominio V_L tiene la secuencia de aminoácidos del dominio V_L mostrada en la SEQ ID No: 262.

39. Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 28, 29, 31 y 35, en donde el miembro

267
268

enlazador comprende una molécula de anticuerpo o un fragmento funcional de la misma, que comprende un dominio de anticuerpo V_L , en donde el dominio V_L tiene la secuencia de aminoácidos del dominio V_L mostrada en la SEQ ID No: 267.

5 **40.** Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 28, 29, 32 y 36, en donde el miembro enlazador comprende una molécula de anticuerpo o un fragmento funcional de la misma, que comprende un dominio de anticuerpo V_L , en donde el dominio V_L tiene la secuencia de aminoácidos del
10 dominio V_L mostrada en la SEQ ID No: 272.

41. Un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 28, 29, 33 y 37, en donde el miembro enlazador comprende una molécula de anticuerpo o un fragmento funcional de la misma, que comprende un dominio de anticuerpo V_L ,
15 en donde el dominio V_L tiene la secuencia de aminoácidos del dominio V_L mostrada en la SEQ ID No: 277.

42. Una molécula de anticuerpo aislada, la cual comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 242, y una cadena ligera que comprende la secuencia de
20 aminoácidos SEQ ID No: 262.

43. Una molécula de anticuerpo aislada, la cual comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 247, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 267.

25 **44.** Una molécula de anticuerpo aislada, la cual comprende

268
209

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 252, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 272.

45. Una molécula de anticuerpo aislada, la cual comprende
5 una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 257, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 277.

46. Una molécula de anticuerpo aislada, que se enlaza a la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV), en donde la
10 molécula de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos del dominio V_H cuando menos el 90 por ciento idéntica a la SEQ ID No: 242, y una secuencia de aminoácidos del dominio V_L cuando menos el 90 por ciento idéntica a la SEQ ID No: 262.

47. Una molécula de anticuerpo aislada, que se enlaza a la
15 proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV), en donde la molécula de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos del dominio V_H cuando menos el 90 por ciento idéntica a la SEQ ID No: 247, y una secuencia de aminoácidos del dominio V_L cuando menos el 90 por ciento idéntica a la SEQ ID No: 267.

20 48. Una molécula de anticuerpo aislada, que se enlaza a la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV), en donde la molécula de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos del dominio V_H cuando menos el 90 por ciento idéntica a la SEQ ID No: 252, y una secuencia de aminoácidos del dominio V_L cuando
25 menos el 90 por ciento idéntica a la SEQ ID No: 272.

49. Una molécula de anticuerpo aislada, que se enlaza a la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV), en donde la molécula de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos del dominio V_H cuando menos el 90 por ciento idéntica a la SEQ ID No: 257, y una secuencia de aminoácidos del dominio V_L cuando menos el 90 por ciento idéntica a la SEQ ID No: 277.

50. Un miembro enlazador o molécula de anticuerpo que compite para enlazarse a la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV) con un miembro enlazador o una molécula de anticuerpo aislada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

51. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26, 27, 42 a 50, en donde la molécula de anticuerpo es una IgG.

52. Un dominio V_H aislado de una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24, 26, 27, 34 a 37 y 42 a 51.

53. Un dominio V_L aislado de una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27 y 38a 51.

54. Una composición que comprende un miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y 28 a 41, o una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26, 27 y 42 a 51, y un excipiente farmacéuticamente aceptable .

55. Una composición que comprende un miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y

270
271

28 a 41, o una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26, 27 y 42 a 51, para utilizarse en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

56. Una composición de acuerdo con la reivindicación 55,
5 para utilizarse en el tratamiento de un trastorno asociado con el citomegalovirus humano (hCMV).

57. Una composición que comprende un miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y 28 a 41, o una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de
10 las reivindicaciones 26, 27 y 42 a 51, para utilizarse en el tratamiento de un trastorno asociado con el citomegalovirus humano (hCMV).

58. Una composición de acuerdo con la reivindicación 56, o el uso de acuerdo con la reivindicación 57, en donde el trastorno es
15 una infección por el citomegalovirus humano (hCMV).

59. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 55 a 58, la cual comprende además un miembro enlazador aislado o molécula de anticuerpo que se enlaza a la proteína gB, gH, gL, UL128, UL130 y/o UL131A del citomegalovirus
20 humano (hCMV).

60. Un método para el tratamiento de un trastorno asociado con el citomegalovirus humano (hCMV) en un individuo, el cual comprende administrar un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y 28 a 41, o una molécula
25 de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26,

27+
272

27 y 42 a 51, al individuo, y de preferencia en donde el individuo tiene un sistema inmunológico comprometido.

61. Un método de acuerdo con la reivindicación 60, en donde el individuo es una mujer embarazada, un recién nacido, un receptor
5 de trasplante o un individuo infectado con VIH.

62. Una molécula de ácido nucleico aislada, la cual comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y 28 a 41, un dominio V_H de acuerdo con la reivindicación 52, un
10 dominio V_L de acuerdo con la reivindicación 53, o una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26, 27 y 42 a 51.

63. Una célula huésped transfectada *in vitro* o transducida con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación
15 62.

64. Un método para la producción de un miembro enlazador, una molécula de anticuerpo, o un dominio de anticuerpo V_H o V_L , el cual comprende cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 63, bajo condiciones para la producción del miembro
20 enlazador, la molécula de anticuerpo, o el dominio de anticuerpo V_H o V_L .

65. Un método de acuerdo con la reivindicación 64, el cual comprende además aislar y/o purificar el miembro enlazador, la molécula de anticuerpo, el dominio V_H , o el dominio V_L .

25 66. Un método de acuerdo con la reivindicación 64 o con la

272
273

reivindicación 65, el cual comprende además formular el miembro enlazador, la molécula de anticuerpo, el dominio V_H , o el dominio V_L , en una composición que comprende cuando menos un componente adicional.

5 **67.** Un método para la producción de un dominio de enlace de antígeno de un anticuerpo para el citomegalovirus humano (hCMV), comprendiendo el método proporcionar, por medio de la
10 adición, supresión, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H progenitor que comprende las HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en donde las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del dominio V_H progenitor son un conjunto de HCDRs como se muestran en la Tabla 19, un dominio V_H que es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio V_H progenitor, y
15 opcionalmente combinar el dominio V_H proporcionado de esta manera, con uno o más dominios V_L , para proporcionar una o más combinaciones de V_H/V_L ; y probar este dominio V_H que es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio V_H progenitor o la combinación o las combinaciones de V_H/V_L , para identificar un
20 dominio de enlace de antígeno del anticuerpo para el citomegalovirus humano (hCMV).

68. Un método de acuerdo con la reivindicación 67, en donde el uno o más dominios V_L mencionados, se proporcionan por medio de la adición, supresión, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio V_L
25 progenitor, el cual comprende las LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en

273
274

donde las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del dominio V_L progenitor son un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de V_L , como se muestra en la Tabla 19, produciendo uno o más dominios V_L , cada uno de los cuales es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio V_L progenitor.

69. Un método de acuerdo con la reivindicación 67 o con la reivindicación 68, en donde el dominio V_H que es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio V_H progenitor, se proporciona mediante mutagénesis de CDR.

70. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 67 a 69, el cual comprende además producir el dominio de enlace de antígeno de un anticuerpo como un componente de una molécula de anticuerpo IgG, scFv, Fab o biespecífica o como un anticuerpo multi-específico.

71. Un método para la producción de un miembro enlazador que se enlaza al citomegalovirus humano (hCMV), cuyo método comprende: proporcionar un ácido nucleico de partida que codifique un dominio V_H o un repertorio de ácidos nucleicos de partida, cada uno codificando un dominio V_H , en donde el dominio V_H o los dominios V_H comprenden una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 para ser reemplazada, o bien carecen de una región codificante de HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3;

combinar el ácido nucleico de partida o el repertorio de partida con el ácido nucleico donante o con los ácidos nucleicos donantes que codifiquen o sean producidos mediante la mutación de

274
275

la secuencia de aminoácidos de una HCDR1, HCDR2, y/o HCDR3 mostradas en la Tabla 19, de tal manera que el ácido nucleico donante o los ácidos nucleicos donantes se insertan en la región CDR1, CDR2 y/o CDR3 en el ácido nucleico de partida o en el repertorio de partida, para proporcionar un repertorio producido de ácidos nucleicos que codifiquen los dominios V_H ; expresar los ácidos nucleicos de este repertorio producido para producir los dominios V_H producidos; opcionalmente combinar estos dominios V_H producidos con uno o más dominios V_L ; seleccionar un miembro enlazador para el citomegalovirus humano (hCMV), cuyo miembro enlazador comprende un dominio V_H producido, y opcionalmente un dominio V_L ; y recuperar el miembro enlazador o el ácido nucleico que lo codifique.

72. Un método de acuerdo con la reivindicación 71, en donde los ácidos nucleicos donantes se producen mediante la mutación de dichas HCDR1 y/o HCDR2 y/o HCDR3.

73. Un método de acuerdo con la reivindicación 72, el cual comprende proporcionar el ácido nucleico donante mediante la mutación aleatoria del ácido nucleico.

74. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 67 a 73, el cual comprende además unir un dominio V_H producido que esté comprendido dentro del miembro enlazador recuperado, a una región constante del anticuerpo.

75. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 67 a 74, el cual comprende proporcionar una IgG,

275
276

scFv, Fab, o una molécula de anticuerpo biespecífica, o un anticuerpo multi-específico, que comprenda el dominio V_H producido y un dominio V_L .

5 76. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 67 a 75, el cual comprende además probar el dominio de enlace de antígeno de un anticuerpo o miembro enlazador que se enlace al citomegalovirus humano (hCMV), para determinar su capacidad para neutralizar el citomegalovirus humano (hCMV).

10 77. Un método de acuerdo con la reivindicación 76, en donde se obtiene un miembro enlazador que comprende una molécula de anticuerpo que se enlaza a, y neutraliza, el citomegalovirus humano (hCMV).

15 78. Un método para la neutralización del citomegalovirus humano (hCMV) en un sujeto o en una muestra, el cual comprende administrar a este sujeto o a esta muestra, un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 y 28 a 41, o una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26, 27 y 42 a 51, en una cantidad suficiente para
20 reducir la infectividad del citomegalovirus humano (hCMV) por cuando menos el 50 por ciento, en una concentración de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5.0 microgramos/mililitro.

276
277

RESUMEN

La invención se refiere a miembros enlazadores, en especial a moléculas de anticuerpos, que neutralizan los efectos biológicos del citomegalovirus humano (hCMV). Los miembros enlazadores son
5 útiles para el tratamiento y la profilaxis de la infección por el citomegalovirus humano (hCMV).

* * * * *

10

15

20

25 WPC19527/ID.220822

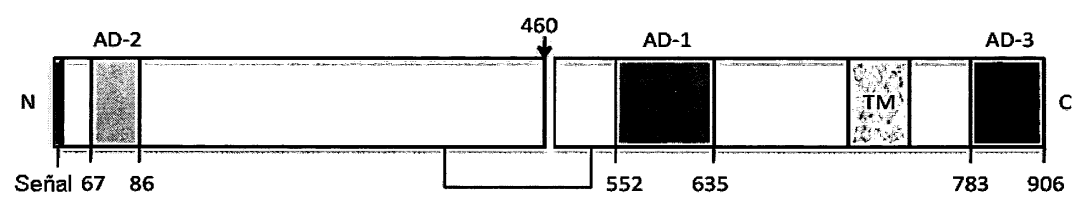


FIG. 1

27/8

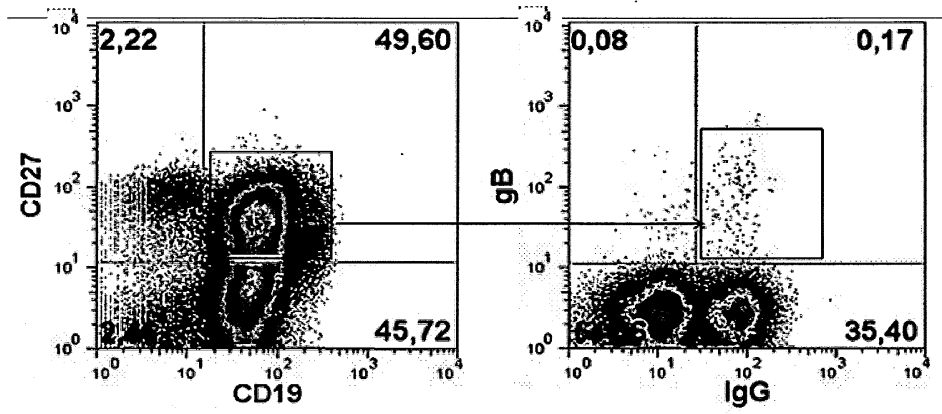


FIG. 2

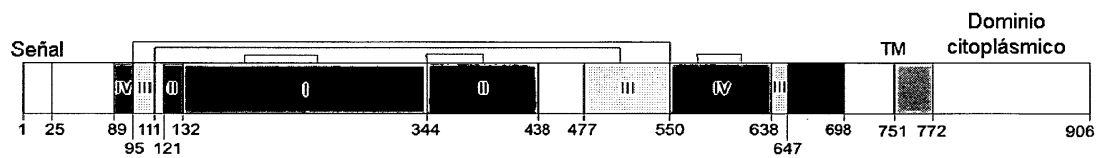


FIG. 3

289
288

279
280

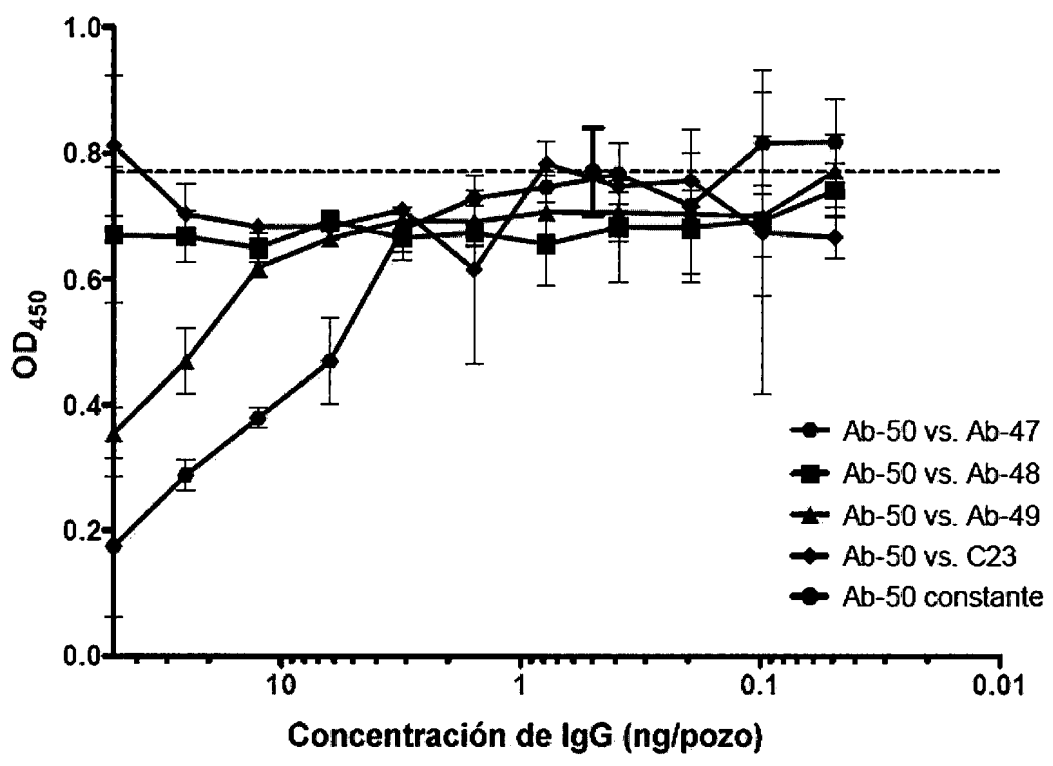


FIG. 4a

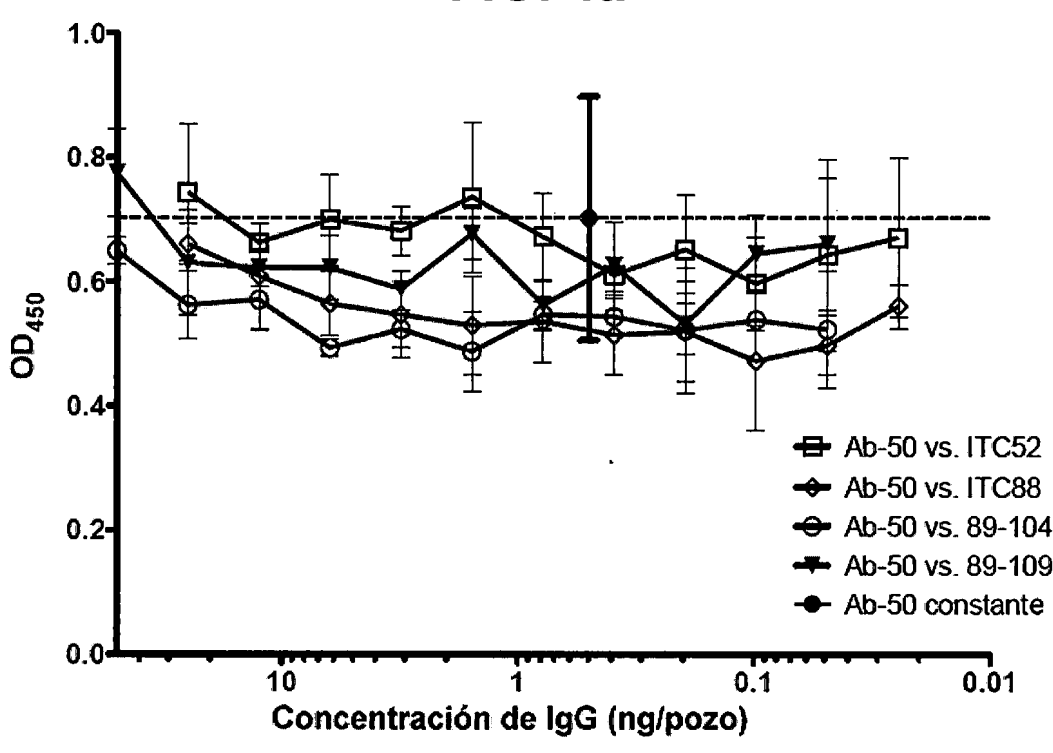


FIG. 4b

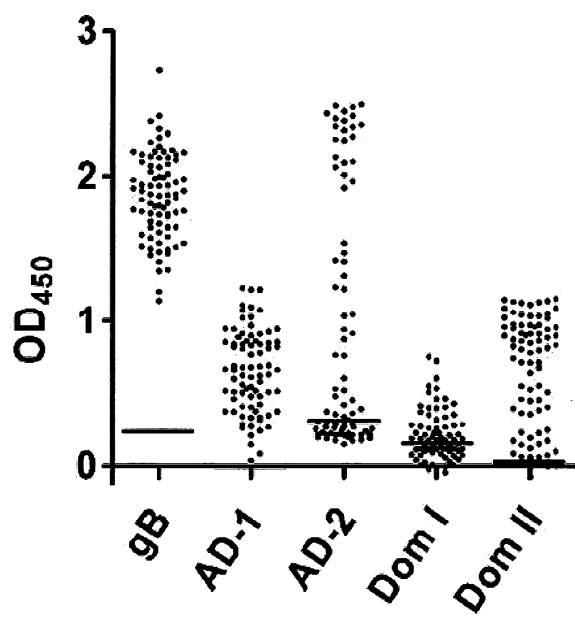


FIG. 5

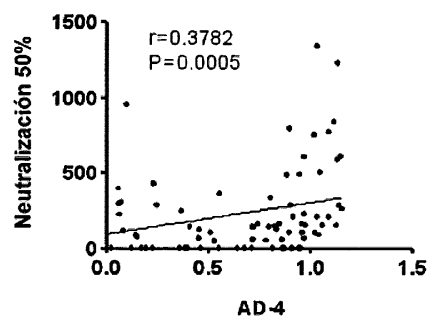
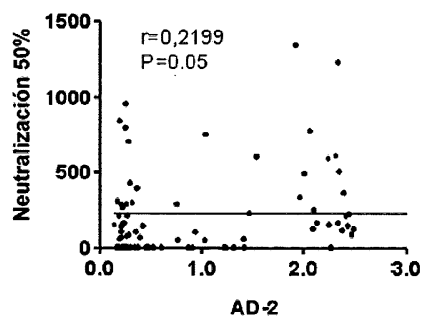
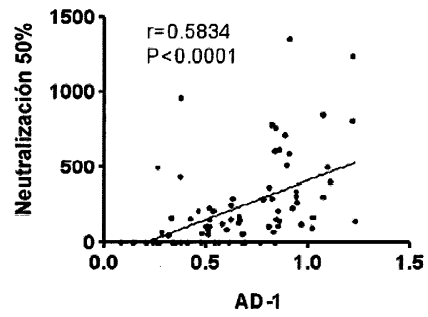
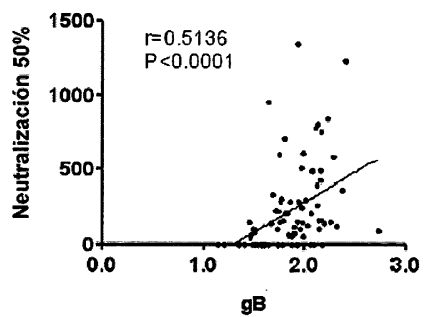


FIG. 6

282
281

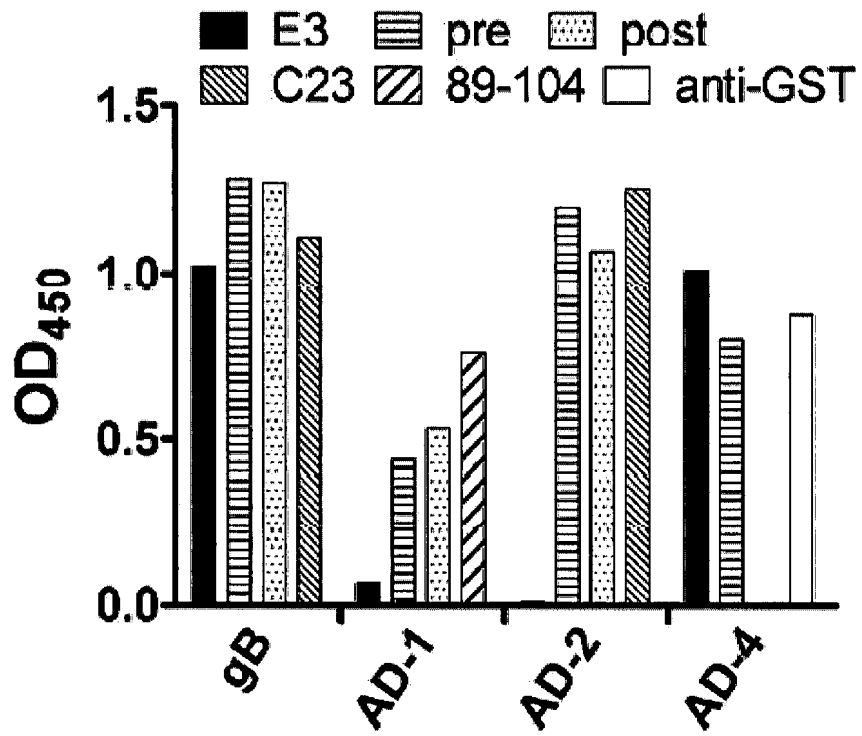


FIG. 7a

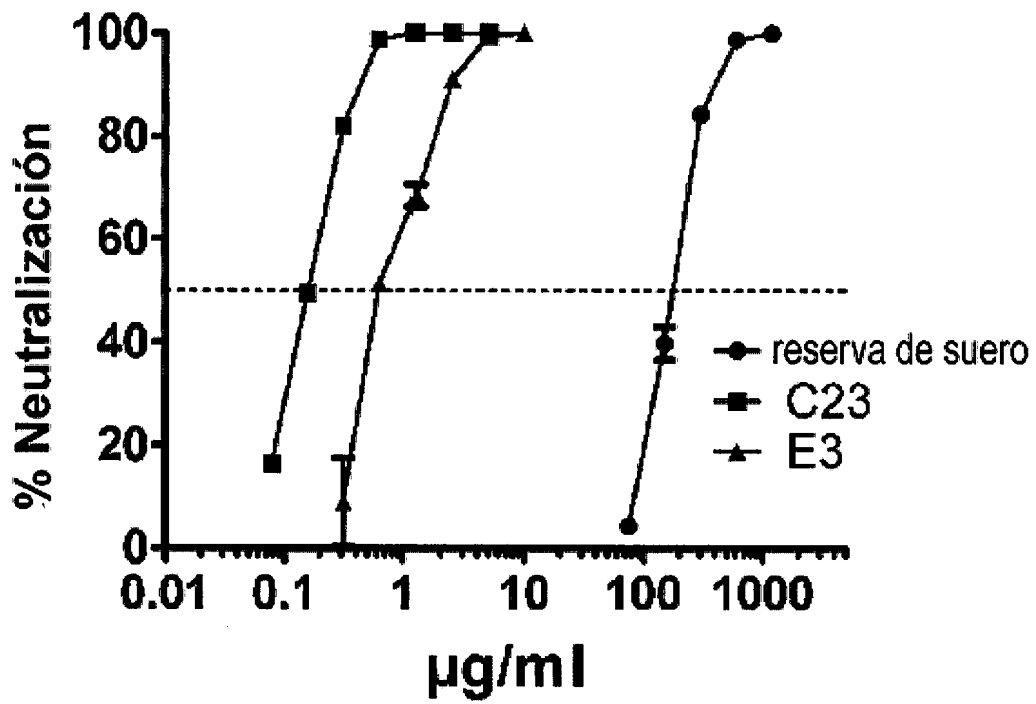


FIG. 7b

	P I N E D L D E G I H V V Y K R H I A G S G C Q L T F W E A S E R T I R S E A E D S Y H F S S A K H T A T F L S K Q D E V N K S D S A L D C V R D E A I N K L Q Q I F N T S Y N Q T Y E K Y G H V S V F E T S G G L V V F W Q G I K Q K S									
A	---DL-----									
B	-----F-----Q-----									
C	-----IN-----									
D	---L-----R-----									
E	-----E-D-----									
F	-----ED-----									
G	-----KK-----									
H	-----QE-----									
I	-----N-S-----									
J	-----RD-----									
K	-----QQ-----									
L	-----NT-----									
M	-----NQ-----									
N	-----QT-----									
O	-----Y-H-----									
P	-----KQ-----									
Q	-----KS-----									

FIG. 8

2/26 283

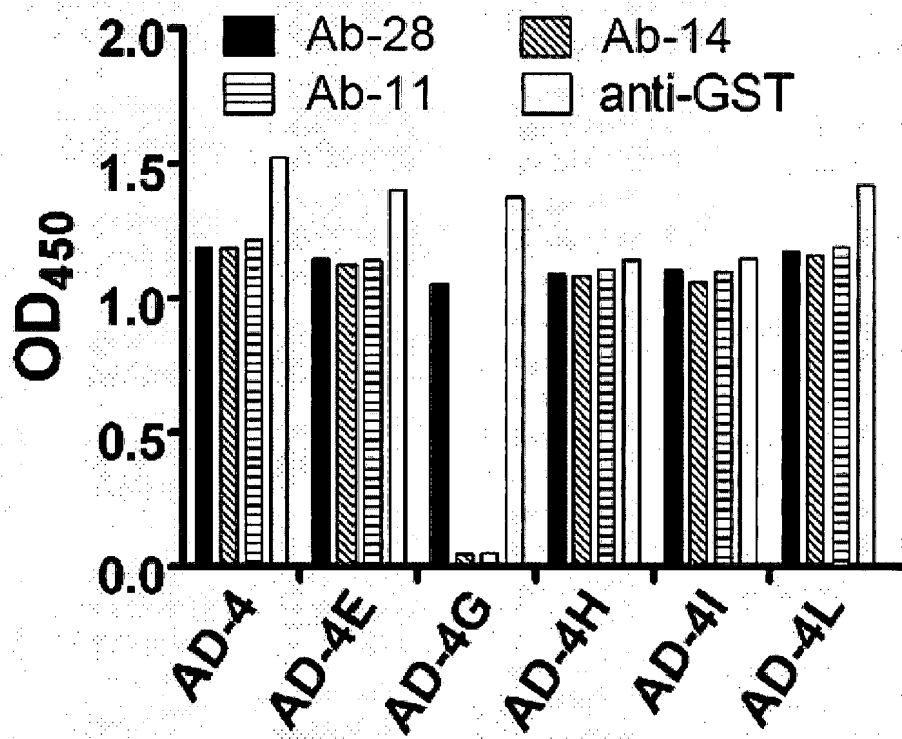


FIG. 9a

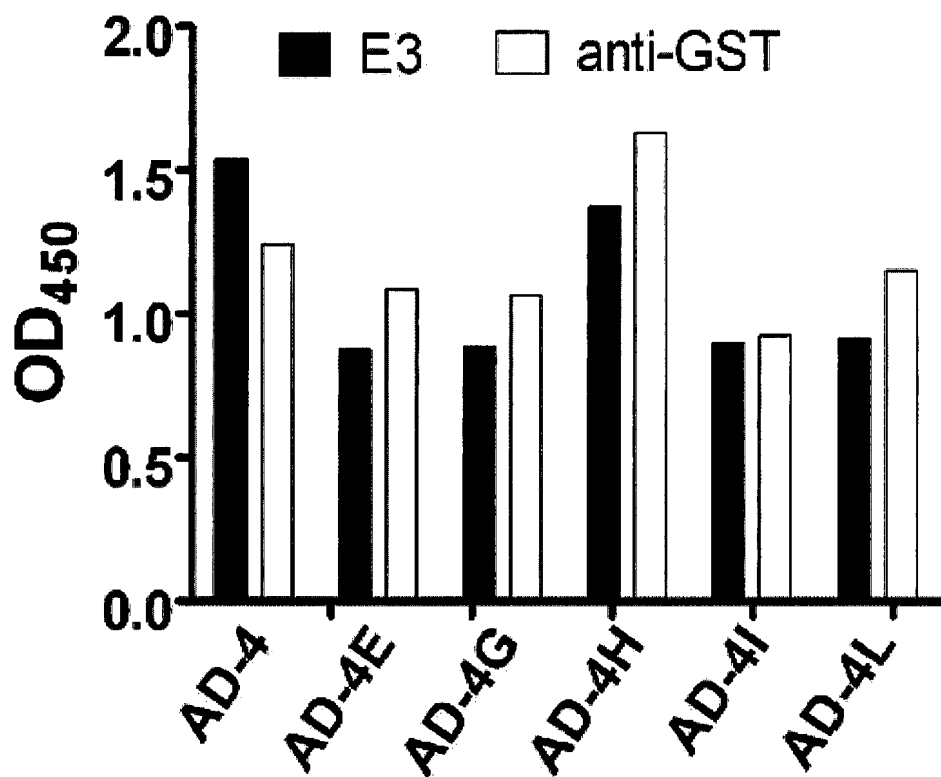


FIG. 9b

285
286

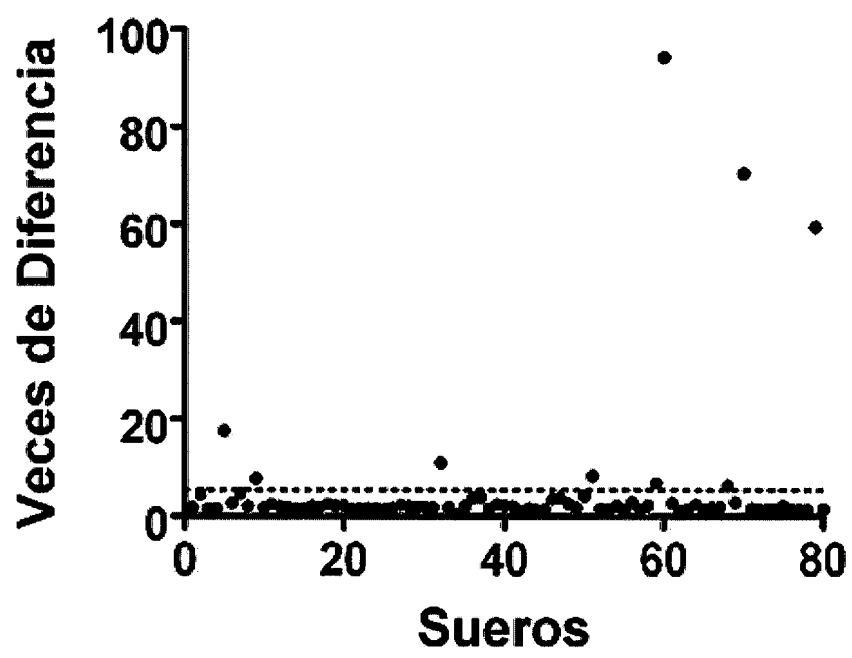


FIG. 10

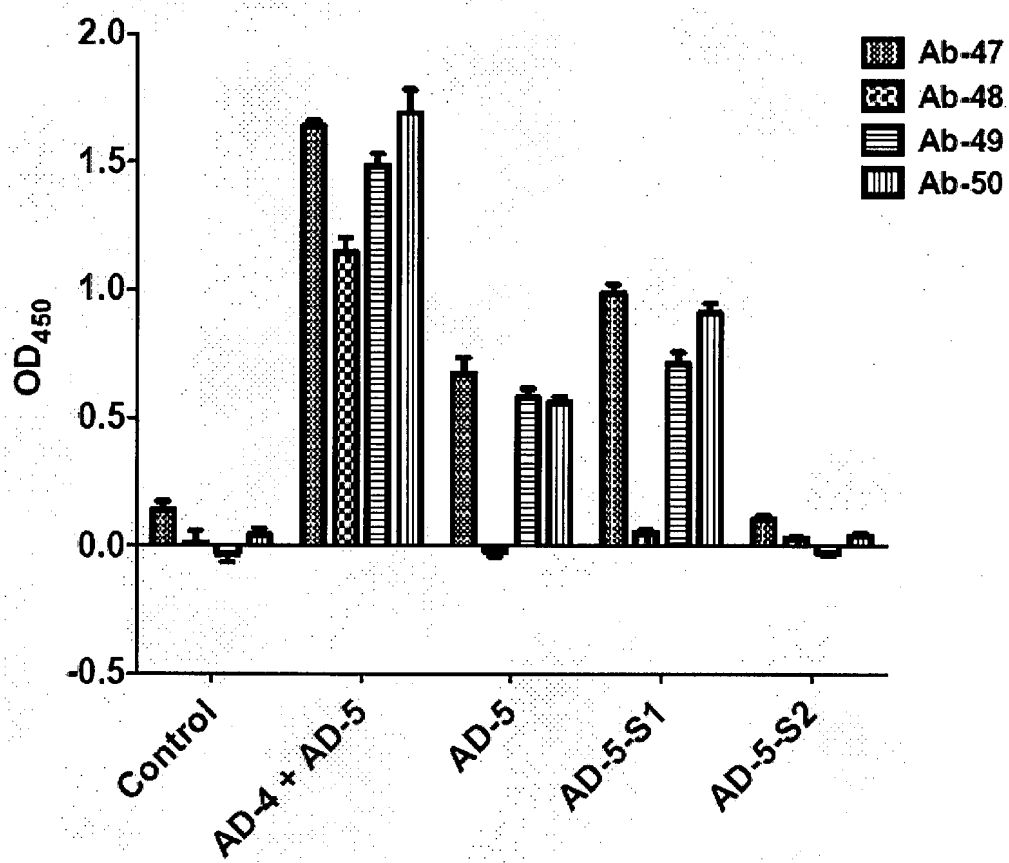


FIG. 11

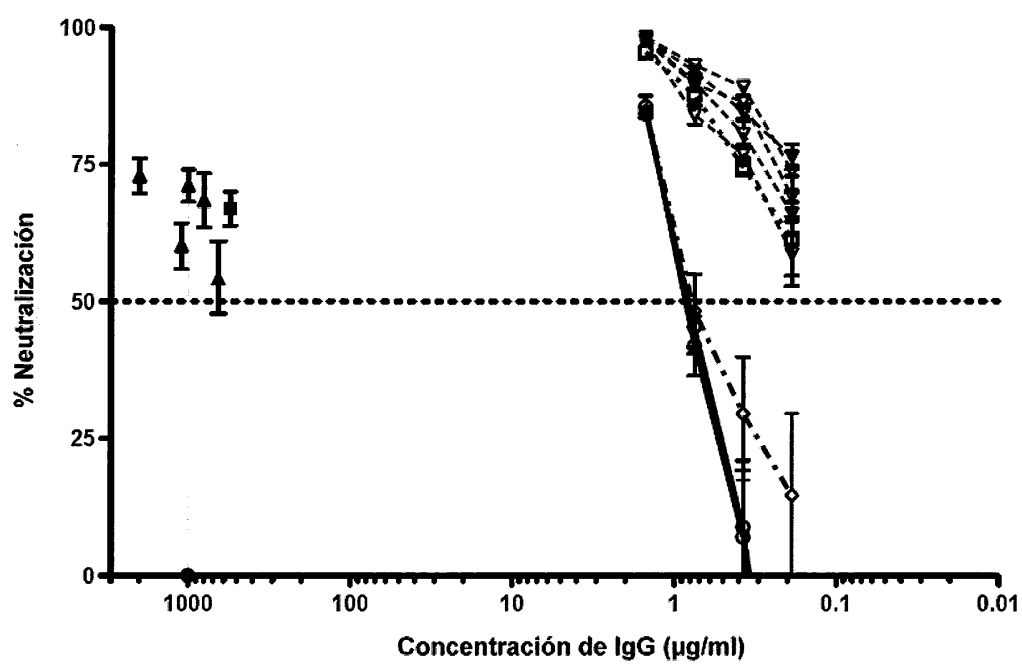


FIG. 12

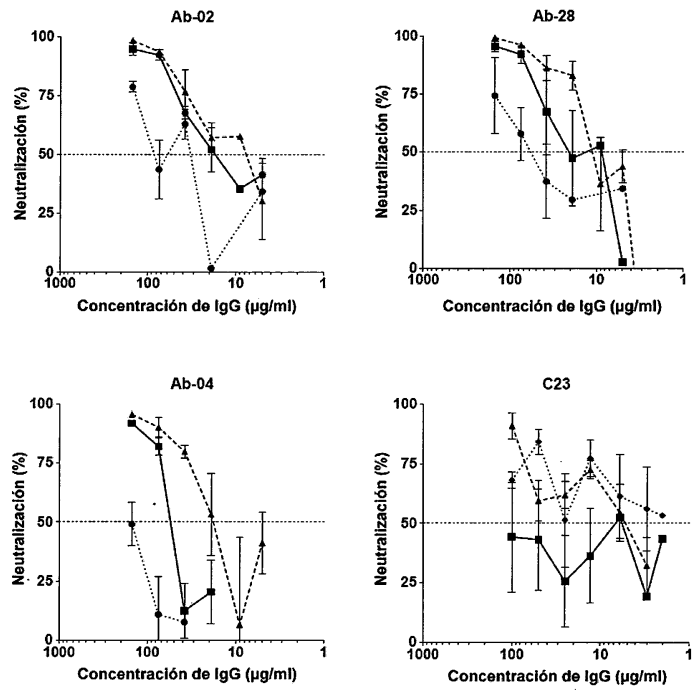


FIG. 13

286
287

288
289

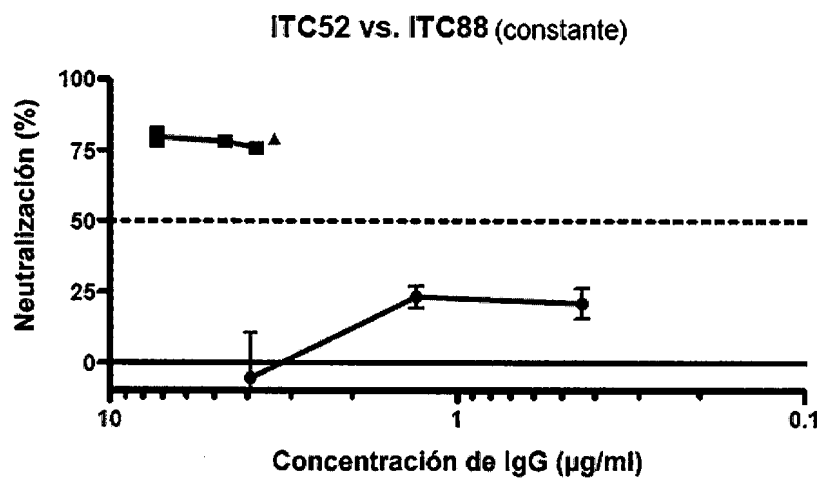
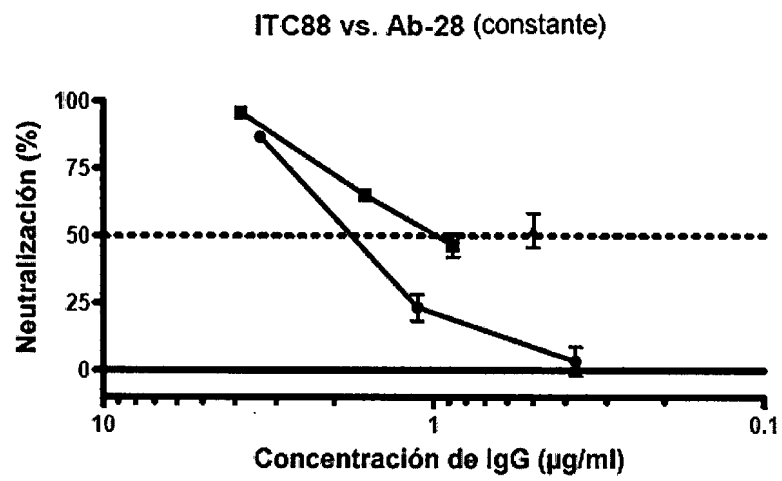
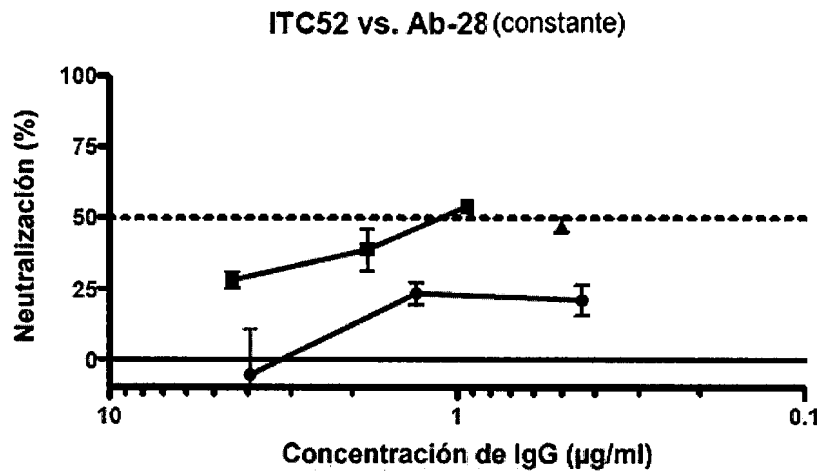
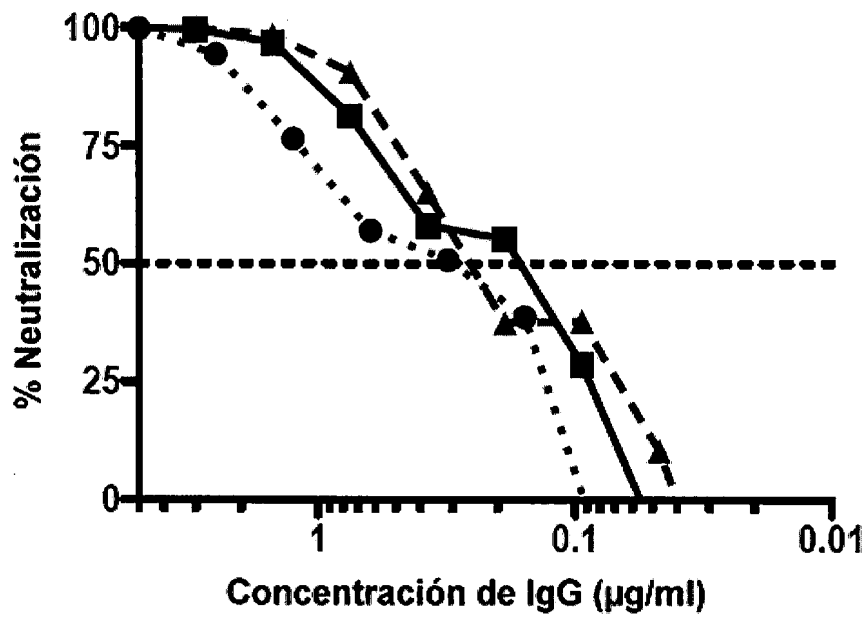


FIG. 14

Ab-50 vs. Ab-28



Ab-49 vs. Ab-28

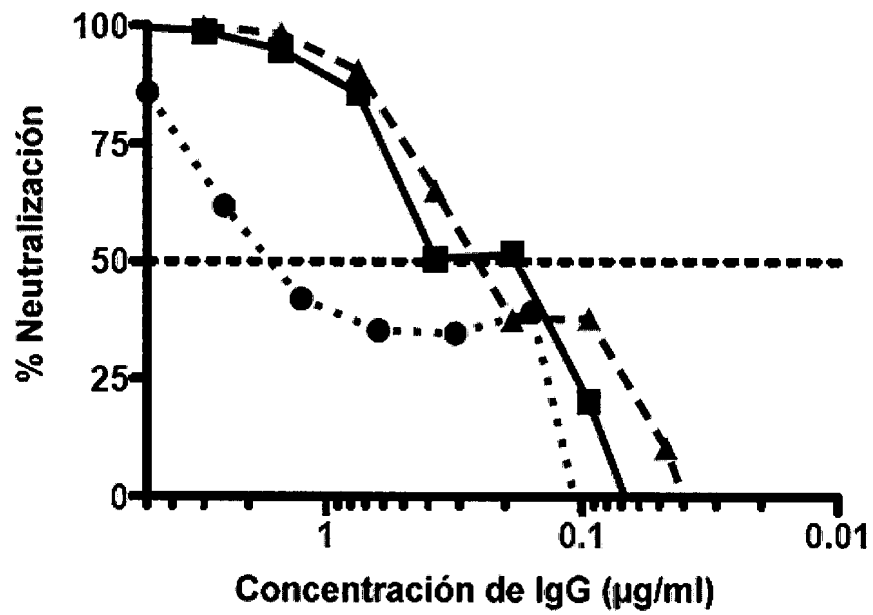


FIG. 15

290
291

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	4-Antibody AG, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg	
	<120>	Miembros Enlazadores para Citomegalovirus humano	
5	<130>	R3017 PCT	
	<150>	EP 09 01 5951.8	
	<151>	2009-12-23	
	<150>	EP 10 00 3669.8	
	<151>	2010-04-01	
10	<150>	US 61/289,835	
	<151>	2009-12-23	
	<150>	US 61/320,057	
	<151>	2010-04-01	
	<160>	321	
15	<170>	PatentIn versión 3.5	
	<210>	1	
	<211>	393	
	<212>	ADN	
	<213>	Homo sapiens	
20	<400>	1	
		caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaggaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
		tcctgcaagg cttctggata cagcctcaaa gaccactata tggctctgggt gcgacaggcc	120
		cctggccaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccctc agagtgggtgg cacaggctac	180
		ggacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg acccgggaca cgtccaccaa cacagcctac	240
25		atgatactga gcagcctgag atctgacgac acggccgtgt atttctgtgc gagagatggg	300

291
202

gctaagacgg tgtccaattc cggactgtct ttgttgact atcacaaccg tctggacgcc 360
tggggccaag ggacaatggt caccgtctct agc 393

<210> 2

<211> 131

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Gln Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Gly Gln Lys Phe
15 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Ile Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

20 Ala Arg Asp Gly Ala Lys Thr Val Ser Asn Ser Gly Leu Ser Leu Leu
100 105 110

Tyr Tyr His Asn Arg Leu Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
115 120 125

Val Ser Ser

25 130

241
293

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 3

Asp His Tyr Met Val

1 5

<210> 4

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Trp Ile Asn Pro Gln Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Gly Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

15 Gly

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Gly Ala Lys Thr Val Ser Asn Ser Gly Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr

1 5 10 15

His Asn Arg Leu Asp Ala

25 20

293
294

<210> 6

<211> 393

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 6

caggtgcagc tgggtgcagcc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggatt caccctcagc gaccactatc tggctctgggt gcgacaggcc 120

cctggccaag ggtttgagtg gatgggatgg atcaaccctc agagtgggtg cacaggctac 180

gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggact cgtccagcaa cacagcgttc 240

10 atggacctga gcaagctgac atctgacgac acggccgtgt acttctgtgc gagagatggg 300

gctaagacgg tgtctaattc cggactgggt ctactgtatt atcacagccg actggacgcc 360

tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc agc 393

<210> 7

<211> 131

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

20 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Asp His

20 25 30

Tyr Leu Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Gln Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe

25 50 55 60

204
205

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Phe
65 70 75 80
Met Asp Leu Ser Lys Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
5 Ala Arg Asp Gly Ala Lys Thr Val Ser Asn Ser Gly Leu Gly Leu Leu
100 105 110
Tyr Tyr His Ser Arg Leu Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
115 120 125
Val Ser Ser
10 130
<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15 <400> 8
Asp His Tyr Leu Val
1 5
<210> 9
<211> 17
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9
Trp Ile Asn Pro Gln Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
25 Gly

295
296

<210> 10
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 10
Asp Gly Ala Lys Thr Val Ser Asn Ser Gly Leu Gly Leu Leu Tyr Tyr
1 5 10 15
His Ser Arg Leu Asp Ala
20

10 <210> 11
<211> 393
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 11

15 caggtgcacc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaggaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactactatc tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagc atcaaccca aactggtgg cacaaagtat 180
gcacagaaat ttcagggcag ggtcactatg accagggaca cgtccatcag ggcagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgacgac acggccgtct attactgtgc gagagatggg 300

20 gctaaaacga tgactacgtc tggactgtct ttgttgact actacgacgt tatggacgtc 360
tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc agc 393

<210> 12
<211> 131
<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Val His Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 5 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ser Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 10 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Arg Ala Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 15 Ala Arg Asp Gly Ala Lys Thr Met Thr Thr Ser Gly Leu Ser Leu Leu
 100 105 110
 Tyr Tyr Tyr Asp Val Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 115 120 125
 Val Ser Ser
 20 130

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

297
298

<400> 13
Asp Tyr Tyr Leu Asn
1 5
<210> 14
5 <211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14
Ser Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
10 1 5 10 15
Gly

<210> 15
<211> 22
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 15
Asp Gly Ala Lys Thr Met Thr Thr Ser Gly Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr
1 5 10 15
20 Tyr Asp Val Met Asp Val
20

<210> 16
<211> 393
<212> ADN
25 <213> Homo sapiens

298
719

<400> 16
caggtgcagc tgatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgc atcaaccga acagtgggtg cacaaactat 180
5 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggaactga ccaggctcag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagagatggg 300
gctaagacgg tgactacctc cggaatgtct ttgttgact actacgacgt tatggacatc 360
tggggccaag ggacaatggt caccgtctct agc 393

<210> 17
10 <211> 131
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 17
Gln Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
15 1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
20 Gly Cys Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Thr Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
25 85 90 95

297
300

Ala Arg Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Ser Gly Met Ser Leu Leu
100 105 110

Tyr Tyr Tyr Asp Val Met Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
115 120 125

5 Val Ser Ser
130

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 18

Gly Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 19

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Cys Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
20 1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 22

25 <212> PRT

200
301

<213> Homo sapiens

<400> 20

Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Ser Gly Met Ser Leu Leu Tyr Tyr

1 5 10 15

5 Tyr Asp Val Met Asp Ile

20

<210> 21

<211> 393

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 21

caggtgcagc tgggtgcagtc tgaggctgag gtggagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactactata tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgc atcaaccctc acagtgggtg cacaaactat 180
15 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagttga gcaggctaaa atctgacgac acggccgtct attactgtgc gagagatggg 300
gctaaaacgg tgactacctt cggagcgtct ttgttgact actacgacat tatggacgtc 360
tgggggccagg gaaccctggt caccgtctcc agc 393

<210> 22

20 <211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Glu Ala Glu Val Glu Lys Pro Gly Ala

25 1 5 10 15

201
202

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
5 35 40 45
Gly Cys Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
10 Met Glu Leu Ser Arg Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Phe Gly Ala Ser Leu Leu
100 105 110
Tyr Tyr Tyr Asp Ile Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
15 115 120 125
Val Ser Ser
130

<210> 23
20 <211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 23
Asp Tyr Tyr Met Asn
25 1 5

202
303

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 24
Cys Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

10 <210> 25
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 25
15 Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Phe Gly Ala Ser Leu Leu Tyr Tyr
1 5 10 15
Tyr Asp Ile Met Asp Val
20

<210> 26
20 <211> 393
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 26
caggtgcagc tgggtgcagtc tgaggctgag gtggagaaac ctggggcctc agtgaaggtc 60
25 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gacttctata tcaactgggt gcgacaggcc 120

203
304

cctggacagg ggcttgagtg gatgggatcc atcaaccctc acagtgggtg cacacactat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggaactga ccaggctcag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagagatggg 300
gctaaaacgg tgactacctc cggaatgtct ttgttgact actacgacgt tatggacatc 360
5 tggggccaag ggacaatggt caccgtctct agc 393

<210> 27

<211> 131

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 27

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe
15 20 25 30

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

Gly Ser Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr His Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Ser Gly Met Ser Leu Leu
25 100 105 110

204
305

Tyr Tyr Tyr Asp Val Met Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
115 120 125
Val Ser Ser
130

5

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 28
Asp Phe Tyr Ile Asn
1 5

<210> 29
<211> 17

15

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 29

Ser Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

20

Gly

<210> 30
<211> 22
<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

205
306

<400> 30
Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Ser Gly Met Ser Leu Leu Tyr Tyr
1 5 10 15
5 Tyr Asp Val Met Asp Ile
20
<210> 31
<211> 393
<212> ADN
10 <213> Homo sapiens
<400> 31
caggtgcagc tgatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gacttctata tcaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacagg ggcttgagtg gatgggatcc atcaaccctc acagtgggtg cacacactat 180
15 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagttga gaagtctaaa ttctgacgac acggccgtct attactgtgc gagagatggg 300
gctaaaacgg tgactacctt cggagcgtct ttgttgact actacgacat catggacgtc 360
tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc agc 393
<210> 32
20 <211> 131
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 32
Gln Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
25 1 5 10 15

308
307

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30
Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
5 35 40 45
Gly Ser Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr His Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
10 Met Glu Leu Arg Ser Leu Asn Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Phe Gly Ala Ser Leu Leu
100 105 110
Tyr Tyr Tyr Asp Ile Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
15 115 120 125
Val Ser Ser
130

<210> 33
20 <211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 33
Asp Phe Tyr Ile Asn
25 1 5

207
308

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 34

Ser Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

10 <210> 35
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 35

15 Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Phe Gly Ala Ser Leu Leu Tyr Tyr

1 5 10 15

Tyr Asp Ile Met Asp Val

20

<210> 36

20 <211> 393
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 36

caggtgcacc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaggaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

25 tcttgcaagg cttctggata caccttcacc gactactatc tgaactgggt gcgacaggcc 120

288
309

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagc atcaacccca acactggtgg cacaaagtat 180
gcacagaaat ttcggggcag ggtcactatg accagggaca cgtccatcag ggcagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgacgac acggccgtct attactgtgc gagagatggg 300
gctaaaacga tgactacgtc tggactgtct ttgttgact actacgacgt tatggacgtc 360
5 tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc agc 393

<210> 37

<211> 131

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 37

Gln Val His Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

15 20 25 30

Tyr Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ser Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

20 Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Arg Ala Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Gly Ala Lys Thr Met Thr Thr Ser Gly Leu Ser Leu Leu

25 100 105 110

204
30

Tyr Tyr Tyr Asp Val Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

115 120 125

Val Ser Ser

130

5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 38

Asp Tyr Tyr Leu Asn

1 5

<210> 39

<211> 17

15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Ser Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Arg

1 5 10 15

20

Gly

<210> 40

<211> 22

<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

206
311

<400> 40
Asp Gly Ala Lys Thr Met Thr Thr Ser Gly Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr
1 5 10 15
5 Tyr Asp Val Met Asp Val
20
<210> 41
<211> 393
<212> ADN
10 <213> Homo sapiens
<400> 41
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggatt caccctcagc gaccactatc tgggtctgggt gcgacaggcc 120
cctggccaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccctc agagtgggtg cacaggctac 180
15 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggact cgtccagcaa cacagcgttc 240
atggacctga gcaagctgac atctgacgac acggccgtgt acttctgtgc gagagatggg 300
gctaagacgg tgtctaattc cggactgggt ctactgtatt atcacagccg actggacgcc 360
tgggggccaag ggacaatggt caccgtctct agc 393
<210> 42
20 <211> 131
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 42
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
25 1 5 10 15

20
312

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Asp His
20 25 30
Tyr Leu Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
5 35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Gln Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Phe
65 70 75 80
10 Met Asp Leu Ser Lys Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Ala Lys Thr Val Ser Asn Ser Gly Leu Gly Leu Leu
100 105 110
Tyr Tyr His Ser Arg Leu Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
15 115 120 125
Val Ser Ser
130

<210> 43
20 <211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 43
Asp His Tyr Leu Val
25 1 5

313
312

<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 44
Trp Ile Asn Pro Gln Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

10 <210> 45
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 45
15 Asp Gly Ala Lys Thr Val Ser Asn Ser Gly Leu Gly Leu Leu Tyr Tyr
1 5 10 15
His Ser Arg Leu Asp Ala
20

<210> 46
20 <211> 393
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 46
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaggaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
25 tcctgcaagg cttctggata cagcctcaaa gaccactata tggctctgggt gcgacaggcc 120

213
314

cctggccaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccctc agagtgggtg cacaggctac 180
ggacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg acccgggaca cgtccaccaa cacagcctac 240
atgatactga gcagcctgag atctgacgac acggccgtgt atttctgtgc gagagatggg 300
gctaagacgg tgtccaattc cggactgtct ttgttgact atcacaaccg tctggacgcc 360
5 tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc agc 393

<210> 47
<211> 131
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens
<400> 47

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

244
215

Tyr Tyr His Asn Arg Leu Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
115 120 125
Val Ser Ser
130

5

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 48
Asp His Tyr Met Val
1 5

<210> 49
<211> 17

15

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 49

Trp Ile Asn Pro Gln Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Gly Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

20

Gly

<210> 50
<211> 22
<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

245
316

<400> 50

Asp Gly Ala Lys Thr Val Ser Asn Ser Gly Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr

1 5 10 15

His Asn Arg Leu Asp Ala

5 20

<210> 51

<211> 393

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <400> 51

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaggaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggata cagcctcaaa gaccactata tggctctgggt gcgacaggcc 120

cctggccaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccctc agagtgggtg cacaggctac 180

ggacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg acccgggaca cgtccaccaa cacagcctac 240

15 atgatactga gcagcctgag atctgacgac acggccgtgt atttctgtgc gagagatggg 300

gctaaggcgg tgtccaattc cggactgtct ttgttgact atcacaaccg tctggacgcc 360

tggggccaag ggacaatggt caccgtctct agc 393

<210> 52

20 <211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala

25 1 5 10 15

20

277
318

<210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 54
Trp Ile Asn Pro Gln Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Gly Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly
10 <210> 55
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 55
15 Asp Gly Ala Lys Ala Val Ser Asn Ser Gly Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr
1 5 10 15
His Asn Arg Leu Asp Ala
20
<210> 56
20 <211> 393
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 56
caggtgcagc tgatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
25 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgaactgggt gcgacaggcc 120

218
319

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgc atcaaccgga acagtgggtgg cacaaactat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggaactga ccaggctcag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagagatggg 300
gctaagacgg tgactacctc cggaatgtct ttgttgact actacgacgt tatggacatc 360
5 tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc agc 393

<210> 57
<211> 131
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens
<400> 57

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

219
320

Tyr Tyr Tyr Asp Val Met Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
115 120 125
Val Ser Ser
130

5

<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 58
Gly Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 59
<211> 17

15

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 59

Cys Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

20

Gly

<210> 60

<211> 22
<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

220
321

	<400>	60	
	Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Ser Gly Met Ser Leu Leu Tyr Tyr		
	1	5	10
	Tyr Asp Val Met Asp Ile		15
5		20	
	<210>	61	
	<211>	393	
	<212>	ADN	
	<213>	Homo sapiens	
10	<400>	61	
	caggtgcagc tgacgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc		60
	tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgaactgggt gcgacaggcc		120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgc atcaaccgga acagtgggtg cacaaactat		180
	gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac		240
15	atggaactga ccaggctcag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagagatggg		300
	gctaagacgg tgactacctc cggaatgtct ttgttgact actacgacgt tatggacatc		360
	tggggccaag ggacaatggt caccgtctct agc		393
	<210>	62	
20	<211>	131	
	<212>	PRT	
	<213>	Homo sapiens	
	<400>	62	
	Gln Val Gln Leu Thr Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
25	1	5	10
			15

221
322

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
5 35 40 45
Gly Cys Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
10 Met Glu Leu Thr Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Ser Gly Met Ser Leu Leu
100 105 110
Tyr Tyr Tyr Asp Val Met Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
15 115 120 125
Val Ser Ser
130

<210> 63
20 <211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 63
Gly Tyr Tyr Met Asn
25 1 5

222
323

<210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 64
Cys Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

10 <210> 65
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 65
15 Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Ser Gly Met Ser Leu Leu Tyr Tyr
1 5 10 15
Tyr Asp Val Met Asp Ile
20

<210> 66
20 <211> 393
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 66
caggtgcagc tgggtgcagtc tgaggctgag gtggagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
25 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactactata tgaactgggt gcgacaggcc 120

324

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgc atcaaccctc acagtgggtg cacaaactat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagtctac 240
atggagttga gcaggctaaa atctgacgac acggccgtct attactgtgc gagagatggg 300
gctaaaacgg tgactacctt cggagcgtct ttgttgact actacgacat tatggacgtc 360
5 tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc agc 393

<210> 67
<211> 131
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens
<400> 67

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

325

Tyr Tyr Tyr Asp Ile Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
115 120 125
Val Ser Ser
130

5

<210> 68
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 68
Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 69
<211> 17

15

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 69

Cys Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

20

Gly

<210> 70
<211> 22
<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

203
326

<400> 70

Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Phe Gly Ala Ser Leu Leu Tyr Tyr

1 5 10 15

Tyr Asp Ile Met Asp Val

5 20

<210> 71

<211> 393

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <400> 71

caggtgcacc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaggaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctgggata caccttcacc gactactatc tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagc atcaacccca acactggtgg cacaaagtat 180

gcacagaaat ttcagggcag ggtcactatg accagggaca cgtccatcag ggcagcctac 240

15 atggagctga gcagcctgag atctgacgac acggccgtct attactgtgc gagagatggg 300

gctaaaacga tgactacgtc tggactgtct ttgttgact actacgacgt tatggacgtc 360

tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc agc 393

<210> 72

20 <211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Gln Val His Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala

25 1 5 10 15

324
329

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
5 35 40 45
Gly Ser Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Arg Ala Ala Tyr
65 70 75 80
10 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Ala Lys Thr Met Thr Thr Ser Gly Leu Ser Leu Leu
100 105 110
His Tyr Tyr Asp Val Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
15 115 120 125
Val Ser Ser
130

<210> 73
20 <211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 73
Asp Tyr Tyr Leu Asn
25 1 5

328

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 74

Ser Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

10 <210> 75

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

15 Asp Gly Ala Lys Thr Met Thr Thr Ser Gly Leu Ser Leu Leu His Tyr

1 5 10 15

Tyr Asp Val Met Asp Val

20

<210> 76

20 <211> 393

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 76

caggtgcagc tgatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

25 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgaactgggt gcgacaggcc 120

228
329

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgc atcaacccga acagtgggtgg cacaaactat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggaactga ccaggctcag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagagatggg 300
gctaaaacgg tgactacctt cggaatgtct ttgttgact actacgacgt tatggacatc 360
5 tggggccaag ggacaatggg caccgtctct agc 393

<210> 77
<211> 131
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens
<400> 77

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

227
330

Tyr Tyr Tyr Asp Val Met Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
115 120 125
Val Ser Ser
130

5

<210> 78
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 78
Gly Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 79
<211> 17

15

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 79

Cys Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

20

Gly

<210> 80
<211> 22
<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

228
331

<400> 80

Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Phe Gly Met Ser Leu Leu Tyr Tyr

1 5 10 15

Tyr Asp Val Met Asp Ile

5 20

<210> 81

<211> 393

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <400> 81

cagggtgcagc tgatgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgc atcaaccgga acagtgggtg cacaaactat 180

gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240

15 atggagttga gaagtctaaa ttctgacgac acggccgtct attactgtgc gagagatggg 300

gctaagacgg tgactacctc cggaatgtct ttgttgact actacgacgt tatgggcatc 360

tggggccaag ggacaatggt caccgtctct agc 393

<210> 82

20 <211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Gln Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

25 1 5 10 15

229
332

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
5 35 40 45
Gly Cys Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
10 Met Glu Leu Arg Ser Leu Asn Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Ser Gly Met Ser Leu Leu
100 105 110
Tyr Tyr Tyr Asp Val Met Gly Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
15 115 120 125
Val Ser Ser
130

<210> 83
20 <211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 83
Gly Tyr Tyr Met Asn
25 1 5

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 84

Cys Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

10 <210> 85

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

15 Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Ser Gly Met Ser Leu Leu Tyr Tyr

1 5 10 15

Tyr Asp Val Met Gly Ile

20

<210> 86

20 <211> 393

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 86

caggtgcagc tgggtgcagtc tgaggctgag gtggagaaaac ctggggcctc agtgaaggtc 60

25 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gacttctata tcaactgggt gcgacaggcc 120

231
334

cctggacagg ggcttgagtg gatgggatcc atcaaccctc acagtgggtgg cacacactat 180
gcacagaagt ttcaggggcag ggtcaccatg accaggggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggaactga ccaggctcag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagagatggg 300
gctaaaacgg tgactacctc cggaatgtct ttgttgact actacgacgt tatggacatc 360
5 tggggccaag ggacaatggg caccgtctct agc 393

<210> 87
<211> 131
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens
<400> 87

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

732
335

Tyr Tyr Tyr Asp Val Met Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
115 120 125
Val Ser Ser
130

5

<210> 88
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 88
Asp Phe Tyr Ile Asn
1 5

<210> 89
<211> 17

15

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 89

Ser Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

20

Gly

<210> 90
<211> 22
<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

233
336

<400> 90

Asp Gly Ala Lys Thr Val Thr Thr Ser Gly Met Ser Leu Leu Tyr Tyr

1 5 10 15

Tyr Asp Val Met Asp Ile

5 20

<210> 91

<211> 328

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <400> 91

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagat ggtcaccatc 60

tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aagaattatg tgtcctggta ccagcaactc 120

ccagggtgcag cccccaaact cctcatcttt gacaataata agcgaccctc agggactcct 180

gaccgattct ctgggtccaa gtctggcacg tcagccaccc tggtcatcac cggactccag 240

15 acaggggacg aggccgatta ttactgcgga acaccggata gaagcctgag tgtgatattc 300

ggcggaggga ccaaggtcac cgtcctag 328

<210> 92

<211> 109

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 92

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

1 5 10 15

Met Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn

25 20 25 30

234
337

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

Ile Phe Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Thr Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

Ser Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

10 100 105

<210> 93
<211> 13
<212> PRT

15 <213> Homo sapiens
<400> 93

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 94

20 <211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 94

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser

25 1 5

235
338

<210> 95
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 95
Gly Thr Pro Asp Arg Ser Leu Ser Val Ile
1 5 10
<210> 96
<211> 328
10 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 96
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagag ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagatc caacattggg aagaattatg taccctggta ccagcaaccc 120
15 ccaggtacag cccccaaact cctcattttt gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctgggtccaa gtctggcacg tcagccaccc tggccatctc cggactccag 240
gctgcggcacg aggccgatta ctactgcgga acatgggata gcagcctgag tgtggtattc 300
ggcgggggga ccaaggtcac cgtcctag 328
<210> 97
20 <211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 97
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
25 1 5 10 15

337
340

<400> 99
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5
<210> 100
5 <211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 100
Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Val Val
10 1 5 10
<210> 101
<211> 328
<212> ADN
<213> Homo sapiens
15 <400> 101
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aagaattatg taccctggta ccagcagctc 120
ccaggaacag cccccaaact cctcattgat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
20 actggggacg aggccgatta ttactgcgca acatgggata gcagcctggg tgtggtcttc 300
ggcggaggga ccaaggtcac cgtcctag 328
<210> 102
<211> 109
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

238
341

<400> 102

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

<210> 103
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 103

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser
1 5 10
<210> 104
<211> 7
25 <212> PRT

59
342

<213> Homo sapiens
<400> 104
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5
5 <210> 105
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 105
10 Ala Thr Trp Asp Ser Ser Leu Gly Val Val
1 5 10
<210> 106
<211> 328
<212> ADN
15 <213> Homo sapiens
<400> 106
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcacgata 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aaaaattatg taccctggta ccagcagctc 120
ccaggaacag cccccaaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
20 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggaatcac cggaactccag 240
actggggacg aggccgatta tttctgcgga acatgggata gcagcctgag tgtggtattc 300
ggcggaggga ccaaggtcac cgtcctag 328
<210> 107
<211> 109
25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

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

5 1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn

20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

10 Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln

65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu

15 85 90 95

Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 108

20 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser

25 1 5 10

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 109
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5
<210> 110
<211> 10
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 110
Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Val Val
1 5 10
15 <210> 111
<211> 328
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 111
20 cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcttgctctg gaagcagctc caacattggg aaaaattatg tctcctggta ccagcacttc 120
ccaggaacag cccccaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggttccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actgggggacg aggccgatta ttactgcgca acatgggata gaagcctgag tgtggtattc 300
25 ggcgaggaggga ccaagggtcac cgtcctag 328

292
345

<210> 112
<211> 109
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<400> 112
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn
10 20 25 30
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
15 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80
Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Arg Ser Leu
85 90 95
Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
20 100 105

<210> 113
<211> 13
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

243
346

<400> 113
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser
1 5 10
<210> 114
5 <211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 114
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
10 1 5
<210> 115
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15 <400> 115
Ala Thr Trp Asp Arg Ser Leu Ser Val Val
1 5 10
<210> 116
<211> 328
20 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 116
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagat ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aagaattatg tgtcctggta ccagcaactc 120
25 ccaggtgcag cccccaaact cctcatcttt gacaataata agcgaccctc agggactcct 180

284
347

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tggtcacac cggactccag 240
acaggggacg agaccgatta ttactgcgga acaccggata gaagcctgag tgtggtattc 300
ggcggaggga ccaaggtcac cgtcctag 328

<210> 117

5 <211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

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

10 1 5 10 15

Met Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn

20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

15 Ile Phe Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Thr Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Val Ile Thr Gly Leu Gln

65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Thr Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Pro Asp Arg Ser Leu

20 85 90 95

Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 118

<211> 13

25 <212> PRT

248

<213> Homo sapiens
<400> 118
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser
1 5 10

5 <210> 119
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 119

10 Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5
<210> 120
<211> 10
<212> PRT

15 <213> Homo sapiens
<400> 120
Gly Thr Pro Asp Arg Ser Leu Ser Val Val
1 5 10
<210> 121

20 <211> 328
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 121
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60

25 tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aagaattatg tatcctggta ccagcagctc 120

286
249

ccaggaacag cccccaaact cctcattgat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgca acatgggata gcagcctggg tgtggtcttc 300
ggcggaggaa cccagctgat catcctag 328

5 <210> 122
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 122

10 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn
20 25 30
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
15 35 40 45
Ile Asp Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80
20 Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95
Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ile Ile Leu
100 105
<210> 123
25 <211> 13

297
350

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 123
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser
5 1 5 10

<210> 124
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 124
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 125
<211> 10
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 125

Ala Thr Trp Asp Ser Ser Leu Gly Val Val
1 5 10

20 <210> 126
<211> 328
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 126

25 cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagag ggtcaccatc 60

248
351

5 tcttgctctg gaagcagatc caacattggg aagaattatg tctcctggta ccagcaactc 120
ccaggtacag cccccaaact cctcattttt gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctgggtccaa gtctggcacg tcagccaccc tggccatctc cggactccag 240
gctgcgagc aggccgatca ctactgcgga acatgggata gcagcctgag tgtggtattc 300
ggcgggggga ccaaggtcac cgtcctag 328

<210> 127
<211> 109
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens
<400> 127

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

249
352

<210> 128
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 128
Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser
1 5 10
<210> 129
<211> 7
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 129
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5
15 <210> 130
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 130
20 Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Val Val
1 5 10
<210> 131
<211> 328
<212> ADN
25 <213> Homo sapiens

	<400>	131	
	cagtctgtgt	tgacgcagct gccctcagtg tctgcggccc caggacagat ggtcaccatc	60
	tcctgctctg	gaagcagctc caacattggg aagaattatg tgtcctggta ccagcaactc	120
	ccagggtgcag	cccccaaaact cctcatcttt gacaataata agcgaccctc agggactcct	180
5	gaccgattct	ctgggtccaa gtctggcacg tcagccaccc tggtcatcac cggactccag	240
	acaggggacg	aggccgatta ttactgcgga acaccggata gaagcctgag tgtgggtattc	300
	ggcggaggga	ccaaggtcac cgtcctag	328
	<210>	132	
10	<211>	109	
	<212>	PRT	
	<213>	Homo sapiens	
	<400>	132	
	Gln Ser Val Leu Thr Gln Leu Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln		
15	1	5	10
	Met Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn		15
		20	25
	Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu		30
		35	40
20	Ile Phe Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Thr Pro Asp Arg Phe Ser		45
		50	55
	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Val Ile Thr Gly Leu Gln		60
		65	70
	Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Pro Asp Arg Ser Leu		75
25		85	90
			95

281
354

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

- 5 <210> 133
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 133

- 10 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser
1 5 10
<210> 134
<211> 7
<212> PRT

- 15 <213> Homo sapiens
<400> 134
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5
<210> 135

- 20 <211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 135

- Gly Thr Pro Asp Arg Ser Leu Ser Val Val
25 1 5 10

282
355

<210> 136
<211> 328
<212> ADN
<213> Homo sapiens
5 <400> 136
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tccgcggccc caggacagag ggtcaccatc 60
tcttgctctg gaagcagatc caacattggg aagaattatg tctcctggta ccagcaactc 120
ccaggtagac cccccaaact cctcattttt gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctgggtccaa gtctggcacg tcagccaccc tggccatctc cggaactccag 240
10 gctgcggacg aggccgatta ctactgcgga acatgggata gcagcctgag tgtggtattc 300
ggcgggggga ccaagggtcac cgtcctag 328

<210> 137
<211> 109
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 137
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
20 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Lys Asn
20 25 30
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Phe Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
25 50 55 60

65 70 75 80

85 90 95

100 105

<211> 13

<213> Homo sapiens

Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser

15 <210> 139

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

20 Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 140

<211> 10

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

25
35*

<400> 140
Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Val Val
1 5 10
<210> 141
5 <211> 328
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 141
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagat ggtcaccatc 60
10 tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aagaattatg tgtcctggta ccagcaactc 120
ccagggtgcag cccccaaact cctcatcttt gacaataata agcgaccctc agggactcct 180
gaccgattct ctgggtccaa gtctggcacg tcagccaccc tggtcatcac cggactccag 240
acaggggacg aggccgatta ttactgcgga acaccggata gaagcctgag tgtggtattc 300
ggcggaggga ccaaggtcac cgtcctag 328
15 <210> 142
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 142
20 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Met Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn
20 25 30
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu
25 35 40 45

Ile Phe Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Thr Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Val Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80
5 Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Pro Asp Arg Ser Leu
85 90 95
Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105
<210> 143
10 <211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 143
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser
15 1 5 10
<210> 144
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
20 <400> 144
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5
<210> 145
<211> 10
25 <212> PRT

758
359

<213> Homo sapiens
<400> 145
Gly Thr Pro Asp Arg Ser Leu Ser Val Val
1 5 10
5 <210> 146
<211> 328
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 146
10 cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aaaaattatg tatcctggta ccagcactcc 120
ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccccc agggattcct 180
gaccgattct ctggttccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgca acatgggata gaagcctgag tgtggtattc 300
15 ggcggaggga ccaaggtcac cgtcctag 328

<210> 147
<211> 109
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens
<400> 147
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn
25 20 25 30

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

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

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

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

Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

10 100 105

<210> 148

<211> 13

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 148

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 149

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Pro

25 1 5

258
361

<210> 150
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 150
Ala Thr Trp Asp Arg Ser Leu Ser Val Val
1 5 10
<210> 151
<211> 328
10 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 151
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aaaaattatg tatcctggta ccagcacttc 120
15 ccaggaacag cccccaaact cctcatTTat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggttccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgca acatgggata gaagcctgag tgtggtattc 300
ggcggaggga ccaaggtcac cgtcctag 328
<210> 152
20 <211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 152
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
25 1 5 10 15

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

<210> 153
15 <211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 153
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser
20 1 5 10

<210> 154
<211> 7
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

760
363

<400> 154
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5
<210> 155
5 <211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 155
Ala Thr Trp Asp Arg Ser Leu Ser Val Val
10 1 5 10
<210> 156
<211> 328
<212> ADN
<213> Homo sapiens
15 <400> 156
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagag ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagatc caacattggg aagaattatg tatcctggta ccagcaactc 120
ccaggtacag cccccaaact cctcattttt gacaataata agcgaccctc aggggttcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tggccatctc cggactccag 240
20 gctgcggacg aggccgatta ctactgcgga acatgggata gcagcctgag tgttggtattc 300
ggcgggggga ccaaggtcac cgtcctag 328
<210> 157
<211> 109
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<400> 157

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Lys Asn
5 20 25 30

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

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

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

Ala Ala Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
15 100 105

<210> 158

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 158

Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 159

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 159
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5
5 <210> 160
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 160
10 Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Val Val
1 5 10
<210> 161
<211> 331
<212> ADN
15 <213> Homo sapiens
<400> 161
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagag ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagatc caacattggg aagaattatg tatcctggta ccagcaactc 120
ccaggtacag cccccaaact cctcattttt gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
20 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tggccatctc cggactccag 240
gctgcggacg aggccgatta ctactgcgga acatgggata gtgacctgag tgcttatgtc 300
ttcggaaactg ggaccaaggt caccgtccta g 331
<210> 162
<211> 110
25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 162

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

5 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Lys Asn

20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

10 Ile Phe Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ala Ala Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Asp Leu

15 85 90 95

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105 110

<210> 163

20 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 163

Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser

25 1 5 10

<210> 164

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 164

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 165

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 165

Gly Thr Trp Asp Ser Asp Leu Ser Ala Tyr Val

1 5 10

15 <210> 166

<211> 328

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 166

20 cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagag ggtcaccatc 60

tcttgctctg gaagcagatc caacattggg aagaattatg tatcctggta ccagcaactc 120

ccaggtacag cccccaaact cctcattttt gacaataata agcgaccctc agggattcct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tggccatctc cggactccag 240

gctgcggacg aggccgatta ctactgcgga acatgggata gcagcctgag tgttggtattc 300

25 ggcgggggga ccaaggtcac cgtcctag 328

165
368

<210> 167

<211> 109

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 167

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Lys Asn

10 20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Phe Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

15 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ala Ala Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu

85 90 95

Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

20 100 105

<210> 168

<211> 13

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 168
Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser
1 5 10
<210> 169
5 <211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 169
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
10 1 5
<210> 170
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15 <400> 170
Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Val Val
1 5 10
<210> 171
<211> 328
20 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 171
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaaacagctc caacattggg aagaattatg tatcctggta ccagcagctc 120
25 ccaggaacag cccccaaact cctcattgat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180

267
370

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actgggggacg aggccgatta ttactgcgca acatgggata gcagcctggg tgtggtcttc 300
ggcggaggga ccaaggtcac cgtcctag 328

<210> 172

5 <211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 172

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

10 1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Asn Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn

20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

15 Ile Asp Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln

65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Ser Ser Leu

20 85 90 95

Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 173

<211> 13

25 <212> PRT

268
371

<213> Homo sapiens
<400> 173
Ser Gly Asn Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser
1 5 10
5 <210> 174
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 174
10 Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5
<210> 175
<211> 10
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens
<400> 175
Ala Thr Trp Asp Ser Ser Leu Gly Val Val
1 5 10
<210> 176
20 <211> 328
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 176
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagag ggtcaccatc 60
25 tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aagaattatg tatcctggta ccagcagctc 120

269
372

5

ccaggaacag cccccaaact cctcattgat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgca acatgggata gcagcctggg tgtggtcttc 300
ggcggaggaa cccagctgat catcctag 328

<210> 177
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 177
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn
20 25 30

15

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Asp Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln

20

65 70 75 80
Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95
Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ile Ile Leu
100 105

25

270
373

<210> 178
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 178
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser
1 5 10
<210> 179
<211> 7
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 179
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5
15 <210> 180
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 180
20 Ala Thr Trp Asp Ser Ser Leu Gly Val Val
1 5 10
<210> 181
<211> 30
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

271
324

<400> 181
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
5 20 25 30
<210> 182
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
10 <400> 182
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10
<210> 183
<211> 32
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 183
Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
20 Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30
<210> 184
<211> 32
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

375

<400> 184
Arg Val Thr Ser Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Val Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
5 20 25 30
<210> 185
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
10 <400> 185
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Ser Cys
20
15 <210> 186
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 186
20 Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 187
<211> 32
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

277
576

<400> 187

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr

1 5 10 15

Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

5 20 25 30

<210> 188

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 188

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

1 5 10 15

Thr Val Ser Ser

20

15 <210> 189

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 189

20 Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10 15

<210> 190

<211> 16

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

279
377

<400> 190
Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

5 <210> 191
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 191

10 Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15
<210> 192
<211> 12
<212> PRT

15 <213> Homo sapiens
<400> 192
Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
1 5 10
<210> 193

20 <211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 193
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

25 1 5 10

275
378

<210> 194
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 194
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10
<210> 195
<211> 12
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 195
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10
15 <210> 196
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
20 <223> Cebador 179-Je
<400> 196
agagaaccca ctgcttactg
<210> 197
<211> 17
25 <212> PRT

246
379

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Péptido sintético
5 <400> 197
Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr Thr Leu Lys Tyr Gly Asp Val Val Gly
1 5 10 15
Val

10 <210> 198
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

15 <223> Cebador 074-Je
<400> 198
gtcagwccca gtcaggacac agc 23
<210> 199
<211> 23

20 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador 075-Je
<400> 199

25 actcctcagt tcaccttctc acm 23

380

	<210>	200	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 076-Je	
	<400>	200	
		tcagtttagga cccagasgga a	21
10	<210>	201	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 150-Je	
	<400>	201	
		caacaggcag gcaggggcag caag	24
	<210>	202	
	<211>	24	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 151-Je	
	<400>	202	
25		cacctgcagg tcagggccaa gggtt	24

278
381

	<210>	203	
	<211>	39	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 077-Je	
	<400>	203	
		ctgaagcttc catggacatg aggggtccccg ctcagctcc	39
10	<210>	204	
	<211>	41	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 078-Je	
	<400>	204	
		ctgaggcttc catgaggctc cctgctcagc tcctggggct g	41
	<210>	205	
	<211>	41	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 007-Je	
	<400>	205	
25		ctgaagcttc catggaagcc ccagcgcagc ttctcttcct c	41

224
387

	<210>	206	
	<211>	42	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 152-Je	
	<400>	206	
		ctgaagcttc catggtgttg cagacccagg tcttcatttc tc	42
10	<210>	207	
	<211>	42	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 153-Je	
	<400>	207	
		ctgaagcttc catggggtcc caggttcacc tcctcagctt cc	42
	<210>	208	
	<211>	32	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 066-Je	
	<400>	208	
25		tagagcgctt gatttccacc ttggtccctt gg	32

280
383

	<210>	209	
	<211>	32	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 067-Je	
	<400>	209	
	tagagcgctt gatctccagc ttggtcccct	gg	32
10	<210>	210	
	<211>	32	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 068-Je	
	<400>	210	
	tagagcgctt gatatccact ttggtcccag	gg	32
	<210>	211	
	<211>	32	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 069-Je	
	<400>	211	
25	tagagcgctt gatctccacc ttggtccctc	cg	32

284
784

	<210>	212	
	<211>	32	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 070-Je	
	<400>	212	
	tagagcgcgtt aatctccagt cgtgtccctt gg		32
10	<210>	213	
	<211>	23	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 258-Je	
	<400>	213	
	caggactcag gacaatctcc agc		23
	<210>	214	
	<211>	18	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 259-Je	
	<400>	214	
25	yyycsggacg tcyycacc		18

282
385

	<210>	215	
	<211>	18	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 260-Je	
	<400>	215	
	atctgggggk	ctyycrcc	18
10	<210>	216	
	<211>	37	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 261-Je	
	<400>	216	
	gataagcttc	catggcctgs tcccctctcc tcctcac	37
	<210>	217	
	<211>	35	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 262-Je	
	<400>	217	
25	gataagcttc	catggcctgg gctctgctcc tcctc	35

	<210>	218	
	<211>	35	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 263-Je	
	<400>	218	
	gataagcttc catggcctgg acccctctcc tsctc		35
10	<210>	219	
	<211>	26	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 264-Je	
	<400>	219	
	gagcctagga cggtagacctt ggtccc		26
	<210>	220	
	<211>	29	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 265-Je	
	<400>	220	
25	gagcctagga tgatcagctg gggttcctcc		29

284
387

	<210>	221	
	<211>	29	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 266-Je	
	<400>	221	
		gagcctagga cggtcagctc gctcccctc	29
10	<210>	222	
	<211>	29	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 267-Je	
	<400>	222	
		gagcctaggg cggtcagctg ggtgcctcc	29
	<210>	223	
	<211>	23	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 84-B	
	<400>	223	
25		ccctgagagc acagytccctc acc	23

285
388

	<210>	224	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 155-Je	
	<400>	224	
		agtgactcct gtgcmccacc	20
10	<210>	225	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 85-B	
	<400>	225	
		gcactgaaca cagaggcatac a	21
	<210>	226	
	<211>	22	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 161-Je	
	<400>	226	
25		cmtggayctc mtgyrcraga ac	22

~~286~~
389

	<210>	227	
	<211>	28	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 162-Je	
	<400>	227	
		agggttcat tttctgtcct ccaccatc	28
10	<210>	228	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 154-Je	
	<400>	228	
		gggcagtcac cagagctcca gaca	24
	<210>	229	
	<211>	41	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 001-Je	
	<400>	229	
25		ctgaagcttc catggactgg acctggagga tcctcttctt g	41

28
390

	<210>	230	
	<211>	38	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 158-Je	
	<400>	230	
		ctgaagcttc catggacaca ctttgctcca cgctcctg	38
10	<210>	231	
	<211>	42	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 003-Je	
	<400>	231	
		ctgaagcttc catggagttt gggctgagct gggttttcct tg	42
	<210>	232	
	<211>	42	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 159-Je	
	<400>	232	
25		ctgaagcttc catgaaacac ctgtggttct tcctcctsct gg	42

288
391

	<210>	233	
	<211>	42	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 156-Je	
	<400>	233	
		ctgaagcttc catgggggtca accgccatcc tcgccctcct cc	42
10	<210>	234	
	<211>	42	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 157-Je	
	<400>	234	
		ctgaagcttc catgtctgtc tccttcctca tcttcctgcc cg	42
	<210>	235	
	<211>	34	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 062-Je	
	<400>	235	
25		tagagcgctg gagacggtga ccagggttcc ctgg	34

	<210>	236	
	<211>	33	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 063-Je	
	<400>	236	
	tagagcgctg	gagacagtga ccagggtgcc acg	33
10	<210>	237	
	<211>	34	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 065-Je	
	<400>	237	
	tagagcgcta	gagacggtga ccattgtccc ttgg	34
	<210>	238	
	<211>	35	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 064-Je	
	<400>	238	
25	tagagcgctg	gagacggtga ccgtggtgcc ttttt	35

290
393

<210> 239
<211> 906
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 239

Met Glu Ser Arg Ile Trp Cys Leu Val Val Cys Val Asn Leu Cys Ile
1 5 10 15
Val Cys Leu Gly Ala Ala Val Ser Ser Ser Ser Thr Ser His Ala Thr
 20 25 30
10 Ser Ser Thr His Asn Gly Ser His Thr Ser Arg Thr Thr Ser Ala Gln
 35 40 45
Thr Arg Ser Val Tyr Ser Gln His Val Thr Ser Ser Glu Ala Val Ser
 50 55 60
His Arg Ala Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr Thr Leu Lys Tyr Gly Asp
15 65 70 75 80
Val Val Gly Val Asn Thr Thr Lys Tyr Pro Tyr Arg Val Cys Ser Met
 85 90 95
Ala Gln Gly Thr Asp Leu Ile Arg Phe Glu Arg Asn Ile Ile Cys Thr
 100 105 110
20 Ser Met Lys Pro Ile Asn Glu Asp Leu Asp Glu Gly Ile Met Val Val
 115 120 125
Tyr Lys Arg Asn Ile Val Ala His Thr Phe Lys Val Arg Val Tyr Gln
 130 135 140
Lys Val Leu Thr Phe Arg Arg Ser Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr
25 145 150 155 160

291
394

	Leu	Leu	Gly	Ser	Asn	Thr	Glu	Tyr	Val	Ala	Pro	Pro	Met	Trp	Glu	Ile	
							165				170					175	
	His	His	Ile	Asn	Lys	Phe	Ala	Gln	Cys	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ser	Arg	Val	
5							180				185					190	
	Ile	Gly	Gly	Thr	Val	Phe	Val	Ala	Tyr	His	Arg	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asn	
							195				200					205	
	Lys	Thr	Met	Gln	Leu	Ile	Pro	Asp	Asp	Tyr	Ser	Asn	Thr	His	Ser	Thr	
							210				215					220	
10	Arg	Tyr	Val	Thr	Val	Lys	Asp	Gln	Trp	His	Ser	Arg	Gly	Ser	Thr	Trp	
							225				230					235	
	Leu	Tyr	Arg	Glu	Thr	Cys	Asn	Leu	Asn	Cys	Met	Leu	Thr	Ile	Thr	Thr	
							245				250					255	
	Ala	Arg	Ser	Lys	Tyr	Pro	Tyr	His	Phe	Phe	Ala	Thr	Ser	Thr	Gly	Asp	
15							260				265					270	
	Val	Val	Tyr	Ile	Ser	Pro	Phe	Tyr	Asn	Gly	Thr	Asn	Arg	Asn	Ala	Ser	
							275				280					285	
	Tyr	Phe	Gly	Glu	Asn	Ala	Asp	Lys	Phe	Phe	Ile	Phe	Pro	Asn	Tyr	Thr	
							290				295					300	
20	Ile	Val	Ser	Asp	Phe	Gly	Arg	Pro	Asn	Ala	Ala	Pro	Glu	Thr	His	Arg	
							305				310					315	
	Leu	Val	Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Ala	Asp	Ser	Val	Ile	Ser	Trp	Asp	Ile	
							325				330					335	
	Gln	Asp	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Cys	Gln	Leu	Thr	Phe	Trp	Glu	Ala	Ser	
25							340				345					350	

292
395

Glu Arg Thr Ile Arg Ser Glu Ala Glu Asp Ser Tyr His Phe Ser Ser
355 360 365

Ala Lys Met Thr Ala Thr Phe Leu Ser Lys Lys Gln Glu Val Asn Met
5 370 375 380

Ser Asp Ser Ala Leu Asp Cys Val Arg Asp Glu Ala Ile Asn Lys Leu
385 390 395 400

Gln Gln Ile Phe Asn Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Tyr Glu Lys Tyr Gly
405 410 415

10 Asn Val Ser Val Phe Glu Thr Ser Gly Gly Leu Val Val Phe Trp Gln
420 425 430

Gly Ile Lys Gln Lys Ser Leu Val Glu Leu Glu Arg Leu Ala Asn Arg
435 440 445

Ser Ser Leu Asn Ile Thr His Arg Thr Arg Arg Ser Thr Ser Asp Asn
15 450 455 460

Asn Thr Thr His Leu Ser Ser Met Glu Ser Val His Asn Leu Val Tyr
465 470 475 480

Ala Gln Leu Gln Phe Thr Tyr Asp Thr Leu Arg Gly Tyr Ile Asn Arg
485 490 495

20 Ala Leu Ala Gln Ile Ala Glu Ala Trp Cys Val Asp Gln Arg Arg Thr
500 505 510

Leu Glu Val Phe Lys Glu Leu Ser Lys Ile Asn Pro Ser Ala Ile Leu
515 520 525

Ser Ala Ile Tyr Asn Lys Pro Ile Ala Ala Arg Phe Met Gly Asp Val
25 530 535 540

293
796

Leu Gly Leu Ala Ser Cys Val Thr Ile Asn Gln Thr Ser Val Lys Val
545 550 555 560
Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu Ser Pro Gly Arg Cys Tyr Ser Arg
5 565 570 575
Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala Asn Ser Ser Tyr Val Gln Tyr Gly
580 585 590
Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu Leu Gly Asn His Arg Thr Glu
595 600 605
10 Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ser Ala
610 615 620
Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Lys Arg Met Ile Asp Leu Ser Ser
625 630 635 640
Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile Ala Leu Asp Ile Asp Pro Leu Glu
15 645 650 655
Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu Arg
660 665 670
Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser
675 680 685
20 Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu Asp Lys Val Val Asp Pro Leu
690 695 700
Pro Pro Tyr Leu Lys Gly Leu Asp Asp Leu Met Ser Gly Leu Gly Ala
705 710 715 720
Ala Gly Lys Ala Val Gly Val Ala Ile Gly Ala Val Gly Gly Ala Val
25 725 730 735

294
397

Ala Ser Val Val Glu Gly Val Ala Thr Phe Leu Lys Asn Pro Phe Gly
740 745 750

Ala Phe Thr Ile Ile Leu Val Ala Ile Ala Val Val Ile Ile Thr Tyr
755 760 765

5 Leu Ile Tyr Thr Arg Gln Arg Arg Leu Cys Thr Gln Pro Leu Gln Asn
770 775 780

Leu Phe Pro Tyr Leu Val Ser Ala Asp Gly Thr Thr Val Thr Ser Gly
785 790 795 800

Ser Thr Lys Asp Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser Tyr Glu Glu Ser
10 805 810 815

Val Tyr Asn Ser Gly Arg Lys Gly Pro Gly Pro Pro Ser Ser Asp Ala
820 825 830

Ser Thr Ala Ala Pro Pro Tyr Thr Asn Glu Gln Ala Tyr Gln Met Leu
835 840 845

15 Leu Ala Leu Ala Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Ala Gln Gln Asn Gly
850 855 860

Thr Asp Ser Leu Asp Gly Gln Thr Gly Thr Gln Asp Lys Gly Gln Lys
865 870 875 880

Pro Asn Leu Leu Asp Arg Leu Arg His Arg Lys Asn Gly Tyr Arg His
20 885 890 895

Leu Lys Asp Ser Asp Glu Glu Glu Asn Val
900 905

<210> 240
<211> 907
25 <212> PRT

295
348

<213> Homo sapiens
<400> 240

Met Glu Ser Arg Ile Trp Cys Leu Val Val Cys Val Asn Leu Cys Ile
5 1 5 10 15
Val Cys Leu Gly Ala Ala Val Ser Ser Ser Ser Thr Arg Gly Thr Ser
20 25 30
Ala Thr His Ser His His Ser Ser His Thr Thr Ser Ala Ala His Ser
35 40 45
10 Arg Ser Gly Ser Val Ser Gln Arg Val Thr Ser Ser Gln Thr Val Ser
50 55 60
His Gly Val Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr Thr Leu Lys Tyr Gly Asp
65 70 75 80
Val Val Gly Val Asn Thr Thr Lys Tyr Pro Tyr Arg Val Cys Ser Met
15 85 90 95
Ala Gln Gly Thr Asp Leu Ile Arg Phe Glu Arg Asn Ile Val Cys Thr
100 105 110
Ser Met Lys Pro Ile Asn Glu Asp Leu Asp Glu Gly Ile Met Val Val
115 120 125
20 Tyr Lys Arg Asn Ile Val Ala His Thr Phe Lys Val Arg Val Tyr Gln
130 135 140
Lys Val Leu Thr Phe Arg Arg Ser Tyr Ala Tyr Ile His Thr Thr Tyr
145 150 155 160
Leu Leu Gly Ser Asn Thr Glu Tyr Val Ala Pro Pro Met Trp Glu Ile
25 165 170 175

246
399

	His	His	Ile	Asn	Ser	His	Ser	Gln	Cys	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ser	Arg	Val
				180					185					190		
	Ile	Ala	Gly	Thr	Val	Phe	Val	Ala	Tyr	His	Arg	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asn
5			195					200					205			
	Lys	Thr	Met	Gln	Leu	Met	Pro	Asp	Asp	Tyr	Ser	Asn	Thr	His	Ser	Thr
			210					215					220			
	Arg	Tyr	Val	Thr	Val	Lys	Asp	Gln	Trp	His	Ser	Arg	Gly	Ser	Thr	Trp
	225					230					235				240	
10	Leu	Tyr	Arg	Glu	Thr	Cys	Asn	Leu	Asn	Cys	Met	Val	Thr	Ile	Thr	Thr
				245						250				255		
	Ala	Arg	Ser	Lys	Tyr	Pro	Tyr	His	Phe	Phe	Ala	Thr	Ser	Thr	Gly	Asp
				260						265				270		
	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Pro	Phe	Tyr	Asn	Gly	Thr	Asn	Arg	Asn	Ala	Ser
15			275						280					285		
	Tyr	Phe	Gly	Glu	Asn	Ala	Asp	Lys	Phe	Phe	Ile	Phe	Pro	Asn	Tyr	Thr
			290						295					300		
	Ile	Val	Ser	Asp	Phe	Gly	Arg	Pro	Asn	Ser	Ala	Leu	Glu	Thr	His	Arg
	305					310					315				320	
20	Leu	Val	Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Ala	Asp	Ser	Val	Ile	Ser	Trp	Asp	Ile
				325							330				335	
	Gln	Asp	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Cys	Gln	Leu	Thr	Phe	Trp	Glu	Ala	Ser
				340						345				350		
	Glu	Arg	Thr	Ile	Arg	Ser	Glu	Ala	Glu	Asp	Ser	Tyr	His	Phe	Ser	Ser
25			355							360				365		

297
400

	Ala	Lys	Met	Thr	Ala	Thr	Phe	Leu	Ser	Lys	Lys	Gln	Glu	Val	Asn	Met
	370							375								380
	Ser	Asp	Ser	Ala	Leu	Asp	Cys	Val	Arg	Asp	Glu	Ala	Ile	Asn	Lys	Leu
5	385					390					395					400
	Gln	Gln	Ile	Phe	Asn	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Thr	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Gly
					405					410						415
	Asn	Val	Ser	Val	Phe	Glu	Thr	Thr	Gly	Gly	Leu	Val	Val	Phe	Trp	Gln
					420					425						430
10	Gly	Ile	Lys	Gln	Lys	Ser	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	Arg	Leu	Ala	Asn	Arg
			435						440							445
	Ser	Ser	Leu	Asn	Leu	Thr	His	Asn	Arg	Thr	Lys	Arg	Ser	Thr	Asp	Gly
			450						455							460
	Asn	Asn	Ala	Thr	His	Leu	Ser	Asn	Met	Glu	Ser	Val	His	Asn	Leu	Val
15	465					470						475				480
	Tyr	Ala	Gln	Leu	Gln	Phe	Thr	Tyr	Asp	Thr	Leu	Arg	Gly	Tyr	Ile	Asn
					485						490					495
	Arg	Ala	Leu	Ala	Gln	Ile	Ala	Glu	Ala	Trp	Cys	Val	Asp	Gln	Arg	Arg
					500					505						510
20	Thr	Leu	Glu	Val	Phe	Lys	Glu	Leu	Ser	Lys	Ile	Asn	Pro	Ser	Ala	Ile
					515						520					525
	Leu	Ser	Ala	Ile	Tyr	Asn	Lys	Pro	Ile	Ala	Ala	Arg	Phe	Met	Gly	Asp
					530						535					540
	Val	Leu	Gly	Leu	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ile	Asn	Gln	Thr	Ser	Val	Lys
25	545					550						555				560



199
402

Gly Ala Phe Thr Ile Ile Leu Val Ala Ile Ala Val Val Ile Ile Ile
755 760 765
Tyr Leu Ile Tyr Thr Arg Gln Arg Arg Leu Cys Met Gln Pro Leu Gln
770 775 780
5 Asn Leu Phe Pro Tyr Leu Val Ser Ala Asp Gly Thr Thr Val Thr Ser
785 790 795 800
Gly Asn Thr Lys Asp Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser Tyr Glu Glu
805 810 815
Ser Val Tyr Asn Ser Gly Arg Lys Gly Pro Gly Pro Pro Ser Ser Asp
10 820 825 830
Ala Ser Thr Ala Ala Pro Pro Tyr Thr Asn Glu Gln Ala Tyr Gln Met
835 840 845
Leu Leu Ala Leu Val Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Ala Gln Gln Asn
850 855 860
15 Gly Thr Asp Ser Leu Asp Gly Gln Thr Gly Thr Gln Asp Lys Gly Gln
865 870 875 880
Lys Pro Asn Leu Leu Asp Arg Leu Arg His Arg Lys Asn Gly Tyr Arg
885 890 895
His Leu Lys Asp Ser Asp Glu Glu Glu Asn Val
20 900 905

<210> 241
<211> 375
<212> ADN
25 <213> Homo sapiens

200
403

<400> 241

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcggc gttggtgact cctactgggg ctggctccgc 120

cagtccccag ggaagggact ggagtcgatt gggagtatat attttactgg gaccaccctc 180

5 tacaacccgt ccttcaagag tcgagtcacc atatccgtag acccgcccaa gaagcagttc 240

tccctgaacc tgaagtctgt gaccgccgca gacacggcta tttactattg cgccagacac 300

gcctatgact tttgggttcg tggggtgtcc tggatcgccc cctggggccc gggaattttg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 242

10 <211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 242

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

15 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Gly Val Gly

20 25 30

Asp Ser Tyr Trp Gly Trp Leu Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

20 Ser Ile Gly Ser Ile Tyr Phe Thr Gly Thr Thr Leu Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Phe Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Pro Pro Lys Lys Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Asn Leu Lys Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr

25 85 90 95

Cys Ala Arg His Ala Tyr Asp Phe Trp Val Arg Gly Val Ser Trp Ile
100 105 110

Ala Pro Trp Gly Pro Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

5 <210> 243
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 243

10 Val Gly Asp Ser Tyr Trp Gly
1 5
<210> 244
<211> 16
<212> PRT

15 <213> Homo sapiens
<400> 244

Ser Ile Tyr Phe Thr Gly Thr Thr Leu Tyr Asn Pro Ser Phe Lys Ser
1 5 10 15
<210> 245

20 <211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 245

His Ala Tyr Asp Phe Trp Val Arg Gly Val Ser Trp Ile Ala Pro
25 1 5 10 15

302
405

<210> 246
<211> 375
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5 <400> 246

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatgagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
ccaggggaagg gactggagtg gattggatat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
10 aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agacgtgcgt 300
agcagcagcc ctccagtcta ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360
gtcaccgtct cctca 375

<210> 247
<211> 125

15 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 247

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
20 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Met Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
25 50 55 60

65 70 75 80 .

85 90 95

100 105 110

115 120 125

10 <211> 5

<213> Homo sapiens

Ser Tyr Tyr Trp Ser

<210> 249

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 249

1 5 10 15

<210> 250

<211> 17

25 <212> PRT

384
467

```
<213> Homo sapiens
<400> 250
Asp Val Arg Ser Ser Ser Pro Pro Val Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
1           5           10           15

5 Val

<210> 251
<211> 390
<212> ADN
10 <213> Homo sapiens
<400> 251
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccggga ctggtgaagc ctcgggagac cctgtccctc 60
atctgcactg tctctggtgc ccccattagg agttactact ggagctggat ccggcagtcc 120
ccaggaaggg gactggagta cattgggtgt atcaacacca atgggaggtc caactacaac 180
15 ccctccctca ggggtcgagt caccatatca gtggactcgt ccagaaatca gttctccctg 240
acggtcagct ctctgaccgc agcggacacg gccgtgtatt actgtgcgac tgcaagccaa 300
caccgctacg attctttgac tggctcttat cgctattatc cctatgtaat ggacgtctgg 360
ggccgcggga ccacggtcac cgtttcctca 390

<210> 252
20 <211> 130
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 252
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
25 1           5           10           15
```

305
408

Thr Leu Ser Leu Ile Cys Thr Val Ser Gly Ala Pro Ile Arg Ser Tyr
20 25 30

5 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Cys Ile Asn Thr Asn Gly Arg Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Arg
50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Gln Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

10 Thr Val Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Thr Ala Ser Gln His Arg Tyr Asp Ser Leu Thr Gly Ser Tyr Arg Tyr
100 105 110

Tyr Pro Tyr Val Met Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Thr Val Thr Val
15 115 120 125

Ser Ser
130

20 <210> 253
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 253

Ser Tyr Tyr Trp Ser
25 1 5

206
409

<210> 254
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 254
Cys Ile Asn Thr Asn Gly Arg Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Gly
1 5 10 15
<210> 255
<211> 22
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 255
Ala Ser Gln His Arg Tyr Asp Ser Leu Thr Gly Ser Tyr Arg Tyr Tyr
1 5 10 15
15 Pro Tyr Val Met Asp Val
20
<210> 256
<211> 360
<212> ADN
20 <213> Homo sapiens
<400> 256
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tgtctggtgc ctccatcgac aggagtaactt actactgggg ctggatccgc 120
cagcccccag ggaagggcct ggaatggatt gcaaatatct attataatgg gagggccgtc 180
25 tacagcccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatcagtag acacgtccaa gaatcagttc 240

307
410

tccctgaagg tgaggtotct gaccgccgca gacacggctg tgtattattg tgcgacccgg 300
tggaattatt tottcgaactt tgactattgg ggccgggggaa ccotggtcac cgtctcctca 360

<210> 257

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 257

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

25

308
411

<210> 258
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 258
Arg Ser Thr Tyr Tyr Trp Gly
1 5
<210> 259
<211> 16
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 259
Asn Ile Tyr Tyr Asn Gly Arg Ala Val Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15
15 <210> 260
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 260
20 Arg Trp Asn Tyr Phe Phe Asp Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 261
<211> 336
<212> ADN
25 <213> Homo sapiens

<400> 261

gatattgtga tgaccaaatc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca gaccctcctg catagtaatg gaaacaatta tttggattgg 120

tacctacaga agccagggca gtctccgcaa ctctgatct attatgcttc taatcgggcc 180

5 tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggttcaggca catctttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg gggctgaaga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaatctccg 300

ctcactttcg gcggagggac caagctggag atcaaaa 336

<210> 262

10 <211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 262

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

15 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

20 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Gly Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

25 85 90 95

310
413

Leu Gln Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

5 <210> 263
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 263

10 Arg Ser Ser Gln Thr Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15
<210> 264
<211> 7
<212> PRT

15 <213> Homo sapiens
<400> 264
Tyr Ala Ser Asn Arg Ala Ser
1 5
<210> 265

20 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 265

Met Gln Ala Leu Gln Ser Pro Leu Thr
25 1 5

311
414

<210> 266
<211> 336
<212> ADN
<213> Homo sapiens
5 <400> 266
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
tccgggggcc ctgacagggtt cagtggcagt ggattaggca cagattttac actgaaaatc 240
10 agcagagtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactcct 300
cggacttttg gccaggggac caagctggag atcaaaa 336

<210> 267
<211> 112
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 267
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
20 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
25 50 55 60

$$\frac{312}{41}$$

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Leu Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85 90 95

5 Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 268

<211> 16

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 268

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1 5 10 15

15 <210> 269

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 269

20 Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 270

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 270
Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Arg Thr
1 5
<210> 271
5 <211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 271
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtatgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
10 atcacttgcc aggcgagtca ggacattagg aagtctttaa attggtatca gaagaaagta 120
gggatagccc ctaaagtcct gatctacgac gcatccaatt tggaaacagg cgtcccatca 180
aggttcagtg gaagtggatc tgggacacat ttacottca ccatcggcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacatatta ctgtcaacat tacgataatt ttccgcccac ttccggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321
15 <210> 272
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 272
20 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Tyr Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Lys Ser
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Lys Lys Val Gly Ile Ala Pro Lys Val Leu Ile
25 35 40 45

2/4
417

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Phe Thr Ile Gly Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
5 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asp Asn Phe Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 273
10 <211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 273
Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Lys Ser Leu Asn
15 1 5 10
<210> 274
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
20 <400> 274
Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5
<210> 275
<211> 9
25 <212> PRT

215
418

<213> Homo sapiens
<400> 275
Gln His Tyr Asp Asn Phe Pro Pro Thr
1 5
5 <210> 276
<211> 324
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 276
10 cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tcttggttctg gaagcagttc caacatcgaa actaattatg tatcctggta ccagcagttc 120
ccaggaacgg cccccaagct cctcatctat aggaataatc agcggccctc aggggtccct 180
gaccgattct ctgggtccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg 240
tccgaggatg aggctgagta ttactgtgga acgtgggatg acaattcctg ggtgttcggc 300
15 ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 277
<211> 108
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens
<400> 277
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Glu Thr Asn
25 20 25 30

3/6
4/9

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

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

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

Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Asp Asn Ser
85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

10 100 105

<210> 278
<211> 13
<212> PRT

15 <213> Homo sapiens
<400> 278

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Glu Thr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 279

20 <211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 279

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser

25 1 5

476

<210> 280
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<400> 280
Gly Thr Trp Asp Asp Asn Ser Trp Val
1 5
<210> 281
10 <211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 281
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
15 1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
20 25 30
<210> 282
20 <211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 282
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
25 1 5 10

3/8
42

<210> 283
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 283
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30
10 <210> 284
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 284
15 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30
<210> 285
20 <211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 285
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
25 1 5 10

319
422

<210> 286
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 286
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30
10 <210> 287
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 287
15 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20
<210> 288
20 <211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 288
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
25 1 5 10 15

320
423

<210> 289
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 289
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30
10 <210> 290
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 290
15 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20
<210> 291
20 <211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 291
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
25 1 5 10 15

34
424

<210> 292
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 292
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30
10 <210> 293
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 293
15 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys
20
<210> 294
20 <211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 294
Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
25 1 5 10 15

382
425

	<210>	295	
	<211>	32	
	<212>	PRT	
	<213>	Homo sapiens	
5	<400>	295	
	Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser		
	1	5	10
	Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys		
	20	25	30
10	<210>	296	
	<211>	27	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 5'Ig L VH 4/6	
	<400>	296	
	cccagatggg tcctgtccca ggtgcag		27
	<210>	297	
	<211>	24	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 5'Ig L V kappa 1/2	
	<400>	297	
25	atgaggstcc cygctcagct gctg		24

323
426

	<210>	298	
	<211>	23	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 5'Ig L V lambda 3	
	<400>	298	
		gctctgtgac ctcctatgag ctg	23
10	<210>	299	
	<211>	23	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 5'Ig L V lambda 1	
	<400>	299	
		ggtcctgggc ccagtctgtg ctg	23
	<210>	300	
	<211>	23	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 3'Ig C gamma CH 1	
	<400>	300	
25		ggaaggtgtg cacgccgctg gtc	23

324
427

	<210>	301	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 3'Ig C kappa 543	
	<400>	301	
		gtttctcgta gtctgctttg ctca	24
10	<210>	302	
	<211>	24	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 3'Ig C lambda chain	
	<400>	302	
		caccagtgtg gccttggttg cttg	24
	<210>	303	
	<211>	38	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 5'Ig AgeI VH4	
	<400>	303	
25		ctgcaaccgg tgtacattcc caggtgcagc tgcaggag	38

365
428

	<210>	304	
	<211>	39	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 5'Ig AgeI V kappa 2-24	
	<400>	304	
		ctgcaaccgg tgtacatggg gatattgtga tgaccaga	39
10	<210>	305	
	<211>	40	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 5'Ig AgeI V kappa 2-28	
	<400>	305	
		ctgcaaccgg tgtacatggg gatattgtga tgactcagtc	40
	<210>	306	
	<211>	38	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 5'Ig AgeI V lambda 3	
	<400>	306	
25		ctgctaccgg ttctgtgacc tcctatgagc tgacwcag	38

326
429

	<210>	307	
	<211>	40	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 5'Ig AgeI V kappa 1-5	
	<400>	307	
	ctgcaaccgg	tgtacattct gacatccaga tgacccagtc	40
10	<210>	308	
	<211>	38	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 5'Ig AgeI VH 4-39	
	<400>	308	
	ctgcaaccgg	tgtacattcc cagctgcagc tgcaggag	38
	<210>	309	
	<211>	38	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 5'Ig AgeI V lambda 1	
	<400>	309	
25	ctgctaccgg	ttcctggggc cagtctgtgc tgackcag	38

327
430

	<210>	310	
	<211>	32	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 3'Ig Sall JH	
	<400>	310	
	tgcgaaagtcg	acgctgagga gacggtgacc ag	32
10	<210>	311	
	<211>	30	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 3'Ig BsiWI J kappa 2	
	<400>	311	
	gccaccgtac	gtttgatctc cagcttggtc	30
	<210>	312	
	<211>	33	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 3'Ig Sall JH 6	
	<400>	312	
25	tgcgaaagtcg	acgctgagga gacggtgacc gtg	33

~~328~~
431

	<210>	313	
	<211>	30	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 3'Ig Bsi WIJ kappa 1/4	
	<400>	313	
		gccaccgtac gtttgatytic caccttggtc	30
10	<210>	314	
	<211>	28	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 3'Ig XhoI C lambda	
	<400>	314	
		ctcctcactc gaggggyggga acagagtg	28
	<210>	315	
	<211>	21	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 5'Absense	
	<400>	315	
25		gcttcgtttag aacgcggcta c	21

289
432

	<210>	316	
	<211>	22	
	<212>	ADN	
5	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 3'IgG internal	
	<400>	316	
	gttcggggaa gtagtccttg ac		22
10	<210>	317	
	<211>	22	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
15	<223>	Cebador 3'C kappa 494	
	<400>	317	
	gtgctgtcct tgctgtcctg ct		22
	<210>	318	
	<211>	24	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 3'C lambda	
	<400>	318	
25	caccagtgtg gccttggttg cttg		24

230
433

<210> 319
<211> 5
<212> PRT
5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Linker sequence
<400> 319
Ile Ala Gly Ser Gly
10 1 5
<210> 320
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15 <400> 320
Met Pro Ala Pro Arg Gly Leu Leu Arg Ala Thr Phe Leu Val Leu Val
1 5 10 15
Ala Phe Gly Leu Leu Leu His Ile Asp Phe Ser
20 25
20 <210> 321
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
25 <223> HA tag

~~321~~
43A

<400> 321

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

5

10

15

20

25

30

35

40

45 WPC19527/ID.220825

		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA	
RELACIÓN DE ANEXOS			
Dependencia:		Fecha:	Recorrido:
Tipo de Radicación:		Entrada:	Salida:
		Traslado:	Convenio:
Radicador:			Planilla:
ID	No. Radicación	Cons	Item
1			1
2			2
3			3
4	12-122672-0		4
5			5
6			6
7			7
8			8
9			9
10			10
11			11
12			12
13			13
14			14
15			15
16			16
17			17
18			18
19			19
20			20

Item	Unidad de Conservación
1	CD
2	Disquetes
3	DVD
4	Fotos
5	Libro
6	Muestra Física
7	Otros
8	Planos
9	Periódico
10	Publicación Periódica
11	Sobre blanco tamaño carta
12	Sobre blanco tamaño oficio
13	Sobre de manila

Observaciones
Folio 435 listado de secuencias C.D

233
436

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference R3017 PCT	FOR FURTHER ACTION	See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/EP2010/070568	International filing date (day/month/year) 22.12.2010	Priority date (day/month/year) 23.12.2009
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C07K16/08		
Applicant 4-Antibody AG		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of 18 sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand	Date of completion of this report	
24.10.2011	02.07.2012	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Heder, Andreas Telephone No. +49 89 2399-7102 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2010/070568

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on (*replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report*):

Description, Pages

1-168 as originally filed

Sequence listings, SEQ ID NO

1-321 as originally filed

Claims, Numbers

1-41 filed with the letter of

24-10-2011

Drawings, Sheets

1/13-13/13 as originally filed

- ☒ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):

205
438

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2010/070568

5. ☐ This report has been established:
- ☐ taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
 - ☐ without taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91(Rules 66.4bis and 70.2(e)).
6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-41</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-6, 8, 10, 12-14, 16, 18</u>
	No: Claims	<u>7, 9, 11, 15, 17, 19-41</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-41</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

236
439

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2010/070568

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
 - ☐ to this Authority as an amendment on
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
 - * *If item 4 in Box No. I applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."*

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

- D1 WO 2008/084410 A2 cited in the application
- D2 FUNARO ADA ET AL: "Generation of potent neutralizing human monoclonal antibodies against cytomegalovirus infection from immune B cells." BMC BIOTECHNOLOGY 2008 vol. 8, page 85

Note regarding methods of treatment

- 1 Claims 34, 35, and 41 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment. Patentability, in particular novelty and inventive step, of said claims has been assessed on the basis of a purpose-limited product claim taking into account the alleged effects of the substance or composition.

Disclosure of the application, and subject-matter of the present claims

- 2 The application discloses monoclonal antibodies (mAb) to hCMV. B-cells from human hCMV-infected donors were immortalized with EBV, and mAb were derived from these immortalized B-cells (see pp.16, 17, 89-91).
- 3 The mAb28 ("*Invention 1*" in the International Search Report) to which the present claims are restricted, is directed to the AD4/AD5 epitopes of gB protein (see pp. 12, 13). Immortalized cell line 5-1 produces mAb28.

Disclosure of the prior art

- 4 D1 discloses mAb directed to gB protein of hCMV. The mAb were obtained by immortalizing B-cells of hCMV-infected patients with EBV (see p.21 of D1). mAb with various specificities were obtained, including mAb which recognise gB (see Tab.2 on p. 22 of D1). Some mAb of D1 showed 50% neutralization of hCMV-infection (IC50) of 0.3 µg/ml as measured both with fibroblasts and endothelial cells.
- 5 D2 relates to a modified method of generating hCMV-specific mAb. gB-specific mAb are obtained which are effective in inhibiting infection by both the AD169 laboratory hCMV strain, as well as a clinical isolate, as tested on both fibroblasts, and endothelial cells (see p.5, left col.) The paper discusses the advantages of the method which include that the mAb are fully human, and result from the natural immune response of the human donor. Ease of handling and low cost are also among the advantages of the method which is said to be applicable to a wide range of infectious and other diseases.

Novelty

- 6 No antibodies specific for antigenic determinant AD4 of gB were found in the prior art. Therefore, Ab28 is novel. Consequently, all claims are novel.

Inventive step

- 7 Claim 1 involves an inventive step. The claim relates to Ab28, a mAb which binds hCMV gB within residues 121-132 and 344-438, as defined by the SEQ ID NO: 3-5 and 93-95 of its heavy and light chain CDR1-3 regions. D1, the closest prior art, discloses mAb to hCMV gB. The difference is that Ab28 binds to AD4. The objective technical problem was: the provision of an alternative mAb to hCMV.

- 239
942
- 8 The skilled man was motivated to solve the problem because of the potential medical benefit of alternative (and possibly improved) anti-hCMV mAb. The problem could be solved by routine methods; in fact, the method used in the application is essentially described in both D1 and D2.
- 9 Ab28 is one of many equally obvious solutions of the technical problem. Hence, acknowledgement of an inventive step would require an unpredictable effect of Ab28. The fact that Ab28 binds to AD4 is in itself not a surprise. It was clear that an antibody obtained by the method disclosed in D1 and D2, would bind to an epitope of hCMV, which ever that is. Ab28 binds to the epitope between amino acids 121-132 or 344-438 of gB, which is one of many equally obvious alternatives. An unexpected technical property is not connected with this binding.
- 10 The IC50 of Ab28 (see pp. 113, 119, and 122) is in the same range as the IC50 of the gB-antibodies in D1 (see Tab.2 in D1). However mAb28 has a lower IC50 as compared to some of the other, equally obvious mAb in said tables. Therefore, those claims which are restricted to mAb having SEQ ID NO: 1-3 and 93-95 (these sequences of the heavy and light chain CDR1-3 regions providing the structural basis for the effect of said IC50), i.e. claims 1-6, 8, 10, 12, 14, 16, and 18, involve an inventive step.
- 11 However, claim 7 does not involve an inventive step because the HCDR1 region of the claimed antibody deviates from SEQ ID NO: 3. It has not been shown, and it is not credible, that with these alterations in the HCDR1 region, an Ab28-derived antibody will still maintain the same IC50 as Ab28 itself. Hence, the subject-matter of claim 7 is merely a further gB-antibody without any unexpected effect. Consequently, claim 7 does not involve an inventive step. For essentially the same reason, claims 9, 11, 15, 17, and 19-41 lack an inventive step, as well.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2010/070568

Re Item VIII

Certain observations on the international application

- 12 The term in claim 1 and the dependent claims, "*binding member*" is vague. The description supports, in a technical sense antibodies, but no other unspecified binders.

- 13 Claim 33 fails to recite the medical use indication of claims 55-58. The claim is hence unclear. Claim 33 as it stands is a compound claim although it is drafted as a dependent claim of medical use claims.

VOSSIUS & PARTNER



Patentanwälte Rechtsanwälte

VOSSIUS & PARTNER • Postfach 88 07 67 • 81634 München • Germany

EUROPEAN PATENT OFFICE

80298 MUNICH

PCT/EP2010/070568

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg; 4-Antibody AG

Our Ref.: R3017 PCT

München, October 24, 2011
WA/ARO/PLE

I. CHAPTER II

With the enclosed PCT demand, International Preliminary Examination according the Patent Cooperation Treaty is requested.

II. We therewith enclose an amended set of claims and provide arguments in favor of the patentability.

1. Amendments to the claims

1.1 New claim 1 is based on previously filed claim 1. The antigenic region has been confined to residues 121 to 132 and 344 to 438 which is supported, for example, in the paragraph bridging pages 12 and 13 of the application as originally filed. Furthermore, claim 1 has been limited by incorporation of the subject-matter of claim 7 as originally filed.

PATENTANWÄLTE - DEUTSCHLAND
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS
DR. VOLKER VOSSIUS, Dipl.-Chem.
(bis 1992: danach in anderer Kanzlei)
DR. PAUL TAUCHNER, Dipl.-Chem. (OI Counsel)
DR. DIETER HEUNEMANN, Dipl.-Phys.
DR. PETER A. RAUH, Dipl.-Chem.
DR. GERHARD HERMANN, Dipl.-Phys.
JOSEF SCHMIDT, Dipl.-Ing.
DR. HANS-RAINER JAENICHEN, Dipl.-Biol.
DR. ALEXA V. UEXKÜLL, M.Sc.
DR. RUDOLF WEINBERGER, Dipl.-Chem.
AXEL STELLBRINK, Dipl.-Ing.
DR. JOACHIM WACHENFELD, Biol.
DR. FRIEDRIKE STOLZENBURG, Dipl.-Biol.
RAINER VIKTOR, Dipl.-Ing.
DR. NATALIA BERRYMAN, Dipl.-Chem.
DR. JÜRGEN MEIER, Dipl.-Biol.
DR. STEFAN FICKERT, Dipl.-Chem., LL.M.
ARNOLO ASMUSSEN, Dipl.-Ing.(FH)
ELARD SCHENCK ZU SCHWEINSBERG,
Dipl.-Ing., LL.M.
DR. DIRK HARMSSEN, Dipl.-Chem.
DR. KATHARINA HAAS, Dipl.-Chem.
DR. CHRISTIAN KILGER, Dipl.-Biol.
BARBARA BROSZAT, Dipl.-Phys.
DR. SUSANNE FISCHER-KRUMMER, Apothekerin
DR. JÖRG HAHN, Dipl.-Chem.
DR. CHRISTOPH EISENMANN, Dipl.-Phys.

PATENTANWÄLTE - SCHWEIZ
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
DR. WERNER BASTIAN, Dipl.-Biol. **
SILVAN LATSCHA, Dipl.-Ing. ETH **

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
DR. RENATE BARTH, Dipl.-Chem.
DR. URSULA HOFMANN, Dipl.-Chem.
DR. PETER EINMAYR, Dipl.-Chem.
DR. OLAF MALEK, Dipl.-Biol.
DR. MICHAELA WESSE, Apothekerin
DR. OLIVER SAHR, Dipl.-Phys.
DR. AXEL LEINS, Dipl.-Phys.
DR. ROGER ABSEMER, Biochem.
DR. DANIEL EISENBARTH, Dipl.-Biol.
DANA KRÄMER, Ph.D., Dipl.-Biochem.
KIMIO TAKAHASHI, Japanese Patent Attorney
DR. ULRICH SENTNER, Dipl.-Biol.

PATENTANWALT - DEUTSCHLAND
DR. ANDREAS M. ROBINSON, Dipl.-Biol.

RECHTSANWÄLTE
DR. JOHANN PITZ
DR. THURE SCHUBERT
DR. MATHIAS KLEESPIES, LL.M.
BARBARA GUGGENMOS, Dipl.-Chem.
SIMONE SCHÄFER
JENNIFER CLAYTON-CHEN
PAUL KRETSCHMAR, LL.M. ***
DR. GEORG ANDREAS RAUH
DR. MARCUS V. WELSER, LL.M. ***
DR. STEFANIE NABROTZKI, LL.M.
CHRISTIAN HUFNAGEL, LL.M.
U.S. Attorney-at-Law (New York)

*** Fachanwalt für gewerblichen Rechtsschutz

CONSULTANTS
DR. CHRISTIAN GUGERELL,
European Patent Attorney
YOSHIKAZU ISHINO
JENNIFER L. ENMON, Ph.D., J.D.,
Registered U.S. Patent Attorney
RICHARD ENMON, Ph.D., J.D.,
Registered U.S. Patent Attorney

MAIN OFFICE
SIEBERTSTR. 3
81675 MÜNCHEN/GERMANY

POSTAL ADDRESS:
POB 86 07 67
81634 MÜNCHEN/GERMANY

Tel.: +49-(0)89-413 04-0
Fax: +49-(0)89-413 04-111
Fax trademarks: /-400

BERLIN OFFICE *
JOACHIMSTALER STR. 34
10719 BERLIN/GERMANY

Tel.: +49-(0)30-340 609-501
Fax: +49-(0)30-340 609-512

Partnerschaftsregister Amtsgericht München PR 89

BASEL OFFICE (CH) **
NADELBERG 3
4051 BASEL/SWITZERLAND

Tel.: +41-(0)61 560 1490
Fax: +41-(0)61 560 1488

HR Firmennummer CH-270.9.001.271-9

E-Mail:
patents@vossiusandpartner.com
trademarks@vossiusandpartner.com

www.vossiusandpartner.com

gB antibodies of WO 2008/084410 (D1). The Examiner furthermore emphasizes that the method used in the present application for obtaining antibodies would be essentially the same as that described in both D1 and D2.

3.3 We respectfully disagree with this assessment.

3.3.1 *Ab28 provides advantageous technical effects*

First, Ab28 of the present invention is characterized by superior performance. More specifically, it is apparent from Table 2 at page 22 of WO 2008/084410 (D1) that two out of four antibodies have 50% neutralization values in the one digit µg/ml range which is significantly above the IC₅₀ values of Ab28. Two further antibodies (10C6 and 5F1) have 50% neutralization values of 0,3 µg/ml on fibroblasts and endothelial cells.

In contrast thereto, the antibodies according to the present invention are characterized by high potency in hCMV neutralization using a broad range of hCMV susceptible cell types, namely not only fibroblasts and endothelial cells, but also epithelial and dendritic cells. Furthermore, these antibodies have high potency not only on laboratory strain AD-169 but on all clinical isolates tested so far; see page 8, lines 12 to 17 of the application as filed. The corresponding data can be found in Examples 4 and 7; see in particular Table 13 at page 113 as well as Table 17A at page 122. Ab28 is characterized by 50% neutralizing activity of 0,2 µg/ml on two different cell lines, a value which is not observed for any of the antibodies of WO 2008/084410 (D1).

3.3.2 *The conditions used in WO 2008/084410 (D1) fall short of the state of the art*

In addition, we note that in WO 2008/084410 (D1), unpurified cell culture supernatants from transformed EBV cell clones have been used. It is likely therefore, that there are other factors present in the cell culture supernatant that could influence the neutralization efficacy. Also, it cannot be excluded that the cell culture supernatants are not producing monoclonal antibodies. If one of the cells is a mix of two clones, then there could be synergistic effects on the neutralization.

Thus, with the methodology provided in D1 it is highly questionable how precise the IC₅₀ data is. In the present application and in many other patent applications and scientific publications, IC₅₀s are measured as monoclonal antibodies expressed as recombinant protein expressed from a defined heavy and light

antibodies. There is no indication whatsoever that epitopes other than AD-1 or AD-2 were expected to be found or could be identified. Even in WO 2008/084410 (D1), the focus is clearly on antibodies that recognize a combination of the hCMV proteins UL130 and UL131A. The rather brief disclosure relating to anti-gB antibodies is confined to four antibodies (the binding site of which is not characterized) and which perform worse than Ab28 according to the present invention.

3.3.6 *Specific technical effects conferred by binding to AD-4*

Moreover, we would like to direct the attention to the following findings which establish that Ab28, owing to its binding to an epitope in AD-4, has unique properties.

Ab28 recognises a di-lysine sequence (K378, K379) within AD-4 (see Example 13.1). These amino acids are highly conserved across all known genotypes of hCMV. In fact, all known sequenced clinical and lab strains of hCMV display conservation of these two amino acids. Ab28 also neutralises different lab strains of hCMV including AD-169, Towne, Pan and Altu and it also neutralises hCMV in fresh clinical isolates, namely urine, blood and saliva with equal potency.

Many commercial immunoglobulin preparations neutralise the virus but not across strains. ITC88, which is the antibody most researchers use as a reference (see entry 3 of Annex A) and which binds AD-2, is less effective in neutralising the virus in fibroblasts, is less effective in neutralising the strains AD-169 and Towne, and is less effective in neutralising fresh clinical isolates than Ab28. Antibody ITC88 is an established standard for comparison in the field and is far better characterized than the antibodies of WO 2008/084410 (D1).

Furthermore, Ab28 binds hCMV with picomolar affinity (5.7×10^{-11} ; tested on fibroblasts), a 100 fold higher affinity than ITC88; see the enclosed experimental report.

The enclosed experimental data (Annex B) provide a comparison between Ab28 (in the Tables designated "4Ab-028") with the mentioned prior art antibody ITC88 in terms of (i) binding affinity, (ii) IC_{50} concentration for neutralization, and (iii) performance across different virus strains. Ab28 consistently performs superior.

Finally, it should also be mentioned that Ab28 – as opposed to the antibodies of WO 2008/084410 (D1) – is currently in pre-clinical development.

Annex A

Summary of prior art gB binding antibodies

Reference	Inventor/Author	Ab ID	specificity epitope		neutralising	Method used
US5,043,281	Masuo et al	C23	gB	AD-2	✓	hybridoma method - human lymphocytes fused with mouse myeloma cells
		C41		unknown	✓	
J. Virology (1993) 67: 703	Ohlin et al	ITC33	gB	AD-1		EBV transformation of peripheral blood mononuclear cells from CMV-seropositive blood donors
		ITC39	gB	AD-1		
		ITC48	gB	AD-1		
WO 93/021952A1	Borrebaeck & Ohlin	ITC88	gB	AD-2	✓	EBV transformation of peripheral blood mononuclear cells from CMV-seropositive blood donors
		ITC63b	gB	AD-1	✓	
		ITC52	gB	AD-1	✓	
US20090004198	Nakajima	G3D	gB	AD-1		EBV transformation of blood mononuclear cells vs AD-1 epitope only
WO 08/084410A2	Lanzavecchia & Macagno	10C6	gB	unknown	✓	EBV transformation of isolated memory B cells
		5F1	gB	unknown	✓	
		6B4	gB	unknown	✓	
		7H3	gB	unknown	✓	
WO 09/024445A1	Funaro et al	8C10	gB	AD-2	✓	EBV transformation of PBMCs cells from hCMV patient
		10B7	gB	AD-2	✓	
		8A11	gB	AD-2	✓	
WO 09/114560A2	Olsen	2F10	gB	AD-2	✓	Human plasma samples screened for present of CMV antibodies by ELISA using CMV AD2 epitope
		2M16	gB	AD-2	✓	
		2N9	gB	AD-2	✓	
		3C21	gB	AD-2	✓	
		3G7	gB	AD-2	x	
		4P12	gB	AD-2	✓	
		5P9	gB	AD-2		
		9C16	gB	AD-2		

24.10.2012

NO ANNEX

PCT/EP2010/070568

344
447

1/2

24.10.2012

4AB-028 Binds hCMV gB with High Affinity

mAb clone	$K_{on}[1/Ms]$	$K_{off}[1/s]$	$K_D[M]$ *
4Ab-028	4.0×10^5	2.4×10^{-5}	5.7×10^{-11} **
ITC88	1.2×10^4	9.8×10^{-5}	8.2×10^{-9} ***

*: monovalent affinity measured with Fabs on recombinant gB protein
**: close to Biacore detection limit
***: literature: $K_D=3 \times 10^{-8}M$, Ohlin et al. (1993) J. Virol. 67, pp703-710

4AB-028 Neutralizes Different hCMV Genotypes
with Comparable Potency

CMV strain	IC ₅₀ 4AB-028	IC ₅₀ ITC88
AD-169	0.25 µg/ml	2.0 µg/ml
Towne	0.3 µg/ml	1.0 µg/ml
Pan	0.15 µg/ml	0.2 µg/ml
Altu	0.1 µg/ml	0.3 µg/ml

Assays performed on primary human foreskin fibroblasts

449 296

347
450

PCT/EP2010/070568

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg; 4-Antibody AG

Our Ref.: R3017 PCT

Claims

1. An isolated binding member for human cytomegalovirus (hCMV) gB protein, which binds hCMV gB protein at a region within residues 121 to 132 and 344 to 438, the residue numbering being defined according to the full length gB strain AD169 amino acid sequence SEQ ID No: 239, said isolated binding member comprising a set of CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 and LCDR3, wherein the set of CDRs has 22 or fewer amino acid alterations from a set of CDRs in which:
HCDR1 has amino acid sequence SEQ ID No: 3;
HCDR2 has amino acid sequence SEQ ID No: 4;
HCDR3 has amino acid sequence SEQ ID No: 5;
LCDR1 has amino acid sequence SEQ ID No: 93;
LCDR2 has amino acid sequence SEQ ID No: 94; and
LCDR3 has amino acid sequence SEQ ID No: 95,
and wherein the binding member has a K_D of not more than 50nM as defined by surface plasmon resonance.
2. The isolated binding member for hCMV gB protein of claim 1, which binds hCMV gB protein with a K_D of not more than 1nM as defined by surface plasmon resonance.
3. The isolated binding member according to claim 2, wherein the K_D is not more than 0.5nM.
4. The isolated binding member according to claim 2 or claim 3, wherein the K_D is not more than 0.1nM.

11. The isolated binding member according to any of the preceding claims, comprising an HCDR3 wherein:
Kabat residue 99 is Thr or Ala;
Kabat residue 100 is Val or Met;
Kabat residue 100A is Ser or Thr
Kabat residue 100B is Asn or Thr;
Kabat residue 100C is Ser or Phe;
Kabat residue 100E is Leu, Met or Ala;
Kabat residue 100F is Ser or Gly;
Kabat residue 100K is His or Tyr;
Kabat residue 100L is Asn, Ser or Asp;
Kabat residue 100M is Arg, Val or Ile;
Kabat residue 100N is Leu or Met;
Kabat residue 101 is Asp or Gly; and
Kabat residue 102 is Ala, Val or Ile.
12. The isolated binding member according to claim 11, wherein HCDR3 has amino acid sequence SEQ ID No: 5.
13. The isolated binding member according to any of claims 7 to 12, wherein Kabat residue 26 in LCDR1 is Ser or Asn or where Kabat residue 27 in LCDR1 is Ser or Arg.
14. The isolated binding member according to claim 13, wherein LCDR1 is SEQ ID No: 93.
15. The isolated binding member according to any of claims 7 to 14, wherein Kabat residue 56 in LCDR2 is Ser or Pro.
16. The isolated binding member according to claim 15, wherein LCDR2 is SEQ ID No: 94.

34A
452

22. An isolated antibody molecule comprising a heavy chain comprising amino acid sequence SEQ ID No: 2 and a light chain comprising amino acid sequence SEQ ID No: 92.
23. An isolated antibody molecule that binds hCMV gB protein, wherein the antibody molecule comprises a V_H domain amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID No: 2 and a V_L domain amino acid sequence at least 90% identical to SEQ ID No: 92.
24. A binding member or antibody molecule that competes for binding to hCMV gB protein with a binding member or isolated antibody molecule of any of the preceding claims.
25. An antibody molecule according to claim 22 or 23, wherein the antibody molecule is an IgG.
26. An isolated V_H domain of an antibody molecule according to any of claims 20 or 22 to 25.
27. An isolated V_L domain of an antibody molecule according to any of claims 21 to 25.
28. A composition comprising an isolated binding member according to any of claims 1 to 21, or an antibody molecule according to any of claims 22 to 25, and a pharmaceutically acceptable excipient.
29. A composition comprising an isolated binding member according to any of claims 1 to 21, or an antibody molecule according to any of claims 22 to 25, for use in a method of treatment of the human or animal body by therapy.
30. The composition according to claim 29 for use in treating a disorder associated with hCMV.

350
453

39. The method according to claim 38, further comprising isolating and/or purifying the binding member, antibody molecule, V_H domain or V_L domain.
40. The method according to claim 38 or claim 39, further comprising formulating the binding member, antibody molecule, V_H domain or V_L domain into a composition comprising at least one additional component.
41. A method of neutralising hCMV in a subject or sample, comprising administering to said subject or sample a binding member according to any of claims 1 to 21, or an antibody molecule according to any of claims 22 to 25, in an amount sufficient to reduce hCMV infectivity by at least 50% at a concentration of from about 0.1 to about 5.0 µg/ml.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

PARA REALIZAR EL EXAMEN DE

PATENTABILIDAD

REIVINDICACIONES

1. Un miembro enlazador aislado para la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV), el cual se enlaza a la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV) en una región dentro de los residuos 121 a 132 y 344 a 438, siendo definida la numeración de residuos de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de gB de la cepa AD169 de longitud completa SEQ ID No: 239,

comprendiendo este miembro enlazador aislado un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde el conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) tiene 22 o menos alteraciones de aminoácidos a partir de un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) en donde:

HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 3;

HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 4;

HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 5;

LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 93;

LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 94; y

LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 95,

y en donde el miembro enlazador tiene una K_D de no más de 50 nM, como se define mediante resonancia de plasmón superficial.

2. El miembro enlazador aislado para la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV) de la reivindicación 1, el cual se enlaza a la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV) con una K_D de no más de 1 nM, como se define mediante resonancia de plasmón superficial.

373
456

3. El miembro enlazador aislado de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la K_D no es mayor de 0.5 nM.

4. El miembro enlazador aislado de acuerdo con la reivindicación 2 o con la reivindicación 3, en donde la K_D no es mayor de 0.1 nM.

5. El miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el miembro enlazador no se enlaza a un dominio antigénico 1 (AD-1) o a un dominio antigénico 2 (AD-2) de la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV).

6. El miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración del miembro enlazador requerida para una neutralización del 50 por ciento de un aislado clínico del citomegalovirus humano (hCMV) es de 10 microgramos/mililitro o menos en un ensayo de neutralización para la neutralización de la infección por el citomegalovirus humano (hCMV) de los fibroblastos de prepucio humano.

7. El miembro enlazador aislado de acuerdo con la reivindicación 6, el cual comprende una HCDR1 en donde:

el residuo de Kabat 31 es Asp o Gly;

el residuo de Kabat 32 es His, Phe o Tyr;

el residuo de Kabat 33 es Tyr;

el residuo de Kabat 34 es Met, Ile o Leu; y

el residuo de Kabat 35 es Val o Asn.

8. El miembro enlazador aislado de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la HCDR1 es la SEQ ID No: 3.

9. El miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, el cual comprende una HCDR2 en donde:

el residuo de Kabat 50 es Trp, Ser o Cys;

el residuo de Kabat 53 es Gln, Asn o His;

el residuo de Kabat 54 es Ser o Thr;

el residuo de Kabat 58 es Gly, Lys, Asn o His;

el residuo de Kabat 60 es Gly o Ala; y

el residuo de Kabat 64 es Gln o Arg.

5 10. El miembro enlazador aislado de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 4.

11. El miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual comprende una HCDR3 en donde:

10 el residuo de Kabat 99 es Thr o Ala;
el residuo de Kabat 100 es Val o Met;
el residuo de Kabat 100A es Ser o Thr
el residuo de Kabat 100B es Asn o Thr;
el residuo de Kabat 100C es Ser o Phe;
el residuo de Kabat 100E es Leu, Met o Ala;
el residuo de Kabat 100F es Ser o Gly;
el residuo de Kabat 100K es His o Tyr;
el residuo de Kabat 100L es Asn, Ser o Asp;
el residuo de Kabat 100M es Arg, Val o Ile;
el residuo de Kabat 100N es Leu o Met;
15 el residuo de Kabat 101 es Asp o Gly; y
el residuo de Kabat 102 es Ala, Val o Ile.

12. El miembro enlazador aislado de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 5.

20 13. El miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en donde el residuo de Kabat 26 en la LCDR1 es Ser o Asn, o en donde el residuo de Kabat 27 en la LCDR1 es Ser o Arg.

25 14. El miembro enlazador aislado de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la LCDR1 es la SEQ ID No: 93.

355
458

15. El miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, en donde el residuo de Kabat 56 en la LCDR2 es Ser o Pro.

5 16. El miembro enlazador aislado de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la LCDR2 es la SEQ ID No: 94.

17. El miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual comprende una LCDR3 en donde:

10 el residuo de Kabat 89 es Gly o Ala;
el residuo de Kabat 91 es Pro o Trp;
el residuo de Kabat 93 es Arg o Ser;
el residuo de Kabat 94 es Ser o Asp;
el residuo de Kabat 95a es Ser, Gly o Ala;
el residuo de Kabat 96 es Val o Tyr; y
el residuo de Kabat 97 es Ile o Val.

18. El miembro enlazador aislado de acuerdo con la reivindicación 17, el cual comprende una LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 95.

15 19. El miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDRs): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde:

20 HCDR1 es la SEQ ID No: 3;
HCDR2 es la SEQ ID No: 4;
HCDR3 es la SEQ ID No: 5;
LCDR1 es la SEQ ID No: 93;
LCDR2 es la SEQ ID No: 94; y
LCDR3 es la SEQ ID No: 95.

25 20. El miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el miembro enlazador comprende una molécula de anticuerpo o un fragmento funcional de

la misma, que comprende un dominio de anticuerpo V_H , y en donde el dominio V_H tiene la secuencia de aminoácidos del dominio V_H mostrada en la SEQ ID No: 2.

21. El miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el miembro enlazador comprende una molécula de anticuerpo o un fragmento funcional de la misma, que comprende un dominio de anticuerpo V_L en donde el dominio V_L tiene la secuencia de aminoácidos del dominio V_L mostrada en la SEQ ID No: 92.

22. Una molécula de anticuerpo aislada, la cual comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 2, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 92.

23. Una molécula de anticuerpo aislada, que se enlaza a la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV), en donde la molécula de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos del dominio V_H cuando menos el 90 por ciento idéntica a la SEQ ID No: 2, y una secuencia de aminoácidos del dominio V_L cuando menos el 90 por ciento idéntica a la SEQ ID No: 92.

24. Un miembro enlazador o una molécula de anticuerpo que compite para enlazarse a la proteína gB del citomegalovirus humano (hCMV) con un miembro enlazador o con una molécula de anticuerpo aislada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

25. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 22 ó 23, en donde la molécula de anticuerpo es una IgG.

26. Un dominio V_H aislado de una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 ó 22 a 25.

27. Un dominio V_L aislado de una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25.

28. Una composición que comprende un miembro enlazador

aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, o una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 **29.** Una composición que comprende un miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, o una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, para utilizarse en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

10 **30.** La composición de acuerdo con la reivindicación 29, para utilizarse en el tratamiento de un trastorno asociado con el citomegalovirus humano (hCMV).

31. Una composición que comprende un miembro enlazador aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, o una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, para utilizarse en el tratamiento de un trastorno asociado con el citomegalovirus humano (hCMV).

32. La composición de acuerdo con la reivindicación 30, o la composición para usarse de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el trastorno es una infección por el citomegalovirus humano (hCMV).

33. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32, la cual comprende además un miembro enlazador aislado o una molécula de anticuerpo que se enlaza a la proteína gB, gH, gL, UL128, UL130 y/o UL131A del citomegalovirus humano (hCMV).

34. Un método para el tratamiento de un trastorno asociado con el citomegalovirus humano (hCMV) en un individuo, el cual comprende administrar un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, o una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a

25, al individuo, y de preferencia en donde el individuo tiene un sistema inmunológico comprometido.

35. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el individuo es una mujer embarazada, un recién nacido, un receptor de trasplante, o un individuo infectado con VIH.

36. Una molécula de ácido nucleico aislada, la cual comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un miembro enlazador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, un dominio V_H de acuerdo con la reivindicación 26, un dominio V_L de acuerdo con la reivindicación 27, o una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25.

37. Una célula huésped transfectada *in vitro* o transducida con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 36.

38. Un método para la producción de un miembro enlazador, una molécula de anticuerpo, o un dominio de anticuerpo V_H o V_L , el cual comprende cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 37, bajo condiciones para la producción del miembro enlazador, la molécula de anticuerpo, o el dominio de anticuerpo V_H o V_L .

39. El método de acuerdo con la reivindicación 38, el cual comprende además aislar y/o purificar el miembro enlazador, la molécula de anticuerpo, el dominio V_H , o el dominio V_L .

40. El método de acuerdo con la reivindicación 38 o con la reivindicación 39, el cual comprende además formular el miembro enlazador, la molécula de anticuerpo, el dominio V_H , o el dominio V_L , en una composición que comprende cuando menos un componente adicional.

41. Un método para la neutralización del citomegalovirus humano (hCMV) en un sujeto o en una muestra, el cual comprende administrar a este sujeto o a esta muestra, un miembro enlazador de

acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, o una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en una cantidad suficiente para reducir la infectividad del citomegalovirus humano (hCMV) por cuando menos el 50 por ciento, en una concentración de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5.0 microgramos/mililitro.

10

15

20

25 WPC19527/ID.220824

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

VOSSIUS & PARTNER
Siebertstraße 4
81675 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year)

14 June 2012 (14.06.2012)

Applicant's or agent's file reference

R3017 PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/EP2010/070568

International filing date (day/month/year)

22 December 2010 (22.12.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Schlossplatz 4
91054 Erlangen
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

The person in box 1 has been deleted from the record. 4-ANTIBODY AG is now recorded as sole applicant for all designated States except US.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☒ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☒ the elected Offices concerned
☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Wimmer Peter

Facsimile No. +41 22 338 89 70

e-mail pt06.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 06

465-362

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0074249
		Bogotá D.C., Julio 23 de 2012 - 11:43:24

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

RE

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	57984	12/06/2012		20.000.00
RECIBO DE CA	999999999	63659	25/06/2012		720.000.00
RECIBO DE CA	999999999	66433	03/07/2012		170.000.00
RECIBO DE CA	999999999	67209	04/07/2012		20.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
31 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	930.000.00
			\$930.000.00

SON: **NOVECIENTOS TRENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-122672- -00000-0000
Fecha: 2012-07-23 11:54:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 466
Act. 411 PRESENTACION Folios: 363

366
363
466

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD FASE NACIONAL PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 016/008	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) 4-ANTIBODY AG	
(30) Prioridad	(31) Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	09015951.8	2009/12/23	EP
	61/289,835	2009/12/23	US
	10003669.8	2010/04/01	EP
	61/320,057	2010/04/01	US
		(72) Inventor(es) ULF GRAWUNDER Y OTROS	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 2012/07/23		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 2011/06/30
	Fecha de presentación de la solicitud: 2010/12/22		N° publicación: WO 2011/076883 A1
	No. de solicitud PCT/EP2010/070568		
(54) Titulo: MIEMBROS ENLAZADORES PARA CITOMEGALOVIRUS HUMANO			

Resumen:

La invención se refiere a miembros enlazadores, en especial a moléculas de anticuerpos, que neutralizan los efectos biológicos del citomegalovirus humano (hCMV).

Los miembros enlazadores son útiles para el tratamiento y la profilaxis de la infección por el citomegalovirus humano (hCMV).



No. 12-122672- -00000-0000

Fecha: 2012-07-23 11:54:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 466

ACT. 411 PRESENTACION FOLIOS: 363

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIAPATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐
☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita una patente.

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Descripción de la invención

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐Incompleta ☐PATENTE DE INVENCION PCT ☒MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒Incompleta ☐DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño.

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐Incompleta ☐ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐Incompleta ☐