

ANTICUERPOS CONTRA GLICOPROTEÍNA F DE VIRUS HENDRA Y NIPAH

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, en general, al campo de la
5 inmunología y, específicamente, a anticuerpos y fragmentos de
anticuerpos que se unen a los virus Hendra y Nipah y/o
inhiben las actividades de los virus Hendra y Nipah.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El virus Nipah (NiV) y el virus Hendra (HeV) son
paramixovirus estrechamente relacionados que comprenden el
género *Henipavirus* (Anonymous 1999 *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*
Ward, J. W. ed. 48:335-337; Chew, M. H. et al. 2000 *J Infect*
Dis 181:1760-1763; Chua, K. B. et al. 2000 *Ann Neurol* 48:802-
15 805; Eaton, B. T. 2001 *Microbes Infect* 3:277-278; Goh, K. J.
et al. 2000 *N Engl J Med* 342:1229-1235; Lee, K. E. et al.
1999 *Ann Neurol* 46:428-432; Lim, C. C. et al. 2000 *Am J*
Neuroradiol 21:455-461; Murray, K. et al. 1995 *Science*
268:94-97). Los paramixovirus son ARN con sentido negativo
20 que contienen virus encapsulados y abarcan una diversos
patógenos humanos y animales importantes, incluso virus del
sarampión, virus de las paperas, virus Sendai, virus de la
enfermedad de Newcastle, virus de la peste, virus del
moquillo canino, virus parainfluenza, virus sincitial

respiratorio y virus de simio 5 (revisados en Lamb y Parks, 2007, *Fields Virology*, ed. Knippe & Howley, Lippincott, Williams & Wilkins, págs. 1449-1496).

Como otros paramixovirus, HeV y NiV poseen dos glicoproteínas
5 ancladas a la membrana principales en la envoltura de la
partícula viral. Para el reconocimiento y la unión del
receptor de célula hospedadora se necesita una glicoproteína
y se designa como una proteína hemaglutinina-neuraminidasa
(HN), una proteína hemaglutinina (H) o, en el caso de
10 henipavirus, una glicoproteína (G), que no tiene ni
actividades de hemaglutinina ni de neuraminidasa. La otra
glicoproteína principal es la glicoproteína de fusión (F),
que es una a glicoproteína de envoltura fusogénica de clase I
trimérica que contiene dos regiones de héptada repetida (HR)
15 y un péptido de fusión hidrofóbico (Fp). La glicoproteína F
de henipavirus se sintetiza como un precursor F_0 que
experimenta escisión postraducciona por la célula
hospedadora catepsina L que se produce dentro del
compartimiento endosomal, más probable durante la endocitosis
20 y el reciclaje de F a las subunidades fusiogénicas maduras F_1
(un fragmento de extremo carboxi más grande) + F_2 (un
fragmento de extremo amino más pequeño) que se mantienen
unidas por enlaces disulfuro a través de residuos de cistina
conservada. Véase Pager, C.T. et al. 2006. *Virology* 346: 251-

7; Pager, C.T. et al. 2005. *J Virol* 79: 12714-20; Meulendyke, K.A. et al. 2005, *J Viral*, 79: 12643-9; Diederich, S.M. et al. 2005, *J Biol Chem*, 280: 29899-903. En la forma madura de F, los Fp están situados en el extremo N de F₁ seguido de la
5 primera HR (HRA) y la segunda HR (HRB) está ubicada en el extremo C de F₁ anterior a su dominio transmembrana (revisado en Lamb y Parks, 2007, *Fields Virology*, eds. Knippe & Howley, Lippincott, Williams & Wilkins, pp. 1449-1496).

Después de la unión a la efrina receptora hospedadora (EFN)
10 B2 o B3 mediante la glicoproteína G, HeV y NiV infectan las células a través de un proceso de fusión de membrana independiente de pH. Este proceso aún es poco conocido y se cree que implica cambios conformacionales en G tras la unión al receptor que conduce a la activación y disparo de F. Lamb,
15 R. A. et al. 2006, *Virology*, 344:30-7; Steffen, D.L. et al. 2012, *Viruses*, 4:280-308. Luego del disparo, F experimenta reordenamientos conformacionales significativos que facilitan la inserción del péptido de fusión en membranas diana, juntando las dos regiones HR en la formación de la estructura
20 de conjunto de seis hélices o trímero de horquillas durante o inmediatamente después de la fusión del virus y las membranas celulares. Se cree que el proceso de fusión de membrana impulsado por F implica un plegamiento irreversible de una forma metaestable seguido por cambios conformacionales

discretos posteriores a un estado de energía más baja. Diversos detalles moleculares de este replegamiento de F tras la activación se ha revelado en las soluciones estructurales de las conformaciones antes y después de la fusión de
5 respirovirus F. Yin, H.S. et al. 2005, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(26): 9288-93; Yin, H.S. et al. 2006, *Nature* 439:38-44.

Aunque en la actualidad no existen vacunas o agentes terapéuticos clínicamente aprobados contra HeV o NiV, se ha
10 demostrado que un anticuerpo monoclonal neutralizante específico de glicoproteína G de henipavirus (mAb) m102.4 protegía al mono verde africano contra HeV de enfermedad letal cuando se administró tan tarde como 72 horas después de la infección. Bossart, K.N. et al. 2011, *Sci Transl Med*,
15 3:105ra103. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, por ejemplo anticuerpos monoclonales (mAb) y fragmentos de estos, pueden ser útiles para dilucidar la estructura de una proteína y comprender la función asociada con diversos dominios así como proporcionar un reactivo potencial para su
20 uso como profilaxis y/o agentes terapéuticos como en el caso del m102.4 anti G. Hasta la fecha, hay muy pocos mAb anti henipavirus F reportados y ninguno se produce a partir de proteína recombinante. Aguilar, H.C. et al. 2007, *J Viral*, 81:4520-32; Guillaume, V.H. et al. 2006, *J Viral*, 80:1972-8.

Estos informes proporcionan información limitada con respecto a las propiedades específicas de los anticuerpos aislados. El desarrollo de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos anti-F neutralizantes puede servir como otro posible agente terapéutico contra infección de henipavirus quizás de manera más eficaz cuando se combina con m102.4. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos anti-F también pueden proporcionar una herramienta valiosa para facilitar la caracterización estructural y funcional de la fusión mediada por F en henipavirus.

Por lo tanto, el desarrollo de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos neutralizantes o de inhibición contra NiV y HeV puede tener importantes implicaciones en la profilaxis y la inmunoterapia pasiva. Además, la caracterización de los epítomos de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos y los mecanismos de neutralización e inhibición de la infección de NiV y HeV puede proporcionar información útil para el desarrollo de vacunas y fármacos candidatos. Finalmente, dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos también se pueden utilizar para el diagnóstico y como reactivos de investigación.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos

de anticuerpos que se unen, neutralizan y/o inhiben los virus Hendra y/o Nipah. En particular, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de este que se une selectivamente a una glicoproteína F de virus Hendra o virus Nipah, en donde dicho anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 35, 37 y 39; y una región variable de cadena ligera que comprende al menos una CDR que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 43, 45 y 47. La invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado que se une selectivamente a una glicoproteína F del virus Hendra o el virus Nipah, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 33.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Representación de secuencia de aminoácidos de la construcción m5B3 y ScFv. (A) Secuencia de aminoácidos de VH y VL de m5B3. Las regiones CDR están etiquetadas y subrayadas y las regiones de marco (FR) también están marcadas. Los V_H y

V_L de m5B3, 5B3 humanizado (h5B3) y 5B3.1 humanizado (h5B3.1) están separados por un enlazador flexible (p. ej. un péptido conector -(G₄S)₃-) e insertados en un vector ADNpc potenciado por promotor con un marcador de selección de higromicina, una
 5 secuencia líder (lgk lead) de cadena ligera (le) de inmunoglobulina en el extremo N de la construcción, una etiqueta de péptido S (Stag) y una etiqueta de hexa histidina (His) en el extremo C.

Figura 2. Unión de 5B3 murino (m5B3), 5B3 humanizado (h5B3) y
 10 5B3.1 humanizado (h5B3.1) con F. (A) Unión de m5B3, h5B3 y h5B3.1 ScFv con F soluble (sF) y de longitud completa (FL). Las construcciones ScFv de m5B3, h5B3, y h5B3.1 tal como se muestran en la figura B se transfectaron en células 293T y se cosechó sobrenadante 48 horas después de la transfección. Se
 15 utilizó un ScFv humano de una biblioteca de ScFv humanos como control (ctrl). Se agregó una cantidad igual de sobrenadante con proteína sF o lisado celular que expresa F FL y se precipitó (IP) con perlas Ni²⁺ o agarosa de proteína S tal como se indicó. (B) Unión de h5B3 y h5B3.1 IgG con FL F. Se
 20 utilizó el mAb G anti HeV humano, m102.4 que tiene el mismo fragmento Fe y CL como el mAb de control. Se agregó mAb purificado, cada 2 µg, a un lisado celular que expresa FL F seguido de la precipitación con Sepharose de proteína G. En todos los casos, los productos precipitados se analizaron en

SDS PAGE seguido de transferencia western y las transferencias se sondaron (IB) con anticuerpos adecuados para detectar las bandas tal como se indicó. IP: inmunoprecipitado; IB: inmunotransferencia; H: cadena pesada; L: cadena ligera.

Figura 3. Alineación de regiones de marco (FR) de m5B3 y h5B3 con la de una biblioteca de ScFv humanos y la secuencia VH de h5B3.1. (A) Las FR de V_H y V_L de m5B3 se alinearon con la de la biblioteca de ScFv humanos y se identificaron residuos humanos conservados según lo indicado por las flechas verticales arriba de la alineación. Estos residuos conservados luego se reemplazaron en posiciones homólogas m5B3 para producir FR de h5B3 como se muestra en la primera fila de la alineación. (B) Secuencia de aminoácidos de h5B3.1. Las regiones CDR están etiquetadas y subrayadas. Los residuos resaltados en CDR indican los aminoácidos que se mutaron en h5B3 para generar h5B3.1.

Figura 4. Diagrama de vectores utilizados para producir h5B3.1 IgG1 en ADNpc y tinción coomassie de m5B3, h5B3 y h5B3.1 IgG purificados. (A) Cebadores PCR con sitios Xho I que flanquean la cadena ligera y pesada ORF de pDR12 como muestran las flechas que se utilizaron para amplificar el ADN plásmido de pDR12 h5B3.1, el producto PCR luego se digirió e insertó en el sitio Xho I en el ADNpc3.I Higo(+) potenciado

por promotor tal como se muestra. (B) Se analizaron mAb como se indicó, 4 µg cada uno, en SDS PAGE seguido de tinción azul de coomassie. Las flechas verticales indican las cadenas pesada (H) y ligera (L) de los mAb. MW: marcador de peso molecular.

Figura 5. Determinación de unión de cadena de 5B3. Sobrenadante de célula que expresa diferentes quimeras VH VL de ScFv humano y h5B3 etiquetadas de péptido S tal como se indicó se agregaron a un lisado celular que expresa F no etiquetado y se precipitó con agarosa de proteína S. Los productos precipitados se analizaron en SDS PAGE seguido de transferencia western y las transferencias se sondaron (IB) con anticuerpo de péptido anti S para detectar el ScFv o anticuerpo anti-F para detectar F.

Figura 6. Unión de quimeras F de NiV y CedPV con diferentes F mAb anti NiV y actividades de fusión de las quimeras. (A) Se precipitaron lisados celulares que expresan diferentes quimeras CedPV F y NiV etiquetadas de péptido S con diferentes F mAb anti NiV o agarosa de proteína S tal como se indicó. Los productos precipitados se analizaron en SDS PAGE seguido de transferencia western y las transferencias se sondaron con Ab de péptido anti S. La banda superior justo debajo del marcador 64 kDa es F_0 y la banda inferior justo debajo del marcador 51 kDa es F_1 . Los diagramas esquemáticos

de las quimeras se muestran a la izquierda de las transferencias donde rojo y azul indican regiones CedPV y NiV F. 1E11, 12B2 y 5B3 son mAb murinos contra la glicoproteína F. (B) Diferentes quimeras NiV y CedPV F se evaluaron para
5 detectar su capacidad de promover la fusión celular en ensayo de fusión celular indicadores de β -Gal mediante la coexpresión con NiV G en células Hela-USU negativas receptoras utilizando células Hela-ATCC permisivas como la población diana. Se realizaron ensayos en triplicado y los
10 resultados de fusión se calcularon y se expresaron como velocidades medias de actividad de β -Gal (cambio en densidad óptica en 570 nm por minuto $\times$ 1.000). Ni: NiV; Ce: CedPV; Hd: cabeza globular de F; HRB: héptada repetida B de F.

Figura 7. Mapeo de epítipo 5B3 mediante mutagénesis. (A)
15 Análisis de precipitación y transferencia western de mutantes F defectuosos de 5B3 murino. Se generó un panel de mutantes NiV F etiquetados de péptido S y se expresó en células 293T. Los lisados celulares que expresan F se dividieron de la misma forma y se precipitaron con 5B3, 12B2 y agarosa de
20 proteína S por separado. El complejo mAb-F luego se agregó con Sepharose de proteína G. Los productos precipitados se analizaron en SDS PAGE seguido de transferencia western y las transferencias se sondaron con Ab de péptido anti S. La banda superior es F_0 y la banda inferior es F_1 . (B) Actividad de

fusión de mutantes NiV F defectuosos de 5B3 en ensayo de fusión celular de células indicadoras β -Gal. Los mutantes de NiV F que se muestran en (A) se evaluaron para detectar su capacidad de promover la fusión celular mediante la coexpresión con NiV G en células Hela-USU negativas receptoras utilizando células Hela-ATCC permisivas como la población diana. Los datos que se muestran son el porcentaje medio de niveles de fusión WT medidos para cada mutante calculado de tres experimentos separados normalizados con una expresión total según lo medido por densitometría de bandas de transferencias western. Las barras representan el intervalo de múltiples experimentos. WT: F salvaje. (C) Ubicación de epítipo 5B3 mapeado a la estructura de trímero NiV F visualizada como representación superficial. Los diferentes tonos de gris marcan las subunidades del F trimérico. Los residuos coloreados marcan los que fueron mutados en este estudio. Los residuos en naranja se evaluaron pero no tuvieron efecto en la unión a 5B3. Los residuos en rosado son defectuosos de 5B3 y 12B2. Magenta marca los residuos que son defectuosos de 5B3 pero que no tuvieron efecto sobre la unión a 12B2. Péptido de fusión de la subunidad donde el epítipo es coloreado con azul. (D) Ampliación en la imagen de (C) que etiqueta todos los residuos evaluados en este estudio.

Figura 8. Mecanismo de inhibición de 5B3. (A) Se escindió sF por tripsina para producir F₁ +F₂ maduras y se agregó inhibidor de proteasa para detener la reacción. Se agregó 2 µg de péptido FC2 biotinilado con diferente cantidad de mAb según lo indicado. Las muestras luego se calentaron a 50 °C durante 15 min para activar F. El complejo FC2-sF se precipitó con agarosa de avidina. (B) Se llevó a cabo un ensayo como se describe en (A) con m5B3 y h5B3.1, se recogió el material sin unir de la reacción de 5 µg de mAb (4° carril desde la izquierda) y se precipitó con Sepharose de proteína G (5° carril desde la izquierda). (C) Se llevó a cabo un ensayo como se describe en (A) con 2 µg de mAb y aumento de la temperatura según lo indicado para el tratamiento con calor. Se recogió el material sin unir de todas las reacciones y se precipitó con Sepharose de proteína G. En todos los casos anteriores, los productos precipitados se analizaron en SDS PAGE seguido de transferencia western y las transferencias se sondaron con anticuerpo de conejo anti-F para detectar F.

Tabla A. Descripción breve de m5B3, h5B3 y h5B3.1 SEQ ID NO.

Fab/mab	SEQ ID NO de cadena pesada								SEQ ID NO de cadena ligera							
	V _H	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	V _L	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
m5B3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
h5B3	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
h5B3.1	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA MODALIDAD PREFERIDA

Definiciones

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado según lo entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Véase, p. ej., Singleton P y Sainsbury D., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 3º ed., J. Wiley & Sons, Chichester, Nueva York, 2001 y *Fields Virology* 4º ed., Knipe D.M. y Howley P.M. eds, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia 2001.

Según se utiliza en la presente, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que puede tener la capacidad de unirse específicamente a un antígeno particular.

Los anticuerpos pueden tener diferentes variedades conocidas como isotipos o clases, por ejemplo, entre otros, los cinco isotipos de anticuerpos básicos conocidos como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Un fragmento de anticuerpo puede comprender una parte de una molécula de inmunoglobulina o una combinación de partes de moléculas de inmunoglobulina. Los fragmentos de anticuerpo pueden conservar la capacidad de unión al antígeno. Los fragmentos de anticuerpo pueden incluir fragmentos activos de unión al antígeno como, entre otros, los fragmentos activos conocidos $F(ab')_2$, Fab, Fv, Fe y Fd,

así como el péptido de fusión como ScFv. Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpo son conocidos para los expertos en la ciencia de la inmunología. Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpo se utilizan regularmente para
5 estudios y procesos *in vitro* e *in vivo*.

Según se utilizan en la presente, los términos "cadena pesada" y "cadena ligera" se refieren a las subunidades de inmunoglobulina conocidas y como parte de un anticuerpo y los fragmentos de las subunidades. En sus formas completas, la
10 cadena pesada es generalmente un polipéptido más largo que la cadena ligera. La cadena pesada puede comprender una región variable de cadena pesada (V_H) que es importante para la unión del antígeno y la cadena ligera puede comprender una región variable de cadena ligera (V_L) que es importante para
15 la unión del antígeno.

El fragmento Fab (fragmento de unión a antígeno) es una región de un anticuerpo que se une a los antígenos. Fab puede comprender un dominio constante y un dominio variable de cada una de la cadena pesada y la cadena ligera. Estos dominios
20 forman el parátipo -el sitio de unión al antígeno- en el extremo amino terminal del monómero. Los dos dominios variables se unen al epítipo en sus antígenos específicos. $F(ab')_2$ se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un dímero de Fab. Fab y $F(ab')_2$ pueden ser generados mediante

tecnología recombinante o mediante escisión de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Como se conoce en la técnica, solo una parte de una molécula de anticuerpo, el parátopo, participa en la unión del anticuerpo a los epítomos del antígeno. Las regiones pFc' y Fc (región cristalizable de
5 fragmento), por ejemplo, son efectoras de la cascada del complemento, pero no participan en la unión al antígeno.

Según se utiliza en la presente, un ScFv (fragmento variable de cadena simple) es un péptido de fusión de las regiones
10 variables de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) de las inmunoglobulinas conectado con un péptido conector o de unión. En algunas modalidades, el péptido conector tiene entre aproximadamente dos y aproximadamente 50 aminoácidos. En algunas modalidades, el péptido conector tiene entre
15 aproximadamente diez y aproximadamente 25 aminoácidos. El ScFv puede conservar la capacidad de unión al antígeno de la molécula de inmunoglobulina original. Aquí un ScFv se considera un fragmento de anticuerpo.

Según se utiliza en la presente, el fragmento Fd puede
20 comprender la parte de la cadena pesada de un fragmento Fab. El fragmento Fd se puede producir mediante escisión enzimática o tecnologías de recombinación. En algunas modalidades, los fragmentos Fd son los principales determinantes de especificidad de anticuerpo (un único

fragmento Fd se puede asociar con hasta diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad de anticuerpo) y los fragmentos Fd conservan la capacidad de unión al epítipo en aislamiento.

5 Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son regiones peptídicas dentro de la parte de unión al antígeno de un anticuerpo. Las CDR pueden interactuar directamente con el epítipo del antígeno y son las principales determinantes de especificidad de anticuerpo. Las regiones marco (FR) son
10 regiones peptídicas en la parte de unión al antígeno del anticuerpo que mantienen la estructura terciaria del parátipo. En algunas modalidades, en la región variable de cadena pesada (V_H) y la región variable de cadena ligera (V_L), hay cuatro regiones marco (FR1 a FR4) separadas respectivamente
15 por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3). Las CDR, y en particular las regiones CDR3, y más particularmente la cadena pesada CDR3, pueden ser altamente responsables de la especificidad de anticuerpo.

Según se utilizan en la presente, los términos "enfermedad
20 del virus Hendra" y "enfermedad del virus Nipah" se refieren a enfermedades provocadas, directa o indirectamente, por la infección con el virus Hendra o Nipah. Los tropismos de especies amplios y la capacidad de provocar una enfermedad fatal en animales y en seres humanos han distinguido al virus

Hendra (HeV) y al virus Nipah (NiV) del resto de los paramixovirus conocidos (Eaton B.T. 2001 *Microbes Infect* 3:277-278). Estos virus se pueden ampliar y provocar enfermedad en animales grandes y se pueden transmitir a los seres humanos en donde la infección se manifiesta como una enfermedad respiratoria grave y/o encefalitis febril.

Como se utiliza en la presente con respecto a los polipéptidos, el término "sustancialmente puro" significa que los polipéptidos están esencialmente libres de otras sustancias con las cuales se podrían encontrar en la naturaleza o en sistemas *in vivo* en una medida práctica y adecuada para su uso previsto. En particular, los polipéptidos son lo suficientemente puros y están lo suficientemente libres de otros componentes biológicos de sus células hospedadoras como para ser útiles, por ejemplo, en la generación de anticuerpos, el secuenciamiento o la producción de preparaciones farmacéuticas. Mediante procedimientos conocidos en la técnica, los polipéptidos sustancialmente puros se pueden producir en virtud de las secuencias de polinucleótidos y aminoácidos descritas en la presente. Como un polipéptido sustancialmente purificada de la invención se puede mezclar con un portador farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el polipéptido puede comprender solo determinado porcentaje en peso de la preparación. El

polipéptido es, no obstante, sustancialmente puro en el sentido de que se ha separado sustancialmente de las sustancias con las cuales se puede asociar en los sistemas vivos.

5 Según se utiliza en la presente, "identidad de secuencia" es una medida de la identidad de las secuencias de nucleótidos o las secuencias de aminoácidos comparadas con una secuencia de nucleótidos o aminoácidos de referencia. Un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos con al menos, por
10 ejemplo, aproximadamente el 95 % de "identidad de secuencia" con una secuencia de aminoácidos de referencia, p. ej., SEQ ID NO: 1, se entiende que significa que la secuencia de aminoácidos del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de aminoácidos puede
15 incluir hasta aproximadamente cinco modificaciones por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener un péptido que presenta al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta
20 aproximadamente el 5 % de los residuos de aminoácidos de la secuencia de referencia se pueden eliminar o sustituir con otro aminoácido o una cantidad de aminoácidos de hasta aproximadamente el 5 % del total de aminoácidos en la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de

referencia. Estas modificaciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones de extremo N o extremo C de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre dichas posiciones terminales, intercaladas, ya sea en forma individual entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

En general, las secuencias están alineadas de modo de obtener la coincidencia de mayor orden. "Identidad de secuencia" en sí tiene un significado reconocido en la técnica y se puede calcular utilizando técnicas conocidas. Aunque hay diversos métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, el término "identidad" es conocido por los expertos (Carillo (1988) *J. Applied Math.* 48, 1073). Ejemplos de métodos de programas informáticos para determinar la identidad de secuencia y la similitud entre dos secuencias incluyen, entre otros, el paquete del programa GCG (Devereux (1984) *Nucleic Acids Research* 12, 387), BLASTP, ExpASy, BLASTN, FASTA (Atschul (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403) y FASTDB. Ejemplos de métodos para determinar la identidad de secuencia y la similitud se plantean en Michaels (2011) *Current Protocols in Protein Science*, tomo 1, John Wiley & Sons.

En una modalidad de la presente invención, el algoritmo

utilizado para determinar la identidad de secuencia entre dos o más polipéptidos es BLASTP. En otra modalidad de la presente invención, el algoritmo utilizado para determinar la identidad de secuencia entre dos o más polipéptidos es FASTDB, que se basa en el algoritmo de Brutlag (1990) *Comp. App. Biosci.* 6, 237-245). En un alineamiento de secuencia FASTDB, las secuencias de consulta y de referencia son secuencias amino. El resultado del alineamiento de secuencia se encuentra en porcentaje de identidad de secuencia. En una modalidad, los parámetros que se pueden utilizar en un alineamiento FASTDB de secuencias de aminoácidos para calcular el porcentaje de identidad de secuencia incluyen, entre otros: matriz=PAM, tupla k=2, penalización por mal emparejamiento=1, penalización de unión=20, largo de grupo de Aleatorización=0, resultado de fecha límite=1, penalidad por hueco=5, penalización por tamaño de hueco 0,05, tamaño de ventana=500 o el largo de la secuencia sujeto de amino, lo que sea más corto.

Si la secuencia de referencia es más corta o más larga que la secuencia de consulta debido a las adiciones o eliminaciones de extremo N o extremo C, pero no debido a adiciones o eliminaciones internas, se puede realizar una corrección manual, porque el programa FASTDB no representa truncamientos o adiciones de extremo N y extremo C de la secuencia de

referencia al calcular el porcentaje de identidad de secuencia. Para las secuencias de consulta truncadas en los extremos N o C, con respecto a la secuencia de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia se corrige al calcular el número de residuos de la secuencia de consulta que son extremos N y C de la secuencia de referencia que no están emparejadas/alineadas, como un porcentaje del total de las bases de la secuencia de consulta. Los resultados del alineamiento de secuencia FASTDB determinan la coincidencia/alineamiento. El porcentaje de alineamiento luego se resta del porcentaje de identidad de secuencia, calculado por el programa FASTDB antemencionado utilizando los parámetros especificados para llegar un resultado final de porcentaje de identidad de secuencia. Este puntaje corregido se puede utilizar para determinar cómo los alineamientos se "corresponden" entre sí, así como el porcentaje de identidad de secuencia. Los residuos de la secuencia de referencia que se extienden más allá de los extremos N o C de la secuencia de consulta se pueden considerar para fines de ajustar manualmente el puntaje del porcentaje de identidad de secuencia. Es decir, los residuos que no coinciden/se alinean con los extremos N o C de la secuencia de comparación se pueden contar al ajustar manualmente el puntaje del porcentaje de identidad de

secuencia o la numeración del alineamiento.

Por ejemplo, una secuencia de consulta de 90 aminoácidos se alinea con una secuencia de referencia de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La eliminación ocurre en el extremo N de la secuencia de consulta y, por lo tanto, el alineamiento FASTDB no muestra un emparejamiento/alineamiento de los primeros 10 residuos en el extremo N. Los 10 residuos no apareados representan un 10% de la secuencia de referencia (número de residuos en los extremos N y C no emparejados/número total de residuos en la secuencia de referencia) entonces 10% se sustrae del resultado del porcentaje de identidad de secuencia calculado por el programa FASTDB. Si los 90 residuos restantes coincidieran perfectamente (100 % de alineamiento), el porcentaje de identidad de secuencia final sería 90 % (100 % de alineamiento - 10 % de excedente sin emparejar). En otro ejemplo, una secuencia de consulta de 90 residuos se compara con una secuencia de referencia de 100, con la diferencia de que las eliminaciones son eliminaciones internas. En este caso, el porcentaje de identidad de secuencia calculado por FASTDB no se corrige manualmente de manera que no hay residuos en los extremos N o C de la secuencia sujeto que no se encuentren emparejados/alineados con la problema. En otro ejemplo, una secuencia de 110 aminoácidos se alinea con una

secuencia de referencia de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad de secuencia. La adición en la consulta ocurre en el extremo N de la secuencia de consulta y, por lo tanto, el alineamiento FASTDB puede no mostrar un
5 emparejamiento/alineamiento de los primeros 10 residuos en el extremo N. Si los 100 residuos de aminoácidos restantes de la secuencia de consulta tienen el 95 % de identidad de secuencia con la longitud completa de la secuencia de referencia, la adición de extremo N de la consulta se
10 ignoraría y el porcentaje de identidad de la secuencia de consulta con la de referencia sería del 95 %.

Según se utiliza en la presente, el término "sustitución conservadora" denota el reemplazo de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar. La sustitución
15 conservadora para este fin se puede definir como se establece en las tablas abajo. Los aminoácidos pueden clasificarse de acuerdo con propiedades físicas y la contribución a la estructura de proteínas secundarias y terciarias. Una sustitución conservadora se reconoce en la técnica como una
20 sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades similares. Los ejemplos de sustituciones conservadoras se establecen abajo en la tabla I.

Tabla I: sustituciones conservadoras

Característica de cadena Aminoácido
lateral

Alifático

5	No polar	Gly, Ala, Pro, Iso, Leu, Val
	Polar no cargado	Cys, Ser, Thr, Met, Asn, Gln
	Polar cargado	Asp, Glu, Lys, Arg
	<u>Aromático</u>	His, Phe, Trp, Tyr
	<u>Otro</u>	Asn, Gln, Asp, Glu

- 10 Alternativamente, los aminoácidos conservadores se pueden agrupar como se describe en Lehninger (1975) *Biochemistry*, segunda edición; Worth Publishers, págs. 71-77, como se establece abajo en la tabla II.

Tabla II: sustituciones conservadoras

15

Característica de cadena Aminoácido
lateral

No polar (hidrofóbica)

20	Alifático:	Ala, Leu, Iso, Val, Pro
	Aromático:	Phe, Trp
	Con azufre:	Met
	Límite:	Gly
	<u>Polar no cargado</u>	
	Hidroxilo:	Ser, Thr, Tyr
	Amidas:	Asn, Gln

	Sulfhidrilo:	Cys
	Límite:	Gly
	<u>Cargado positivamente</u>	Lys, Arg, His
	<u>(básico):</u>	
5	<u>Cargado negativamente (ácido)</u>	Asp, Glu

Y otras sustituciones conservadoras ejemplares alternativas se presentan abajo en la tabla III.

10 Tabla III: sustituciones conservadoras

	Residuo original	Sustitución ejemplar
	Ala (A)	Val, Leu, Ile
	Arg (R)	Lys, Gln, Asn
	Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
15	Asp (D)	Glu
	Cys (C)	Ser
	Gln (Q)	Asn
	Glu (E)	Asp
	His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
20	Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe
	Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
	Lys (K)	Arg, Gln, Asn
	Met (M)	Leu, Phe, Ile

	Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
	Pro (P)	Gly
	Ser (S)	Thr
	Thr (T)	Ser
5	Trp (W)	Tyr
	Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
	Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

10 Según se utiliza en la presente con respecto a los polipéptidos y polinucleótidos, el término "aislado" significa: (i) amplificado *in vitro*, por ejemplo, por reacción en cadena de polimerasa (PCR); (ii) producido de forma recombinante por clonación; (iii) purificado, por

15 ejemplo mediante escisión y separación en gel; o (iv) sintetizado, por ejemplo, por síntesis química. Un polinucleótido aislado es uno que se puede manipular fácilmente mediante procedimientos de ADN recombinante conocidos en la técnica. Por ende, una secuencia de

20 nucleótidos presente en un vector en el cual los sitios de restricción 5' y 3' son conocidos o para la cual las secuencias cebadoras de reacción en cadena de polimerasa (PCR) se han divulgado se considera aislada, pero una secuencia de polinucleótidos que se encuentra en su estado

natural en su hospedador natural no. Un polinucleótido y un polipéptido aislado pueden estar sustancialmente purificados, pero esto no es necesariamente así. Por ejemplo, un polinucleótido que está aislado dentro de un vector de expresión o de clonación no es puro en el hecho de que puede comprender solo un pequeño porcentaje del material en la célula en la que se aloja. Dicho polinucleótido está aislado, sin embargo, según se utiliza el término en la presente, porque se puede manipular fácilmente mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica.

Según se utiliza en la presente, se dice que una secuencia de codificación y una secuencia reguladora están "unidas operativamente" cuando están unidas covalentemente de modo tal de colocar la expresión o transcripción de la secuencia de codificación bajo la influencia o el control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias codificantes se traduzcan a una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN están unidas operativamente si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras 5' produce la transcripción de la secuencia de codificación y si la naturaleza de la unión entre las dos secuencias de ADN no (1) produce la introducción de una mutación marco-cambio, (2) interfieren con la capacidad de la región promotora de dirigir la transcripción de las secuencias de codificación o

(3) interfieren con la capacidad de la transcripción de ARN correspondiente de traducirse en una proteína. Por ende, una región promotora se uniría operativamente a una secuencia de codificación si la región promotora fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ADN de forma tal que la transcripción resultante se pudiera traducir en la proteína o el polipéptido deseado.

La naturaleza exacta de las secuencias reguladoras necesaria para la expresión génica puede variar entre las especies o los tipos de células, pero, en general, incluye según sea necesario, secuencias 5' de no transcripción y 5' de no traducción que participan en el inicio de la transcripción y la traducción respectivamente, por ejemplo, una caja TATA, secuencia de casquete, secuencia CAAT y similares. Específicamente, dichas secuencias reguladoras de no transcripción 5' incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para un control transcripcional del gen unido operativamente. Las secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias potenciadoras o secuencias activadoras corriente arriba según se desea.

Según se utiliza en la presente, un "vector" puede ser cualquiera de diversos polinucleótidos en los cuales una secuencia deseada se puede insertar mediante restricción y ligado para el transporte entre diferentes entornos genéticos

o para la expresión en una célula hospedadora. Los vectores están compuestos típicamente de ADN, aunque también hay vectores de ARN disponibles. Los vectores incluyen, entre otros, plásmidos y fagémidos. Un vector de clonación es un
5 vector que puede replicarse en una célula hospedadora y que además se caracteriza por uno o más sitios de restricción de endonucleasa en donde el vector se puede cortar de una forma determinable y en donde una secuencia de ADN deseada se puede ligar, de modo que el nuevo vector recombinante conserve su
10 capacidad de replicarse en la célula hospedadora. En el caso de los plásmidos, la replicación de la secuencia deseada puede ocurrir muchas veces a medida que el plásmido aumenta en el número de copias dentro de la bacteria hospedadora o solo una única vez por hospedador antes de que el hospedador
15 se reproduzca por mitosis. En el caso del fago, la replicación puede ocurrir activamente durante una fase lítica o pasivamente durante una fase lisogénica. Un vector de expresión es un vector en el cual una secuencia de ADN deseada se puede insertar mediante restricción y ligado de
20 modo que se una operativamente a las secuencias reguladoras y se pueda expresar como una transcripción de ARN. Los vectores además pueden contener una o más secuencias marcadoras adecuadas para utilizar en la identificación y selección de las células que se han transformado o transfectado con el

vector. Los marcadores incluyen, por ejemplo, genes codificantes de proteínas que aumentan o disminuyen o bien la resistencia o la sensibilidad a los antibióticos u otros compuestos, genes que codifican enzimas cuyas actividades se pueden detectar mediante ensayos estándar conocidos en la técnica (p. ej., β -galactosidasa o fosfatasa alcalina) y genes que afectan visiblemente el fenotipo de las células transformadas o transfectadas, hospedadores, colonias o placas. En algunas modalidades, los vectores son capaces de replicación autónoma y expresión de los productos génicos estructurales presentes en los segmentos de ADN a los cuales están unidos operativamente.

Anticuerpos de glicoproteína F anti-HeV y NiV novedosos o fragmento de anticuerpos

La presente invención deriva, en parte, del desarrollo, aislamiento y caracterización de anticuerpos novedosos o fragmentos de anticuerpo que se unen selectivamente e inhiben los virus Hendra y Nipah. Como se describe más completamente abajo, se ha demostrado que estos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se unen a la glicoproteína F y reducen o bloquean la infección de los virus Hendra y Nipah. El parátipo de los fragmentos Fab NiV y anti-HeV asociado con los epítomos de neutralización en la glicoproteína F de HeV y NiV está definido por las secuencias de aminoácidos (aa) de las

regiones de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina descritas en la tabla A y de la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 48. Otros anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y secuencias relacionadas se describen en SEQ ID NO: 49 - 80.

- 5 En algunas modalidades, la presente invención proporciona los anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos de estos que se unen selectivamente a las glicoproteínas F Hendra y Nipah de forma aislada y en preparaciones farmacéuticas. De forma similar, como se describe abajo, la
- 10 presente invención proporciona polipéptidos aislados, vectores, células hospedadoras transformadas con los polinucleótidos y composiciones y preparaciones farmacéuticas que incluyen polipéptidos aislados, que codifican los anticuerpos de glicoproteína F Hendra y Nipah de longitud
- 15 completa y/o los fragmentos de anticuerpos. Por último, la presente invención proporciona métodos, como se describen más detalladamente abajo, que emplean estos anticuerpos y polinucleótidos en el diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, la prevención y la terapia de la enfermedad del virus Hendra o
- 20 Nipah.

Las secuencias de aminoácidos completas de las partes Fab de unión al antígeno de los anticuerpos monoclonales Hendra y Nipah m5B3 (5B3 murino), h5B3 (5B3 humanizado) y h5B3.1 (5B3.1 humanizado), así como las regiones CDR, FR, V_H y V_L se

enumeran en la tabla A y se describen en la presente. SEQ ID NO: 1, 17 y 33 describen las secuencias de aminoácidos del fragmento Fd de los anticuerpos monoclonales Hendra y Nipah. Las secuencias de aminoácidos de las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 de cadena pesada se describen como (FR1, SEQ ID NO: 2, 18 y 34); (CDR1, SEQ ID NO: 3, 19 y 35); (FR2, SEQ ID NO: 4, 20 y 36); (CDR2, SEQ ID NO: 5, 21 y 37); (FR3, SEQ ID NO: 6, 22 y 38); (CDR3, SEQ ID NO: 7, 23 y 39); y (FR4, SEQ ID NO: 8, 24 y 40). SEQ ID NO: 9, 25 y 41 describen las secuencias de aminoácidos de los fragmentos variables de cadena ligera de los anticuerpos Hendra y Nipah. Las secuencias de aminoácidos de las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 de cadena ligera se describen como (FR1, SEQ ID NO: 10, 26 y 42); (CDR1, SEQ ID NO: 11, 27 y 43); (FR2, SEQ ID NO: 12, 28 y 44); (CDR2, SEQ ID NO: 13, 29 y 45); (FR3, SEQ ID NO: 14, 30 y 46); (CDR3, SEQ ID NO: 15, 31 y 47); (FR4, SEQ ID NO: 16, 32 y 48).

Actualmente, está establecido en la técnica que las regiones no CDR de un anticuerpo mamífero se pueden reemplazar por regiones similares de anticuerpos coespecíficos o heteroespecíficos, pero mantienen la especificidad epitópica del anticuerpo original. Esto se manifiesta más claramente en el desarrollo y uso de anticuerpos "humanizados" en donde las CDR no humanas se unen de forma covalente a regiones FR

humanas y/o Fc/pFc' para producir un anticuerpo funcional. Por ende, por ejemplo, la publicación internacional PCT número W0 92/04381 describe la producción y el uso de anticuerpos RSV murinos humanizados en donde al menos una
5 parte de las regiones FR murinas se han reemplazado por regiones FR de humano.

Por ende, como resultará evidente para el experto en la técnica, la presente invención también proporciona fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv, Fd y ScFv de anticuerpos de glicoproteína F
10 Hendra y Nipah; anticuerpos quiméricos en donde las regiones Fc y/o FR1 y/o FR2 y/o FR3 y/o FR4 y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de los anticuerpos Hendra y Nipah se han reemplazado por secuencias humanas o no humanas homólogas; fragmentos F(ab')₂ quiméricos en donde las regiones FR1 y/o FR2 y/o FR3 y/o FR4
15 y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de los anticuerpos de glicoproteína F Hendra y Nipah se han reemplazado por secuencias humanas o no humanas homólogas; fragmentos Fab quiméricos en donde las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 se han reemplazado por secuencias humanas o no humanas
20 homólogas; anticuerpos de fragmento Fd quimérico en donde las regiones FR1 y/o FR2 y/o FR3 y/o FR4 y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 se han reemplazado por secuencias humanas o no humanas homólogas; y ScFv en donde las regiones FR1 y/o FR2 y/o FR3 y/o FR4 y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 se han reemplazado por

secuencias humanas o no humanas homólogas. Por lo tanto, los expertos en la técnica pueden alterar los anticuerpos Hendra y Nipah mediante la construcción de anticuerpos quiméricos o injertados en CDR o fragmentos de anticuerpos que contienen la totalidad o parte de las secuencias de aminoácidos de CDR de la región V de cadena ligera y pesada descritas (Jones, P.T. et al. 1986 *Nature* 321:522-525; Verhoeyen, M. et al. 1988 *Science* 39:1534-1536; y Tempest, P.R. et al. 1991 *Biotechnology* 9:266-271), sin destruir la especificidad de los anticuerpos por el epítipo de glicoproteína F. Dichos anticuerpos quiméricos o injertados en CDR o FR o fragmentos de anticuerpos pueden ser eficaces para prevenir y tratar la infección del virus Hendra o Nipah en los animales (p. ej., caballos) y el hombre.

En algunas modalidades, se pueden producir anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos en donde parte o la totalidad de las regiones FR de los anticuerpos de glicoproteína F Hendra y Nipah se han reemplazado por otras regiones FR humanas homólogas. Además, se pueden reemplazar las porciones Fc para producir anticuerpos IgA o IgM, así como IgG que contengan parte o la totalidad de las CDR de los anticuerpos de glicoproteína F Hendra y Nipah. Resulta de particular importancia la inclusión de las CDR de cadena pesada del anticuerpo de glicoproteína F Hendra y Nipah, en menor

medida, las otras CDR de los anticuerpos de glicoproteína F Hendra y Nipah. Dichos anticuerpos humanizados y/o fragmentos de anticuerpos tienen una utilidad particular en el hecho de que no producen una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo mismo.

La presente invención describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este que se une selectivamente a una glicoproteína F de virus Hendra o virus Nipah, en donde dicho anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 5, 7, 19, 21, 23, 35, 37 y 39; y una región variable de cadena ligera que comprende al menos una CDR que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, 13, 15, 27, 29, 31, 43, 45 y 47. En particular, la presente invención describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este que se une selectivamente a una glicoproteína F de virus Hendra o virus Nipah, en donde dicho anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 35, 37 y 39; y una región variable de cadena ligera que comprende al

menos una CDR que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 43, 45 y 47.

La presente invención describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede comprender una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 35, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede comprender una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 37; y/o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede comprender una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 39. Además, la presente invención describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede comprender una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 43, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede comprender una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 45; y/o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede comprender una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 47.

La presente invención describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada con al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %

de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, 17 o 33. La presente invención describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1, 17 o 33. En
5 algunas modalidades, el fragmento de anticuerpo es un ScFv, Fab, F(ab')₂ o Fd.

La presente invención describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera con al menos el 90 % o el 99 % de identidad de secuencia con
10 SEQ ID NO: 19, 25 o 41. La presente invención describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 9, 25 o 41. En algunas modalidades, el fragmento de anticuerpo es un ScFv, Fab o F(ab')₂.

15 La presente invención describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1, 17 o 33 y una región variable de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, 25 o 41.

20 La presente invención describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une selectivamente a la glicoproteína F del virus Hendra o el virus Nipah, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas

del grupo que consiste en: la región FR1 que comprende SEQ ID NO: 2, 18 o 34, la región FR2 que comprende SEQ ID NO: 4, 20 o 36, la región FR3 que comprende SEQ ID NO: 6, 22 o 38 y la región FR4 que comprende SEQ ID NO: 8, 24 o 40. Además, la presente invención describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une selectivamente a la glicoproteína F del virus Hendra o el virus Nipah, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: la región FR1 que comprende SEQ ID NO: 10, 26 o 42, la región FR2 que comprende SEQ ID NO: 12, 28 o 44, la región FR3 que comprende SEQ ID NO: 14, 30 o 46 y la región FR4 que comprende SEQ ID NO: 16, 32 o 48.

En algunas modalidades, la presente invención describe un fragmento de anticuerpo ScFv que comprende V_H y V_L que tienen una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, 17, 33, 9, 25 y 41. V_H y V_L pueden estar conectados por un péptido conector con una longitud de 2-50 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento ScFv puede comprender un V_H de SEQ ID NO: 33 y un V_L de SEQ ID NO: 41, en donde el péptido conector puede comprender 10-25 aminoácidos. En algunas modalidades, el péptido conector puede comprender SEQ ID NO: 52.

En algunas modalidades, la invención se refiere a un

anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une selectivamente a la glicoproteína F del virus Hendra o el virus Nipah, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: la región FR1 que comprende SEQ ID NO: 34, la región FR2 que comprende SEQ ID NO: 36, la región FR3 que comprende SEQ ID NO: 38 y la región FR4 que comprende SEQ ID NO: 40 y una cadena ligera que comprende una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: la región FR1 que comprende SEQ ID NO: 42, la región FR2 que comprende SEQ ID NO: 44, la región FR3 que comprende SEQ ID NO: 46 y la región FR4 que comprende SEQ ID NO: 48.

La presente invención describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado que se une selectivamente a una glicoproteína F del virus Hendra o el virus Nipah, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 17 o 33. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o 33. La presente invención describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo

humanizado que se une selectivamente a una glicoproteína F del virus Hendra o el virus Nipah, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 25 o 41. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o 41.

10 En algunas modalidades, la presente invención describe un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y/o ligera con un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con regiones variables de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo
15 codificado en los plásmidos contenidos en células Freestyle™ 293 depositadas como depósito PTA-120575 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). En algunas modalidades, la presente invención describe un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera con secuencias
20 idénticas con regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo codificado en los plásmidos contenidos en células Freestyle™ 293 depositadas como depósito PTA-120575 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

La presente invención describe un anticuerpo o fragmento de

anticuerpo humanizado que se une selectivamente a un epítopo de glicoproteína F de virus Hendra o virus Nipah, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo inhibe la infección del virus Hendra o Nipah. La presente invención describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado que se une selectivamente a un epítopo de glicoproteína F de virus Hendra o virus Nipah, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo altera la fusión de membrana hospedadora del virus. La presente invención describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado que se une selectivamente a un epítopo de glicoproteína F de virus Hendra o virus Nipah, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo bloquea el plegamiento de la glicoproteína F. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo inhibe la infección del virus Hendra o Nipah mediante la alteración de la fusión de membrana hospedadora del virus. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo altera la fusión de membrana hospedadora del virus mediante el bloqueo del plegamiento de la glicoproteína F.

También es posible, de acuerdo con la presente invención, producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos quiméricos que incluyen secuencias no humanas. Por ende, se puede utilizar, por ejemplo, secuencias de Fe o FR murinos, ovinos,

equinos, bovinos u otros mamíferos para reemplazar algunas o todas las regiones Fe o FR de los anticuerpos de glicoproteína F de Hendra y Nipah. También se pueden reemplazar algunas de las CDR. Dichos anticuerpos y
5 fragmentos de anticuerpos quiméricos contienen secuencias de inmunoglobulina no humana mezcladas con las CDR de los anticuerpos de glicoproteína F de Hendra y Nipah humanos. Estos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se pueden utilizar, entre otros, durante períodos breves o en
10 individuos inmunodeprimidos. Los virus Hendra y Nipah también infectan animales y se pueden utilizar dichos anticuerpos durante períodos breves o en sujetos inmunodeprimidos.

Para inoculación o usos profilácticos, en algunas modalidades, los anticuerpos de la presente invención son
15 moléculas de anticuerpo de longitud completa que incluyen la región Fc. Dichos anticuerpos de longitud completa pueden tener vidas medias más largas que los fragmentos de anticuerpos más pequeños (p. j., Fab) y son más adecuados para la administración intravenosa, intraperitoneal,
20 intramuscular, intracavidad, subcutánea o transdérmica.

En algunas modalidades, se pueden utilizar fragmentos Fab y otros fragmentos de anticuerpos, incluso, entre otros, fragmentos Fab quiméricos. Los Fab ofrecen varias ventajas sobre $F(ab')_2$ y moléculas de inmunoglobulina completas para

esta modalidad terapéutica. Primero, debido a que los Fab solo tienen un sitio de unión para su antígeno cognado, la formación de complejos inmunes queda excluida considerando que dichos complejos pueden ser generados cuando los $F(ab')_2$ bivalentes y las moléculas de inmunoglobulina completas encuentran su antígeno diana. Esto tiene cierta importancia ya que la deposición de complejos inmunes en tejidos puede producir reacciones inflamatorias adversas. Segundo, debido a que los fragmentos Fab carecen de una región Fc, generalmente no pueden activar reacciones inflamatorias adversas que son activadas por Fc, por ejemplo la activación de la cascada del complemento. Tercero, es probable que la penetración de tejidos de la molécula de Fab pequeña sea mejor que la del anticuerpo completo grande. Cuarto, los fragmentos Fab se pueden producir fácilmente y de forma económica en bacterias, por ejemplo *E. coli*, considerando que las moléculas de anticuerpos de inmunoglobulina completas requieren células de mamífero para su producción en cantidades útiles. Esto último conlleva la transfección de secuencias de inmunoglobulina en células de mamífero con una transformación resultante. La amplificación de estas secuencias se puede lograr a través de procedimientos selectivos rigurosos y se deben identificar y mantener transformantes estables. Las moléculas de inmunoglobulina completas se pueden producir a través de

células de mamífero de alta expresión transformadas de manera estable en cultivo con los problemas concomitantes de medio de cultivo que contiene suero. Por el contrario, la producción de Fab en *E. coli* elimina estas dificultades y
5 hace posible producir estos fragmentos de anticuerpos en grandes fermentadores que son menos costosos que los productos derivados de cultivo celular.

Para unirse o inhibir el virus, además de los fragmentos Fab, también se pueden utilizar fragmentos de anticuerpos más
10 pequeños y péptidos de unión al epítipo que tienen especificidad de unión para los epítopos definidos por los anticuerpos contra Hendra y Nipah. Por ejemplo, se pueden construir anticuerpos de cadena simple de acuerdo con el método de la patente estadounidense N.º 4.946.778, de Ladner
15 et al. Los fragmentos de anticuerpos de cadena simple (p. ej. ScFv) comprenden las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas unidas por un resto enlazador flexible. Sin embargo, más pequeño es el fragmento de anticuerpo conocido como el anticuerpo de dominio simple o Fd, que comprende un
20 dominio simple V_H aislado. En la técnica se conocen técnicas para obtener un anticuerpo de dominio simple con al menos parte de la especificidad de unión del anticuerpo de longitud completa del cual deriva.

Es posible determinar, sin experimentación indebida, si un

anticuerpo o fragmento de anticuerpo quimérico o alterado tiene la misma especificidad que los anticuerpos contra Hendra y Nipah averiguando si el primero bloquea al último de la unión a la glicoproteína F. Si el anticuerpo o fragmento del mismo que se evalúa compite con un anticuerpo contra Hendra o Nipah conocido según lo demostrado por una disminución en la unión del anticuerpo contra Hendra o Nipah, entonces es posible que los dos anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos se unan al mismo epítopo, o un epítopo estrechamente separado. Aun otra manera de determinar si un anticuerpo tiene la especificidad de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra Hendra y Nipah conocidos es preincubar el anticuerpo de Hendra o Nipah conocido con la glicoproteína F con la cual normalmente es reactivo, y luego agregar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se evalúa para determinar si se inhibe la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se evalúa de unirse a la glicoproteína F. Si se inhibe el anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se evalúa, con toda probabilidad, es posible que tenga el mismo epítopo, o uno funcionalmente equivalente, y especificidad que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra Hendra y Nipah conocidos de la invención. El análisis de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra Hendra y Nipah también se puede llevar a cabo

utilizando virus Hendra o Nipah y determinando si el mAb neutraliza el virus.

Al utilizar los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención, es posible producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-idiotípicos que se pueden utilizar para analizar otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos para identificar si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo tiene la misma especificidad de unión que un anticuerpo de la invención. Además, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-idiotípicos se pueden utilizar para una inmunización activa (Herlyn, D. et al. 1986 *Science* 232:100-102). Dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos anti-idiotípicos se pueden producir utilizando técnicas de hibridoma conocidas (Kohler, G. y Milstein, C. 1975 *Nature* 256:495-497). Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-idiotípico es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que reconoce determinantes únicos presentes en el anticuerpo producido por la línea celular de interés. Estos determinantes están ubicados en la región hipervariable del anticuerpo. Es esta región la que se une a un epítipo determinado y, por lo tanto, es responsable de la especificidad del anticuerpo. Un anticuerpo anti-idiotípico se puede preparar mediante la inmunización de un animal con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de interés. El animal

inmunizado reconoce y responde a los determinantes idiotípicos del anticuerpo de inmunización y produce un anticuerpo para estos determinantes idiotípicos. Al utilizar los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-idiotípicos del animal inmunizado, que son específicos para los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención, es posible identificar otros clones con el mismo idiotipo que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo del hibridoma utilizado para la inmunización. La identidad idiotípica entre los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de dos líneas de células demuestra que los dos anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos son los mismos con respecto a su reconocimiento del mismo determinado epitópico. Por ende, al utilizar los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-idiotípicos, es posible identificar otros hibridomas que expresan anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que tienen la misma especificidad epitópica.

También es posible utilizar la tecnología antiidiotipo para producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que imitan un epítipo. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-idiotípico hecho para un primer anticuerpo tiene un dominio de unión en la región hipervariable que es la imagen del epítipo unido por el primer anticuerpo. Por ende, el anticuerpo anti-idiotípico puede ser utilizado para

la inmunización, ya que el dominio de unión del anticuerpo anti-idiotipo actúa eficazmente como un antígeno.

En algunas modalidades, la presente invención se refiere a anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos de glicoproteína F
5 que comprenden regiones variables de cadena pesada y/o regiones variables de cadena ligera y sustituciones conservadoras de las mismas. Las secuencias específicas de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se describen anteriormente. En un aspecto, las sustituciones son
10 conservadoras por naturaleza; sin embargo, la invención abarca sustituciones que también son no conservadoras.

Se entenderá que la definición de péptidos o polipéptidos de la invención pretende incluir polipéptidos que poseen modificaciones distintas de inserción, eliminación o
15 sustitución de residuos de aminoácidos. A modo de ejemplo, las modificaciones pueden ser covalentes por naturaleza e incluir, por ejemplo, unión química con polímeros, lípidos otros restos orgánicos e inorgánicos. Dichos derivados se pueden preparar para aumentar la vida media en circulación de
20 un polipéptido, o se pueden diseñar para mejorar la capacidad de focalización del polipéptido para células, tejidos u órganos deseados. De forma similar, la invención además abarca FGFBP3 o variantes del mismo que se han modificado covalentemente para incluir una o más uniones a polímero

soluble en agua tales como polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol.

Polinucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de glicoproteína F anti-HeV y NiV

5 Dada la descripción en la presente de las secuencias de aminoácidos del Fd de cadena pesada y los dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de Hendra o Nipah contra la glicoproteína F, el experto en la técnica puede producir polinucleótidos que
10 codifican este anticuerpo o que codifican los diversos fragmentos de anticuerpos o anticuerpos quiméricos descritos en presente. Se contempla que dichos polinucleótidos se unen operativamente a otros polinucleótidos que forman un vector recombinante para clonar o para la expresión de los
15 anticuerpos de la invención. La presente invención incluye cualquier vector recombinante que contiene las secuencias codificantes, o partes de las mismas, ya sea para transformación, transfección o terapia génica procariota o eucariota. Dichos vectores se pueden preparar utilizando
20 técnicas de biología molecular convencionales, conocidas para los expertos en la técnica, y comprenden secuencias codificantes de ADN para las regiones V de inmunoglobulina de los anticuerpos de Hendra y Nipah, incluso marco y CDR o partes de las mismas, y un promotor ya sea con una secuencia

señal (Whittle, N. et al. 1987 *Protein Eng* 1:499-505 y
Burton, D.R. et al. 1994 *Science* 266:1024-1027) o sin una
secuencia señal (Marasco, W.A. et al. 1993 *Proc Natl Acad Sci*
EUA 90:7889-7893 y Duan, L. et al. 1994 *Proc Natl Acad Sci*
5 *EUA* 91:5075-5079) para exportación o secreción. Dichos
vectores se pueden transformar o transfectar en células
procariotas (Huse, W.D. et al. 1989 *Science* 246:1275-1281;
Ward, S. et al. 1989 *Nature* 341:544-546; Marks, J.D. et al.
1991 *J Mol Biol* 222:581-597; y Barbas, C.F. et al. 1991 *Proc*
10 *Natl Acad Sci EUA* 88:7978-7982) o eucariotas (Whittle, N. et
al. 1987 *Protein Eng* 1:499-505 y Burton, D.R. et al. 1994
Science 266:1024-1027) o se pueden utilizar para terapia
génica (Marasco, W.A. et al. 1993 *Proc Natl Acad Sci EUA*
90:7889-7893 y Duan, L. et al. 1994 *Proc Natl Acad Sci EUA*
15 91:5075-5079) a través de técnicas convencionales, conocidas
para los expertos en la técnica.

Los vectores de expresión de la presente invención incluyen
secuencias reguladoras unidas operativamente a una secuencia
de nucleótidos que codifican uno de los anticuerpos de la
20 invención. Tal como se utiliza en la presente, la frase
"secuencias reguladoras" significa secuencias de nucleótidos
que son necesarias o conductoras para la transcripción de una
secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido deseado
y/o que son necesarias o conductoras para la traducción de la

transcripción resultante en el polipéptido deseado. Las secuencias reguladoras incluyen, entre otros, secuencias 5' tales como operadores, promotores y secuencias de unión al ribosoma, y secuencias 3' tales como señales de poliadenilación. Los vectores de la invención pueden incluir, 5 opcionalmente, secuencias de señal o líderes 5', secuencias 5' o 3' que codifican productos de fusión para ayudar en la purificación de proteínas, y diversos marcadores que ayudan en la identificación o selección de transformantes. La 10 elección y diseño de un vector adecuado se encuentra dentro de la capacidad y discreción del experto en la técnica. La purificación posterior de los anticuerpos se puede lograr a través de diversos medios estándar conocidos en la técnica.

En algunas modalidades, el vector para analizar anticuerpos o 15 fragmentos de anticuerpos puede ser una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica y es capaz de expresar un polipéptido de fusión que contiene, en la dirección del extremo amino al extremo carboxi, (1) un dominio de señal de secreción procariota, (2) 20 un polipéptido de la invención y, opcionalmente, (3) un dominio de proteína de fusión. El vector puede incluir o no secuencias reguladoras de ADN para expresar el polipéptido de fusión, p. ej., secuencias reguladoras procariotas. Dichos vectores pueden ser contruidos por los expertos en la

técnica y se han descrito por Smith, G.P. et al. (1985, *Science* 228: 1315-1317); Clackson, T. et al. (1991, *Nature* 352:624-628); Kang et al. (1991, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, vol. 2, R.A. Lerner y D.R. Burton, ed. Academic Press, NY, pp 111-118); Barbas, C.F. et al. (1991, *Proc Natl Acad Sci EUA* 88:7978-7982); Roberts, B.L. et al. (1992, *Proc Natl Acad Sci EUA* 89:2429-2433).

Un polipéptido de fusión puede ser útil para la purificación de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención. El dominio de fusión, por ejemplo, puede incluir una cola poli-His que permita la purificación en columnas Ni⁺ o la proteína de unión a maltosa del vector pMAL disponible comercialmente (New England Biolabs, Beverly, MA). En algunas modalidades, el dominio de fusión es un anclaje a la membrana del fago filamentoso. Este dominio es particularmente útil para analizar las bibliotecas de visualización de fagos de anticuerpos monoclonales pero pueden ser de menos utilidad para la producción en masa de anticuerpos. En algunas modalidades, el anclaje a la membrana del fago filamentoso es un dominio de la proteína de recubrimiento cpIII o cpVIII capaz de asociarse con la matriz de una partícula del fago filamentoso, incorporando así el polipéptido de fusión en la superficie del fago, para permitir la unión de fase sólida a antígenos o epítomos específicos y permitir así el

enriquecimiento y selección de los anticuerpos o fragmentos específicos codificados por el vector fagémido.

La señal de secreción, en general, es un dominio de péptido líder de una proteína que dirige la proteína a la membrana de la célula hospedadora, por ejemplo la membrana periplasmática de bacterias gramnegativas. En algunas modalidades, la señal de secreción para *E. coli* es una señal de secreción pelB. La secuencia líder de la proteína pelB se ha utilizado anteriormente como una señal de secreción para proteínas de fusión (Better, M. et al. 1988 *Science* 240:1041-1043; Sastry, L. et al. 1989 *Proc Natl Acad Sci EUA* 86:5728-5732; y Mullinax, R.L. et al., 1990 *Proc Natl Acad Sci EUA* 87:8095-8099). En Neidhard, F.C. (ed.), 1987 en *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: Typhimurium Cellular and Molecular Biology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C se pueden encontrar secuencias de residuos de aminoácidos para otros dominios de polipéptidos de señal de secreción de *E. coli* útiles en la presente invención.

Para lograr niveles altos de expresión génica en *E. coli*, es posible que sea necesario utilizar no solo promotores fuertes para generar grandes cantidades de ARNm, sino también sitios de unión al ribosoma para asegurar que el ARNm se traduce eficazmente. En *E. coli*, el sitios de unión al ribosoma incluye un codón de inicio (AUG) y una secuencia de 3-9

nucleótidos de largo ubicada 3-11 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio (Shine J. y Dalgarno L. 1975 Nature 254:34-38). La secuencia, denominada secuencia Shine-Dalgarno (SD), es complementaria al extremo 3' del ARNr 16S de *E. coli*. La unión del ribosoma al ARNm y la secuencia en el extremo 3' del ARNm se puede ver afectada por varios factores: el grado de complementariedad entre la secuencia SD y el extremo 3' del ARNr 16S; el espacio que se extiende entre la secuencia SD y el AUG; y la secuencia de nucleótidos después del AUG, que afecta la unión al ribosoma. Las secuencias reguladoras 3' definen al menos un codón de terminación (finalización) en el marco y unido operativamente al polipéptido de fusión heterólogo.

En algunas modalidades, con un hospedador de expresión procariota, el vector utilizado incluye un origen procariota de replicación o replicón, es decir, una secuencia de ADN que tiene la capacidad de dirigir una replicación autónoma y un mantenimiento de la molécula de ADN recombinante de forma extracromosómica en una célula hospedadora procariota, por ejemplo una célula hospedadora bacteriana, transformada con ella. Dichos orígenes de replicación son conocidos en la técnica. En algunas modalidades, los orígenes de replicación son los que son eficientes en el organismo hospedador. En algunas modalidades, la célula hospedadora es *E. coli*. En

algunas modalidades, para el uso de un vector en *E. coli*, el origen de replicación es ColEl encontrado en pBR322 y una variedad de plásmidos comunes diferentes. En algunas modalidades, el origen es un origen de replicación p15A encontrado en pACYC y sus derivados. Los replicones ColEl y p15A han sido utilizados extensamente en biología molecular, se encuentran disponibles en diversos plásmidos y son descritos por Sambrook et al., 1989, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2º edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Además, las modalidades que incluyen un replicón procariota también pueden incluir un gen cuya expresión confiere una ventaja selectiva, por ejemplo resistencia a fármacos, a un hospedador bacteriano transformado con él. Los genes de resistencia a fármacos bacterianos típicos son los que confieren resistencia a ampicilina, tetraciclina, neomicina/kanamicina o cloranfenicol. Los vectores también contienen típicamente sitios de restricción convenientes para la inserción de secuencias de ADN traducibles. Algunos vectores ejemplares son los plásmidos pUC18 y pUC19 y vectores derivados tales como los disponibles comercialmente en proveedores como Invitrogen (San Diego, CA).

Cuando los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención incluyen secuencias de cadena pesada y de cadena

ligera, estas secuencias pueden ser codificadas en vectores separados o, de forma más conveniente, pueden ser expresadas por un vector único. La cadena pesada y ligera, después de la traducción o después de la secreción, puede formar la estructura heterodimérica de las moléculas de anticuerpos naturales. Dicho anticuerpo heterodimérico se puede estabilizar o no a través de enlaces disulfuro entre las cadenas pesada y ligera.

Un vector para la expresión de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos heterodiméricos, por ejemplo los anticuerpos de longitud completa de la invención o los fragmentos de anticuerpos ScFv, $F(ab')_2$, Fab o Fv de la invención, es una molécula de ADN recombinante adaptada para recibir y expresar secuencias de ADN primarias y secundarias traducibles. Es decir, un vector de expresión de ADN para la expresión de un anticuerpo heterodimérico proporciona un sistema para clonar independientemente (insertar) las dos secuencias de ADN traducibles en dos casetes separados presentes en el vector, para formar dos cistrones separados para expresar los polipéptidos primarios y secundarios de un anticuerpo heterodimérico. El vector de expresión de ADN para expresar dos cistrones se denomina vector de expresión dicistrónico. En algunas modalidades, el vector comprende un primer casete que incluye secuencias reguladoras de ADN ascendentes y

descendientes unidas operativamente mediante una secuencia de nucleótidos adaptados para la ligación direccional a un ADN del inserto. La secuencia traducible ascendente puede codificar la señal de secreción según se describió
5 anteriormente. El casete incluye secuencias reguladoras de ADN para expresar el primer polipéptido de anticuerpo que se produce cuando una secuencia de ADN traducible del inserto (ADN del inserto) se inserta de forma direccional en el casete mediante la secuencia de nucleótidos adaptados para la
10 ligación direccional.

El vector de expresión dicistrónico también contiene un segundo casete para expresar el segundo polipéptido del anticuerpo. El segundo casete incluye una segunda secuencia de ADN traducible que puede codificar una señal de secreción,
15 como se describió anteriormente, unida operativamente en su extremo 3' mediante una secuencia de nucleótidos adaptados para la ligación direccional a una secuencia de ADN descendente del vector que define típicamente al menos un codón de finalización en el marco de lectura del casete. La
20 segunda secuencia de ADN traducible se une operativamente en su extremo 5' a las secuencias reguladoras de ADN que forman los elementos 5'. El segundo casete es capaz, tras la inserción de una secuencia de ADN traducible (ADN del inserto), de expresar el segundo polipéptido de fusión que

comprende una señal de secreción con un polipéptido codificado por el ADN del inserto.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la presente invención se pueden producir adicionalmente a través de
5 células eucariotas tales como células CHO, hibridomas humanos o de ratón, células B linfoblastoides inmortalizadas y similares. En este caso, se construye un vector en el cual las secuencias reguladoras eucariotas se unen operativamente a las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido
10 o polipéptidos del anticuerpo. El diseño y elección de un vector eucariota adecuado se encuentra dentro de la capacidad y discreción del experto en la técnica. La purificación posterior de los anticuerpos se puede lograr a través de diversos medios estándar conocidos en la técnica.

15 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la presente invención se pueden producir adicionalmente en plantas. En 1989, Hiatt A. et al. 1989 *Nature* 342:76-78 primero se demostró que los anticuerpos funcionales se podían producir en plantas transgénicas. Desde entonces, se ha invertido una
20 cantidad considerable de esfuerzo para desarrollar plantas para la producción de anticuerpos (o "planticuerpo") (para reseñas véase Giddings, G. et al. 2000 *Nat Biotechnol* 18:1151-1155; Fischer, R. y Emans, N. 2000 *Transgenic Res* 9:279-299). Los anticuerpos recombinantes pueden estar

dirigidos a semillas, tubérculos o frutos, haciendo ventajosa la administración de anticuerpos en dichos tejidos de plantas para programas de inmunización en países en desarrollo y a nivel mundial.

- 5 En otra modalidad, la presente invención proporciona células hospedadoras, tanto procariotas como eucariotas, transformadas o transfectadas con, y por lo tanto que incluyen, los vectores de la presente invención.

Preparaciones de anticuerpos de glicoproteína F anti-HeV y

10 Niv farmacéuticos y de diagnóstico

La invención también se refiere a métodos para preparar composiciones de diagnóstico o farmacéuticas que comprenden los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención o secuencias de polinucleótidos que codifican los anticuerpos o

15 fragmentos de anticuerpos de la invención, donde las composiciones farmacéuticas se utilizan para inmunoprofilaxis o inmunoterapia de enfermedad del virus Hendra o enfermedad del virus Nipah. La preparación farmacéutica incluye un portador farmacéuticamente aceptable. Dicho portador, tal

20 como se utiliza en el presente, se refiere a un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos. La frase "fisiológicamente aceptable" se refiere a un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico tal como

una célula, cultivo celular, tejido u organismo. Las características del portador dependen de la vía de administración. Los portadores fisiológica y farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, rellenos, sales, amortiguadores, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales que son conocidos en la técnica.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de glicoproteína F anti-Hendra y anti-Nipah de la invención se puede etiquetar a través de diversos medios para su uso en aplicaciones de diagnóstico y/o farmacéuticas. Hay muchas etiquetas y métodos diferentes de etiquetado conocidos para los expertos en la técnica. Los ejemplos de tipos de etiquetas que se pueden utilizar en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. El experto en la técnica conoce otras etiquetas adecuadas para la unión a los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención, o es capaz de determinarlas, utilizando experimentación de rutina. Además, la unión de estas etiquetas a los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se puede realizar utilizando técnicas estándar comunes para los expertos en la técnica.

Otra técnica de etiquetado que puede producir una mayor sensibilidad consiste en acoplar los anticuerpos a haptenos

de peso molecular bajo. Estos haptenos se pueden alterar específicamente por medio de una segunda reacción. Por ejemplo, es común utilizar haptenos tales como biotina, que reacciona con avidina, o dinitrofenol, piridoxal, o
5 fluoresceína, que puede reaccionar con anticuerpos anti-haptenos específicos.

Los materiales para su uso en el ensayo de la invención son idealmente adecuados para la preparación de un kit. Dicho kit puede comprender un medio portador que se compartimenta para
10 recibir en encierro cercano uno o más medios recipientes tales como viales, tubos y similares, donde cada uno de los medios recipientes comprende uno de los elementos separados que se utilizarán en el método. Por ejemplo, uno de los medios recipientes puede comprender un anticuerpo y/o
15 fragmento de anticuerpo de la invención que es, o puede ser, etiquetado de manera detectable. El kit también puede tener recipientes que contienen amortiguadores y/o un recipiente que comprende un medio indicador, por ejemplo una proteína de unión a biotina, tal como avidina o estreptavidina, unido a
20 una molécula indicadora, tal como una etiqueta enzimática o fluorescente.

Detección y diagnóstico in vitro

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención son adecuados para su uso in vitro, por ejemplo, en

inmunoensayos en los que se pueden utilizar en fase líquida o unidos a un portador de fase sólida. Además, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en estos inmunoensayos pueden ser etiquetados de manera detectable de diversas maneras. Los ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos ya sea en formato directo o indirecto. Los ejemplos de dichos inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo sándwich (inmunométrico). La detección de antígenos utilizando los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se puede realizar utilizando inmunoensayos que se ejecutan en cualquiera de los modos directo, inverso o simultáneo, incluso ensayos inmunohistoquímicos en muestras fisiológicas. Los expertos en la técnica conocen, o pueden discernir fácilmente, otros formatos de inmunoensayo sin experimentación indebida.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se pueden unir a muchos portadores diferentes y se pueden utilizar para detectar la presencia de virus Hendra o Nipah. Los ejemplos de portadores conocidos incluyen vidrio, polietileno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasa, celulosa natural y modificada, poliacrilamida, agarosa y magnetita. La naturaleza del portador puede ser

soluble o insoluble para los fines de la invención. Los expertos en la técnica conocen otros portadores adecuados para unir anticuerpos, o son capaces de determinarlos, utilizando experimentación de rutina.

- 5 Para los fines de la invención, los virus Hendra o Nipah pueden ser detectados a través de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención cuando se encuentran presentes en tejidos o fluidos biológicos. Se puede utilizar cualquier muestra que contenga una cantidad
- 10 detectable de virus Hendra o Nipah. Una muestra puede ser un líquido tal como orina, saliva, fluido cerebroespinal, sangre, suero o similar; un sólido o semisólido tal como tejidos, heces o similares; o, alternativa, un tejido sólido tal como los utilizados comúnmente en diagnóstico
- 15 histológico.

Detección in vivo de virus Hendra o Nipah

- Al utilizar los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención para la detección in vivo de antígeno, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo etiquetado de manera
- 20 detectable se proporciona en una dosis que es eficaz desde el punto de vista del diagnóstico. La frase "eficaz desde el punto de vista del diagnóstico" significa que la cantidad de anticuerpo etiquetado de forma detectable se administra en una cantidad suficiente para permitir la detección del sitio

que tiene el antígeno del virus Hendra o Nipah para el cual los anticuerpos son específicos.

La concentración de anticuerpo o fragmento de anticuerpo etiquetado de forma detectable que se administra será lo
5 suficiente para que la unión a virus Hendra o Nipah sea detectable en comparación con el fondo. Además, se desea que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo etiquetado de forma detectable se limpie rápidamente del sistema circulatorio para proporcionar la mejor proporción diana a señal de fondo.

10 Como norma, la dosificación de anticuerpo o fragmento de anticuerpo etiquetado de forma detectable para diagnóstico in vivo varía dependiendo de factores tales como la edad, sexo y extensión de la enfermedad del individuo. La dosificación de anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede variar entre
15 aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg, p. ej. entre 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg, o entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 2 mg/kg. Dichas dosificaciones pueden variar, por ejemplo, dependiendo de si se proporcionan múltiples inyecciones, en el tejido que se
20 evalúa, y otros factores conocidos para los expertos en la técnica.

Para imagenología para diagnóstico in vivo, el tipo de instrumento de detección disponible es un factor principal para seleccionar un radioisótopo adecuado. El radioisótopo

elegido debe tener un tipo de deterioro detectable para el tipo de instrumento determinado. Aun otro factor importante para seleccionar un radioisótopo para el diagnóstico in vivo es que la vida media del radioisótopo tiene que ser lo
5 suficientemente larga para seguir siendo detectable en el momento de absorción máxima por parte de la diana, pero lo suficientemente corta para que la radiación perjudicial con respecto al hospedador sea aceptable. Idealmente, un radioisótopo utilizado para imagenología in vivo carece de
10 una emisión de partículas pero produce una gran cantidad de fotones en el intervalo 140-250 keV, que se puede detectar fácilmente a través de cámaras gamma convencionales.

Para el diagnóstico in vivo, los radioisótopos se pueden unir a anticuerpos o fragmentos de anticuerpos ya sea directa o
15 indirectamente mediante el uso de un grupo funcional intermedio. Los grupos funcionales intermedios que se suelen utilizar para unir radioisótopos que existen como iones metálicos son los agentes quelantes bifuncionales tales como ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) y ácido
20 etilendiaminotetra-acético (EDTA) y moléculas similares. Ejemplos típicos de iones metálicos que se pueden unir a los anticuerpos de la invención son ^{111}In , ^{97}Ru , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr y ^{201}Tl .

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención

también pueden ser etiquetados con un isótopo paramagnético para los fines de diagnóstico in vivo, como en imagenología por resonancia magnética (MRI) o resonancia de espín electrónico (ESR). En general, se puede utilizar cualquier
5 método convencional para visualizar imágenes de diagnóstico. Usualmente, se utilizan radioisótopos de emisión de positrones y gamma para imagenología por cámara e isótopos paramagnéticos para MRI. Los elementos que son particularmente útiles en dichas técnicas incluyen ^{157}Gd , ^{55}Mn ,
10 ^{162}Dy , ^{52}Cr y ^{56}Fe .

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se pueden utilizar in vitro e in vivo para monitorizar el curso de la terapia contra la enfermedad del virus Hendra o la enfermedad del virus Nipah. Por ende, por ejemplo, al
15 medir el aumento o disminución en la cantidad de células infectadas con virus Hendra o Nipah o los cambios en la concentración de virus Hendra o Nipah presente en el cuerpo o en diversos fluidos corporales, es posible determinar si un régimen terapéutico particular que apunta a mejorar la
20 enfermedad del virus Hendra o la enfermedad del virus Nipah es eficaz.

Profilaxis y terapia de la enfermedad del virus Hendra y la enfermedad del virus Nipah

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos también se pueden

utilizar en profilaxis y como terapia para la enfermedad del virus Hendra y la enfermedad del virus Nipah tanto en seres humanos como en otros animales. Los términos "profilaxis" y "terapia" tal como se utilizan en la presente junto con los anticuerpos de la invención denotan tanto administración profiláctica como administración terapéutica y tanto inmunización pasiva con productos de polipéptidos sustancialmente purificados como terapia génica mediante transferencia de secuencias de polipéptidos que codifican el producto o parte del mismo. Por ende, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden ser administrados a sujetos de alto riesgo para reducir la probabilidad y/o la gravedad de la enfermedad del virus Hendra y la enfermedad del virus Nipah, o pueden ser administrados a sujetos que ya muestran infección activa de virus Hendra p Nipah. En la presente invención, los fragmentos ScFv o Fab también se unen o neutralizan el virus Hendra o Nipah y, por lo tanto, se pueden utilizar para tratar infecciones.

Tal como se utiliza en la presente, una "cantidad profilácticamente eficaz" de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención es una dosificación lo suficientemente grande para producir el efecto deseado en la protección de individuos contra la infección del virus Hendra o Nipah durante un período razonable, por ejemplo entre uno y

dos meses o más después de la administración. Sin embargo, una cantidad profilácticamente eficaz no es una dosis tan larga como para ocasionar efectos adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia
5 cardíaca congestiva y similares. Generalmente, una cantidad profilácticamente eficaz puede variar con la edad, afección y sexo del sujeto, así como la extensión de la enfermedad en el sujeto y puede ser determinada por el experto en la técnica. El médico o veterinario del individuo puede ajustar la
10 dosificación de la cantidad profilácticamente eficaz en caso de contraindicaciones. Una cantidad profilácticamente eficaz puede variar entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg, p. ej., entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg, o entre aproximadamente
15 0,2 mg/kg y aproximadamente 2 mg/kg, en una o más administraciones (cebado y estimulación).

Tal como se utiliza en la presente, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención es una dosificación lo
20 suficientemente grande para producir el efecto deseado en el cual se mejoran los síntomas de la enfermedad del virus Hendra o la enfermedad del virus Nipah o se disminuye la probabilidad de infección. Sin embargo, una cantidad terapéuticamente eficaz no es una dosis tan larga como para

ocasionar efectos adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva y similares. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar con la edad, afección y sexo del sujeto, así como la extensión de la enfermedad en el sujeto y puede ser determinada por el experto en la técnica. El médico o veterinario del individuo puede ajustar la dosificación de la cantidad terapéuticamente eficaz en caso de contraindicaciones. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg, p. ej., entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg, o entre aproximadamente 0,2 mg/kg y aproximadamente 2 mg/kg, en una o más administraciones diarias, durante uno o varios días. En algunas modalidades, la administración del anticuerpo se lleva a cabo de 2 a 5 o más días consecutivos para evitar que se produzca un "rebote" de replicación del virus.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención pueden ser administrados mediante inyección o por infusión gradual a través del tiempo. La administración de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención, por ejemplo, puede ser intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, subcutánea o transdérmica. Las técnicas para preparar sistemas de administración de

inyección o infusión que contienen los anticuerpos son conocidas para los expertos en la técnica. En general, dichos sistemas utilizan componentes que no dañan significativamente las propiedades biológicas de los anticuerpos, por ejemplo la
5 capacidad de unión al parátipo (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18^o edición, 1990, Mack Publishing). Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los diversos parámetros y afecciones para producir inyectados o infusiones de anticuerpos sin recurrir a
10 experimentación indebida.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales
15 como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluidos los medios salinos y amortiguados. Los vehículos parenterales incluyen solución de
20 cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, cloruro de sodio y dextrosa, solución láctica de Ringer lactado o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos (tales como aquellos basados en la dextrosa de Ringer), y similares. Los

conservantes y otros aditivos también pueden estar presentes como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y similares.

Generación de m5B3 ScFv, h5B3 y h5B3.1

5 Se modificaron genéticamente varias formas solubles de NiV o HeV F (sF) y se produjeron construcciones sF recombinantes. El sobrenadante del cultivo de células 293T estables que expresaban las diferentes formas de NiV y HeV sF se recogió y se clarificó antes de la purificación de cromatografía por
10 afinidad con perlas de agarosa de proteína S (Novagen Corp). El material purificado con agarosa de S se aplicó a una columna de filtración en gel de grado preparativo HiLoad 16/60 Superdex 200 para aislar trímero puro. Se inocularon ratones Balb/cJ (Jackson Laboratory) con antígeno viral
15 soluble purificado diferente como se muestra en la tabla 1, 4 veces en intervalos de 30 días. Cuando se indicó, la sF escindida con etiqueta S enzimática se utilizó para inmunización. Se extrajo muestra de sangre de cada ratón antes de la inmunización para obtener suero (antes de la
20 extracción de sangre) como control negativo. En una sola inmunización, se proporcionó 12 µg de sF mezclado con sistema adyuvante Sigma TM (Sigma) a cada animal. Cada inmunización se proporcionó en una dosis de 0,1 ml administrada a través de inyecciones subcutáneas e intraperitoneales de 0,05 ml en

cada uno de los 2 sitios con una aguja calibre 25. Se realizaron formulaciones adyuvantes y de antígeno en función de las instrucciones del fabricante. Se extrajo muestra de sangre de los ratones 7-10 días después de la 3^o inmunización y se cosecharon muestras de suero. Cuatro días antes de sacrificar los ratones para la última recolección de sangre, se realizó otra inmunización sin adyuvante. Todas las construcciones de glicoproteína sF provocan una respuesta al anticuerpo fuerte entre los ratones inmunizados. El título de punto de destino ELISA de cada ratón fue mayor que 1:320.000 en todos los casos y se pudo precipitar F de longitud completa natural F expresada en células HeLa. En la mayoría de los casos, el suero recolectado de los ratones inmunizados inhibe las infecciones del virus NiV y HeV.

Se produjo una forma de sF eliminando los dominios transmembrana (TM) y de cola citoplasmática (CT) y agregando un dominio de hélice superenrollada trimérico (GCNt). Las construcciones agregadas a GCNt (sF_{GCNt}) produjeron anticuerpo neutralizante de henipavirus de reactividad cruzada en ratones. Además, las construcciones sF_{GCNt} podían ser accionadas in vitro por escisión de proteasa seguido de tratamiento con calor. Se derivó una serie de anticuerpos monoclonales (mAb) de los ratones que habían sido inmunizados con diferentes sF, p. ej. las NiV sF_{dFp} y NiV sF_{GCNt} no

agregadas a GCNT.

Se fusionaron linfocitos de los ratones inmunizados con la línea celular Sp2/0 disponible comercialmente (células de mieloma murino) utilizando polietilenglicol de alto peso molecular (PEG) y se seleccionaron células de hibridoma de acuerdo con prácticas estándar. Se seleccionaron linfocitos fusionados con células de mieloma murino mediante el pasaje de cultivos en medio con complemento de hipoxantina, aminopterina y timadina (HAT, Invitrogen). Se identificaron líneas celulares de hibridoma que secretaban anticuerpo reactivo con el antígeno viral a través de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando sobrenadante recolectado de cada pocillo. Se aislaron colonias que secretaban mAb que se une a sF y se sometieron a dilución limitante al menos dos veces para asegurar la capacidad de clonación. Se preparó mAb purificado a partir de células de hibridoma cultivadas a alta densidad en medio SFM4MAb (Hyclone) complementado con hipoxantina y timadina (HT, Invitrogen) y 100 U/ml de interleucina de ratón recombinante 6 (rl L-6, Roche Applied Biosciences). Se purificó anticuerpo en el sobrenadante de cultivos gastado utilizando una cromatografía por afinidad de perlas de sefarosa de proteína G (GE Healthsciences). Se determinó la concentración de cada preparación utilizando ensayo Bradford.

En base a la evaluación ELISA del sobrenadante del cultivo de la placa de fusión, se identificaron más de 60 coles de hibridoma que secretan anticuerpos que reaccionan con sF. Se seleccionaron 24 clones para una purificación adicional
5 mediante dilución limitante para generar líneas de hibridoma estables para aislamiento de mAb y 19 de estos mAb se utilizaron para caracterización. 18 mAb tienen reactividad cruzada para NiV y HeV F y 1 es específico de NiV. Entre la biblioteca de mAb, 13 pudieron precipitar F de longitud
10 completa y sF_{GCNt} (F antes de la fusión) y los precipitados restantes solo sF_{dFp} (después de la fusión F). De los trece mAb específicos de la prefusión, 12 precipitaron F₀ y F₁ y 1 mAb solo precipitó F₀. Esta observación sugiere que se puede adquirir una conformación diferente mediante F escindida y no
15 escindida. Seis de los mAb que solamente precipitaron F después de la fusión se evaluaron en transferencia western y se encontró que reconocían epítomos lineales. Diez mAb se evaluaron en inhibición de ingreso de virus pseudotipado NiV y HeV, se mostró que inhibían la entrada y otros dos
20 adicionales se inhibían en mayor concentración. Uno de los mAb (5B3 o m5B3 murino) se evaluó en infección de NiV y HeV vivos y se mostró que se neutralizaba en una concentración de 12,5 µg/ml para HeV y 1,5 µg/ml para NiV.
m5B3 era uno de los mAb específicos de F. Además, se

determinó que m5B3 reconoció un epítipo dependiente de la conformación y además pudo neutralizar completamente 200TCID₅₀ NiV y HeV infecciosos en concentraciones de 1,5 y 12,5 µg/ml, respectivamente. Utilizando una inmunoprecipitación seguida de análisis de transferencia Western, se determinó que m5B3 se une solo a NiV y HeV sF_{GCNT} y las formas de glicoproteína F NiV y HeV de tipo salvaje, de longitud completa de sF y F natural que existe evidentemente en el estado conformacional pre-fusión.

Se sintetizó el ADNc del clon de hibridoma de ratón 5B3 y las regiones variables de las secuencias de cadena pesada (V_H) y ligera (V_L) se ampliaron utilizando varios conjuntos de cebadores universales, clonados y secuenciados (figura A). El péptido y las secuencias fragmento en la figura A se muestran por SEQ ID NO: 1-16, como se enumera en la tabla A. Un ScFv de 5B3 murino (m5B3), SEQ ID NO: 49, se construyó con V_H (SEQ ID NO: 1) y V_L (SEQ ID NO: 9) conectados por un péptido conector de (G₄S)₃, SEQ ID NO: 52, seguido por el péptido S y la etiqueta His en un promotor modificado disponible a nivel comercial vector de expresión mamífero ADNpc 3.1 Higo (+) (Invitrogen Corp) (7) (figura B). Se expresó ScFv soluble de m5B3 en célula de suspensión 293 Freestyle™ y se purificó utilizando columna de afinidad de S agarosa seguido por cromatografía de exclusión por tamaño. La figura 2A muestra

que ScFv de m5B3 expresado transitorio fue capaz de unirse a F soluble (sF) y de longitud completa (FL).

Basándose en la secuencia FR conservada de m5B3, se construyó una biblioteca de ScFv humano. Los clones de esta biblioteca
5 se seleccionaron basándose en el alto nivel de expresión en *E. coli*. Las secuencias FR de los clones de ScFv humanos seleccionados se alinearon con la de ScFv de m5B3. Los residuos humanos conservados se identificaron y mutaron en las posiciones homólogas FR de m5B3 produciendo un 5B3
10 humanizado (h5B3) como se muestra en la figura 3A. La figura 3A, panel superior, SEQ ID NO: 53 - regiones FR de V_H combinadas de h5B3; SEQ ID NO: 54 - regiones FR de V_H combinadas de m5B3; SEQ ID NO: 55-66 - clones de biblioteca de ScFv humano que contienen regiones FR de V_H combinadas
15 como se muestra en la figura 3A. La figura 3A, panel inferior, SEQ ID NO: 67 - regiones FR de V_L combinadas de h5B3; SEQ ID NO: 68 - regiones FR de V_L combinadas de m5B3; SEQ ID NO: 69-80 - clones de biblioteca de ScFv humano que contienen regiones FR de V_L combinadas como se muestra en la
20 figura 3A.

El ScFv de h5B3 se sintetizó, se clonó, se expresó y se purificó del mismo modo que ScFv de m5B3. El péptido y las secuencias fragmento de h5B3 se muestran en SEQ ID NO: 17-32, como se enumera en la tabla A. El ScFv de h5B3 tiene una

secuencia de péptidos de SEQ ID NO: 50, en donde el V_H (SEQ ID NO: 17) y V_L (SEQ ID NO: 25) de h5B3 están conectados por un péptido conector (SEQ ID NO: 52). Después, se generó otra versión de h5B3, que se denominó h5B3.1 en donde un residuo
5 en cada una de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) CDR1 y 2, y dos residuos en CDR3 mutaron a residuos humanos conservados basándose en la secuencia de la biblioteca de ScFv humano como se mencionó arriba (figura 3B). El h5B3.1 se expresó y se purificó como
10 ScFv de h5B3. El péptido y las secuencias fragmento de h5B3.1 se muestran en SEQ ID NO: 33-48, como se enumera en la tabla A. El ScFv de h5B3.1 tiene una secuencia de péptidos de SEQ ID NO: 51, en donde el V_H (SEQ ID NO: 33) y V_L (SEQ ID NO: 41) de h5B3.1 están conectados por un péptido conector (SEQ ID
15 NO: 52).

Como se muestra en la figura 2A, h5B3 y h5B3.1 pudieron unirse a FL F.

Generación de IgG1 de h5B3 y h5B3.1

V_H y V_L de h5B3 y h5B3.1 se clonaron en el vector pDR12 para
20 generar IgG1 completa. Se demostró que h5B3- y h5B3.1-IgG1 se unían a FL F (figura 2B). Los marcos de lectura abierta (ORF) de la cadena pesada y ligera de IgG1 de h5B3.1 se clonaron en un vector de expresión potenciado por un promotor como se muestra en la figura 4A y se utilizó la construcción para

desarrollar una línea celular de suspensión 293 Freestyle™ estable que produjo alto rendimiento (aproximadamente 8 mg/matraz de agitación) de IgG1 de h5B3.1 en matraces de agitación en medio libre de suero (figura 4B).

- 5 Las células 293 de la línea celular Freestyle™ que contenían un plásmido codificante del anticuerpo h5B3.1 se depositaron como depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) PTA-120575.

Las afinidades de m5B3, h5B3- y h5B3.1-IgG1 se determinaron como se muestra en la tabla 1, que demuestra la cinética de unión de m5B3, h5B3 y h5B3.1 contra sF.

Tabla 1: análisis de cinética de unión de m5B3, h5B3 y h5B3.1 contra F soluble

mAb	ka (l/Ms)	kd (l/s)	Rmax (RU)	Concentración de sF	KA (l/M)	KD (M)	χ^2
m5B3	$3,4 \times 10^4$	$9,2 \times 10^{-5}$	36,1	0-200 nM	$3,7 \times 10^8$	$2,7 \times 10^{-9}$	0,04
h5B3	$2,5 \times 10^4$	$3,3 \times 10^{-4}$	22,9	0-379 nM	$7,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^{-8}$	0,03
h5B3.1	$2,7 \times 10^4$	$1,7 \times 10^{-3}$	24,1	0-279 nM	$1,6 \times 10^7$	$6,2 \times 10^{-8}$	0,04

La tabla 1 muestra el análisis de cinética de unión de m5B3, h5B3 y h5B3.1 contra F soluble. Se realizó el análisis Biacore mediante A&G Precision Antibody™ (Columbia, MD) utilizando Biacore 3000. Se recubrieron CMS chips de grado certificado con anticuerpo de captura (Fe de IgG anti-ratón de cabra para mAb de ratón y Fe de IgG anti-humano de cabra

para mAb humanizado). Los mAb de prueba se capturaron en el chip y se midió la cinética de unión en 5 concentraciones sF diferentes (de 0 a saturación). Se midieron los parámetros de cinética de unión en cada concentración sF y se realizó el análisis χ^2 para evaluar la precisión de los datos.

Además, se demostró que h5B3 y hSB3.1-IgG1 inhibían NiV y HeV vivos con titulaciones similares en comparación con m5B3 (tabla 2).

Tabla 2: Neutralización de virus por m5B3, h5B3 y h5B3.1

mAb	Título ($\mu\text{g/ml}$) 200 TCID ₅₀		Título ($\mu\text{g/ml}$) 100 TCID ₅₀	
	NiV	HeV	NiV	HeV
m5B3	1,56	12,5	0,78	1,56
h5B3	3,125	12,5	1,56	0,78
h5B3.1	> 100	> 100	> 100	> 100

La tabla 2 muestra la neutralización de virus por m5B3, h5B3 y h5B3.1. Se diluyeron en serie mAb purificados por duplicado por dilución de duplicación partiendo de 100 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron con NiV o HeV por separado a 37 °C durante 30 min. Se utilizó la mezcla virus-mAb para infectar 2×10^4 células Vero por pocillo de una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos. Se observó el efecto citopático viral (cpe) 3 días después de la infección. El título se determinó como la mayor dilución en donde cpe viral todavía se inhibía completamente (ausente) en dos pocillos. El ensayo se realizó por separado

para comparar entre m5B3 y h5B3; y m5B3 y h5B3.1.

Caracterización de unión de 5B3 y mapeo del epítipo 5B3

Para determinar si la cadena pesada (H) y ligera (L) de 5B3 participan en la unión a F, quimeras de V_H y V_L de h5B3 y una
5 del clon de la biblioteca de ScFv humana (figura 3A) se construyeron como en la figura 18. Como se muestra en la figura 5, ninguna de las quimeras pudo unirse a FL F, lo que indica que H y L de 5B3 participan en la unión a F.

Después, para determinar la ubicación del epítipo 5B3 en F,
10 se generaron quimeras de NiV F y la proteína F de virus Cedar (CedPV), un henipavirus recientemente descubierto (Marsh, G. A. et al. 2012, *PLoS Pathog*, 8:e1002836) con las cuales 5B3 no reacciona. Solo la construcción que posee el dominio de cabeza globular de NiV F y el tallo helicoidal HRB, TM y CT
15 de CedPV F pudieron unirse a 5B3 (figura 6), lo que indica que el epítipo está ubicado en el dominio de cabeza globular. Las quimeras de cabeza y HRB también resultaron ser funcionales en un ensayo de fusión célula-célula.

Un mutante NiV F, L53D resultó ser defectuoso en la unión con
20 5B3. Basándose en la estructura cristalina resuelta de sF, los residuos que rodean L53 se mutaron a alanina para los residuos hidrofílicos y/o hidrofóbicos y/o serina para los residuos hidrofóbicos (tabla 3) de una construcción de WT F que tiene una etiqueta peptídica S de extremo C.

Tabla 3: compendio de la reactividad de los mutantes de F con 5B3 y 12B2.

	Residuo	Cambio por	Unión a mAb	
			5B3	12B2
5	N51	A	++	++
	L53	D	--	++
		S	--	++
	P52	A	++	++
	T54	A	++	++
10	K55	A	--	++
		E	--	++
	D56	A	--	--
	E166	A	++	++
	K167	A	++	++
	R244 y T245	A y S	++	++
	L246	A	++	++
		D	--	--
		S	+/-	+/-
	G247	A	++	++
15		S	++	++
	L246 y G247	D y A	--	--
	G247 y Y248	S y S	++	++
	Y248	A	++	++
		S	++	++
	Y248 y A249	D y A	--	++
	A249	D	+/-	++
		S	++	++
	T250	A	--	++
	E251	A	++	++
	Y281	A	++	++
	F282	A	+	++
		S	++	++
	P283	A	++	++
		S	+	+
	F282 y P283	A y A	--	--
	I284	S	++	++
	E251 y I284	A y S	--	++

20 La tabla 3 proporciona un compendio de las reactividades de los mutantes de F con 5B3 y 12B2, otro mAb neutralizante dependiente conformacional. Los residuos que rodean L53 como se muestra en la figura 7C se mutaron a alanina para los residuos hidrofílicos y/o serina para los residuos

hidrofóbicos. Se evaluaron los mutantes F simples y dobles en cuanto a su unión a 5B3 mediante precipitación del lisado celular que expresa F por separado con 5B3 y 12B2 por Sepharose de proteína G y agarosa de proteína S. Se
5 analizaron los productos precipitados en SDS PAGE, seguido de transferencia western. Se detectaron las bandas F utilizando anticuerpo de péptido anti S conjugado con HRP. ++: unión fuerte; +: menos unión; +/-: unión débil; --: sin unión.

Los mutantes de F se evaluaron en cuanto a su unión con 5B3
10 mediante precipitación de lisados celulares que expresan F con 5B3 y otro mAb neutralizante dependiente conformacional, 12B2 para determinar si el mutante F es intacto conformacional. Se precipitó una cantidad igual de lisado celular que expresa F con agarosa de proteína S para
15 monitorizar la expresión total. Un compendio del resultado se muestra en la tabla 3 y la transferencia western de mutantes seleccionados se muestra en la figura 7A. El experimento identificó varios mutantes de F simples (L53D/S, KSSA/E, T250A) y dos mutantes dobles (YA248-249AD y E1251-284AS) que
20 son defectuosos en la unión a 5B3, pero no tiene efecto sobre la unión a 12B2, lo que indica que la ubicación del epítipo 5B3 es al lado de la cabeza globular (figura 7). Aunque el mutante Y248A solo no afectó la unión a 5B3, cuando se combinó con el mutante A249D que es casi defectuoso (banda

débil cuando se precipitó por 5B3), el mutante doble fue completamente defectuoso en la unión de 5B3, lo que muestra que ambos residuos son importantes en el sitio de unión. De modo similar, los mutantes E251A y 12845 solo son defectuosos cuando se combinan. El mutante F282A mostró una disminución leve en la unión a 5B3, aunque resultó completamente defectuoso cuando se combinó con P283A, este mutante doble también es defectuoso en la unión de 12B2. Varios otros mutantes defectuosos 5B3 (D56A, L246D y LG246-247DA) también fueron defectuosos en la unión a 12B2 (figura 7A, tabla 3). Por lo tanto, estos mutantes juntos con aquellos que solo son defectuosos de 5B3 se evaluaron en un ensayo de fusión para evaluar su capacidad para promover la fusión celular. Como se mencionó arriba, el mutante L53D es menos eficaz para promover la fusión, la combinación de los mutantes L246D y G247A también mostró menos del 50 % de actividad de fusión en comparación con el tipo salvaje (WT), lo que indica que se vio afectada la función. Solo el mutante FP282-283AA fue completamente defectuoso en la fusión, lo que indica que este mutante doble no es intacto conformacional y funcional. Los mutantes D56A y L246D probablemente tienen un efecto indirecto sobre la unión a 12B2 que no afecta la función de F en la promoción de la fusión. Todos los otros mutantes evaluados conservan más del 80 % de la actividad de fusión,

excepto E1251-284AS que tiene menos del 40 % de actividad en comparación con WT, aunque mantiene su unión con 12B2 (figura 78). Los residuos E251 y 1284 probablemente participan en la función de la proteína F para promover la fusión y quizá la
5 mutación en estos residuos afecta la funcionalidad de la proteína, en lugar de la conformación, como se observa con el mutante L53D.

Tomados juntos, la ubicación del epítipo de 5B3 se encuentra al costado de la cabeza globular en una región que comprende
10 los residuos L53, KSS, Y248, A249, T250, E251, 1284, F282 y posiblemente los residuos D56 y L246 (figura 7C y D).

Mecanismo de inhibición de 5B3

El mecanismo de inhibición de 5B3 en la fusión de F también se investigó. Un ensayo de activación de sF *in vitro* se
15 desarrolló anteriormente (Chan, Y.P. et al. 2012, *J Viral.* 86: 11457-71) en donde sF se puede disparar por digestión de tripsina a su forma de $F_1 + F_2$ madura, seguido por tratamiento con calor que activa sF para replegarse a su conformación posfusión. Un péptido biotinilado con la secuencia de HRB de
20 F se puede añadir a $F_1 + F_2$ digerido por tripsina que se unirá a la forma intermedia del activador F durante el tratamiento con calor y la forma intermedia se puede precipitar mediante agarosa de avidina. Cuando 5B3 se añadió con el péptido FC2, el mAb puede competir con FC2 para unirse al activador sF de

forma dependiente de la dosis (figura 8A). El material no unido de este ensayo se precipitó con la proteína G y la figura 8B muestra que m5B3 y h5B3.1 todavía estaban unidos a sF. Como 5B3 solo se une a F pre-fusión, esto indica que cuando 5B3 estaba presente durante la activación, el mAb estabiliza y mantiene sF en su forma pre-fusión. Para investigar más esto, se realizó la activación con temperaturas crecientes variadas para proporcionar más energía para forzar la activación en presencia de 5B3. Como se muestra en la figura 8C, las temperaturas crecientes pudieron recuperar la precipitación de FC2 de la forma intermedia, lo que indica que la unión de 5B3 estabiliza F mediante la creación de una barrera de mayor energía para que se produzca la activación.

Los resultados mostraron que 5B3 se une al costado de la cabeza globular de F, lo que revela un epítipo novedoso que podría ser una región importante para estabilizar F. Uno de los residuos que se demuestra aquí que es importante para la unión de 5B3, L53 también se demostró que es un residuo importante para la formación de trímeros hexaméricos de F en la superficie del virus lo que es necesario para una fusión eficaz en donde la activación de F trimérico simple podría producir un efecto en cadena sobre el hexámero. La unión de 5B3 a F también puede interferir con este efecto de

activación de cadena haciendo que la fusión viral sea ineficaz.

Usos potenciales de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo contra la glicoproteína F

5 La aplicación inmediata de 5B3 es una herramienta para la investigación del Henipavirus. Por ejemplo, actualmente, no hay mAb disponibles para detectar y diferenciar F pre y posfusión. 5B3 reconoce un epítipo dependiente de la conformación y se puede utilizar para distinguir F pre y posfusión F. Estos ensayos son útiles para estudiar las características funcionales y estructurales de la glicoproteína después de la manipulación, como cambios conformacionales que se producen en F después de la unión al receptor G. La necesidad de material de detección y diagnóstico adicional para los Henipavirus ha surgido de epidemias de rutina que se producen a mayores distancias de los epicentros de enfermedad originales. Dado que los henipavirus presentan un tropismo de especies amplio de estos virus y el origen zoonótico de los virus a veces comprende animales domesticados en la transmisión a humanos, las técnicas de diagnóstico y detección deben ser sólidas y adecuadas para utilizar con muestras de muchas especies. La detección temprana de los henipavirus podría proporcionar un aviso previo suficiente para instalar medidas de control

capaces de reducir la morbilidad y mortalidad. El diagnóstico inicial de la enfermedad que surge de la infección con un Henipavirus depende de la enfermedad clínica y las características epidemiológicas. El diagnóstico se confirma
5 después mediante la identificación del virus en un laboratorio de referencia. 5B3 se podría utilizar para el desarrollo de una herramienta de diagnóstico/detección económica y rápida que sería de especificidad y sensibilidad suficientes para proporcionar una advertencia temprana de la
10 presencia de un Henipavirus.

Uno de los usos más prometedores de h5B3 y h5B3.1 es en el desarrollo de agentes terapéuticos adicionales para tratar la infección con Henipavirus. Estos mAb humanizados se pueden expresar, purificar a gran escala y utilizar como un agente
15 antiviral, sin el riesgo de las complicaciones por respuestas idiotípicas en el receptor. Los datos de virus SNT vivos indicaron que 5B3 es un inhibidor potente de la fusión mediada por F de NiV y HeV. El desarrollo de h5B3 y/o h5B3.1 como agentes terapéuticos en combinación con el mAb m102.4
20 anti G humano como una terapia de cóctel ayudaría a minimizar el desarrollo de la resistencia viral a la terapia mediante el abordaje simultáneo de epítomos independientes de las dos glicoproteínas.

Los Henipavirus son una de las enfermedades virales

emergentes más patogénicas y altamente fatales que se han reconocido. Se han realizado avances significativos en el estudio y el control de estos virus, pero actualmente hay estudios en curso. Se ha desarrollado un mAb de antiviral humanizado para dirigirse a la glicoproteína F de Henipavirus que tiene amplia aplicación en la investigación, así como en la aplicación clínica. Como se observa, 5B3 se dirige a un epítipo específico prefusión dependiente de la conformación. El mapeo de la región de unión a 5B3 revela un epítipo novedoso que es importante para la estabilización de F. El h5B3.1 humanizado mantuvo todas las actividades de unión con F, así como el título de neutralización de virus en comparación con m5B3. El sistema de expresión optimizado de IgG1 de h5B3.1 desarrollado en la presente proporciona una producción sencilla, rápida y de alto rendimiento del mAb humanizado. Se requiere un mayor desarrollo de h5B3.1 y se está realizando, por ejemplo, mutagénesis en las regiones CDR para mejorar su afinidad de unión con F, así como evaluar su potencia para proteger la enfermedad en modelos de animales, pero los beneficios potenciales y los usos comerciales son claramente evidentes.