

**ANTICUERPOS MULTIESPECÍFICOS QUE SE UNEN ESPECÍFICAMENTE A LOS
EPÍTOPOS DEL VIRUS DEL ZIKA Y USOS DE LOS MISMOS**

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a anticuerpos multiespecíficos, y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen específicamente a epítomos distintos del virus del Zika (ZIKV, por sus siglas en inglés). Dichos anticuerpos neutralizan potentemente la infección del virus del Zika (ZIKV) y minimizan o eliminan la generación de mutantes de escape del virus del Zika. La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos y
10 fragmentos de anticuerpos. Además, la invención se refiere al uso de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención en la prevención y el tratamiento de la infección por el ZIKV.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El virus del Zika (ZIKV), un flavivirus transmitido por mosquitos, es una emergencia de salud
15 pública. El ZIKV se aisló por primera vez de los macacos en 1947 en el bosque de Zika en Uganda (G. W. A. Dick, S. F. Kitchen, A. J. Haddow, Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 46, 509-520 (1952)) y la primera infección humana se reportó en Nigeria en 1954 F. N. Macnamara, Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 48, 139-145
20 (1954)). Desde entonces, las infecciones por el ZIKV se informaron esporádicamente en África y el sudeste asiático (D. Musso, Van Mai Cao-Lormeau, D. J. Gubler, Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *The Lancet.* 386, 243-244 (2015)) pero se notificaron epidemias en Micronesia en 2007 (M. R. Duffy *et al.*, Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 360, 2536-2543 (2009)) y en la Polinesia
25 Francesa en 2013-14, con la propagación posterior del virus a otros países del continente oceánico (V.-M. Cao-Lormeau, D. Musso, Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet.* 384, 1571 -1572 (2014); D. Musso, E. J. Nilles, V.-M. Cao-Lormeau, Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O595-6 (2014)). Después de su introducción en Brasil en 2015, el ZIKV se ha extendido rápidamente y en febrero de 2016 la
30 Organización Mundial de la Salud (OMS) lo declaró una emergencia de salud pública de preocupación internacional (L. R. Baden, L. R. Petersen, D. J. Jamieson, A. M. Powers, M. A. Honein, Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* 374, 1552-1563 (2016); A. S. Fauci, D. M. Morens, Zika Virus in the Americas - Yet Another Arbovirus Threat. *N Engl J Med*, 160113142101009 (2016); D. L. Heymann *et al.*, Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC?
35 *Lancet.* 387, 719-721 (2016)). La ruta principal de la infección por el ZIKV es a través de las picaduras de mosquitos *Aedes*, pero el virus también puede ser sexual (D. Musso *et al.*, Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis.* 21, 359-361 (2015)) y transmitido

verticalmente (J. Mlakar *et al.*, Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med.* 374, 951-958 (2016)). Si bien la mayoría de las infecciones por el ZIKV son asintomáticas o sólo causan síntomas leves, existe evidencia de que la infección por el ZIKV puede conducir a complicaciones neurológicas, tal como el síndrome de Guillain-Barré en adultos (V.-M. Cao-Lormeau *et al.*, Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet.* 0 (2016), doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6) y defectos congénitos congénitos, incluida la microcefalia en el feto en desarrollo (G. Calvet, R. S. Aguiar, A. Melo, S. A. Sampaio, Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* (2016), doi:10.1016/s1473-3099(16)00095-5; J. Mlakar *et al.*, Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med.* 374, 951-958 (2016); E. J. Rubin, M. F. Greene, L. R. Baden, Zika Virus and Microcephaly. *N Engl J Med* (2016), doi:10.1056/NEJMe1601862), probablemente por su capacidad de infectar células progenitoras neurales humanas ((H. Tang *et al.*, Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Stem Cell*, 1-5 (2016)).

El ZIKV pertenece al género flavivirus, que también incluye el virus del Nilo Occidental, el virus del dengue, el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, el virus de la fiebre amarilla y varios otros virus que pueden causar encefalitis. Los flavivirus están envueltos, con geometrías icosaédricas y esféricas. El diámetro es de alrededor de 50 nm. Los genomas son ARN de sentido positivo lineal y no segmentados, de alrededor de 10-11 kb de longitud. El genoma de los flavivirus codifica 3 proteínas estructurales (Capsid, prM y Envoltura) y 8 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 y NS5B).

Aunque las proteínas de envoltura (E) del flavivirus median la fusión y son el objetivo principal de los anticuerpos neutralizantes, la proteína no estructural 1 (NS1) es secretada por las células infectadas y está involucrada en la evasión inmunitaria y la patogénesis (D. A. Muller, P. R. Young, The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* 98, 192-208 (2013)). Dos estudios estructurales recientes mostraron un alto nivel de similitud estructural entre la proteína E del ZIKV y la de otros flavivirus, tales como el virus del dengue (DENV, por sus siglas en inglés), el virus de la fiebre amarilla (YFV, por sus siglas en inglés) y el virus del Nilo Occidental (WNV, por sus siglas en inglés), pero también revelaron características únicas que pueden estar relacionadas con el neurotropismo del ZIKV (L. Dai *et al.*, Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host Microbe* (2016), doi:10.1016/j.chom.2016.04.013; D. Sirohi *et al.*, The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, aaf5316 (2016)). De manera similar, el análisis estructural de la NS1 del ZIKV reveló características conservadas con la NS1 de otros flavivirus, aunque con características electrostáticas diferentes (J. Kim *et al.*, Zika virus NS1

structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses, 1-6 (2016)).

Un fenómeno que es característico de ciertos flavivirus es la actividad potenciadora de la enfermedad de los anticuerpos de reacción cruzada provocada por una infección previa por virus heterólogos. En el caso del virus del dengue (DENV), para el cual se conocen 4 serotipos, existe evidencia epidemiológica de que una infección primaria protege contra la reinfeción con el mismo serotipo, pero representa un factor de riesgo para el desarrollo de una enfermedad grave tras la reinfeción con un serotipo diferente (S. B. Halstead, Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiol Spectr.* 2, 249-271 (2014)). La enfermedad exacerbada se desencadena por los anticuerpos específicos E y prM que no pueden neutralizar el virus entrante, sino que mejoran su captura por las células que expresan el receptor Fc (FcR⁺), lo que conduce a una replicación viral y una activación de células T de memoria de reacción cruzada mejoradas. Se cree que la tormenta de citoquinas resultante es la base de la forma más grave de la enfermedad conocida como el Síndrome de Fiebre Hemorrágica por Dengue/Síndrome de Choque por Dengue (S. B. Halstead, Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 60, 421-467 (2003); G. Screaton, J. Mongkolsapaya, S. Yacoub, C. Roberts, New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat Rev Immunol.* 15, 745-759 (2015)). El papel de los anticuerpos en el dengue severo está respaldado por estudios que demuestran que los niveles menguantes de anticuerpos maternos en los lactantes representan un mayor riesgo de desarrollar enfermedad de dengue grave (S. B. Halstead, Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 60, 421 -467 (2003); S. B. Halstead *et al.*, Dengue hemorrhagic fever in infants: research opportunities ignored. *Emerging Infect Dis.* 8, 1474- 1479 (2002); T. H. Nguyen *et al.*, Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis.* 189, 221 -232 (2004); A. L. Rothman, Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest.* 113, 946-951 (2004)).

Recientemente, se demostró que la mayoría de los anticuerpos que reaccionaron a la proteína de envoltura del DENV también se unieron al ZIKV, pero aquellos que reconocen el epítipo principal de bucle de fusión lineal (FLE) no neutralizaron el ZIKV y en su lugar promovieron la mejora dependiente de anticuerpos (ADE) de la infección por el ZIKV (Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, Sakuntabhai A, Cao-Lormeau VM, Malasit P, Rey FA, Mongkolsapaya J, Screaton GR: Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol.* 23 Jun 2016. doi:10.1038/ni.3515.[Epub antes de imprimir]).

Además, los organismos con altas tasas de mutaciones, como varios virus, por ejemplo, el virus del Zika, a menudo confían en el llamado “escape mutacional” como un mecanismo para evitar la destrucción por las células hospederas. Es decir, un virus puede

defenderse de las respuestas inmunitarias del hospedero al hacer mutaciones en su genotipo y fenotipo (denominadas “mutaciones de escape”). En consecuencia, la generación de mutantes de escape (es decir, virus portadores de mutaciones de escape) puede reducir la eficacia de los medicamentos de anticuerpos.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En vista de lo anterior, es un objetivo de la presente invención proporcionar anticuerpos multiespecíficos, que neutralicen potentemente el virus del Zika (ZIKV). Dichos anticuerpos preferiblemente no contribuyen a la mejora dependiente de anticuerpos (ADE) de la infección por el virus del Zika. También es un objetivo de la presente invención proporcionar anticuerpos
10 anti-ZIKV altamente específicos que eliminan o minimicen la generación de mutantes de escape del ZIKV.

El objetivo subyacente a la presente invención se resuelve mediante la materia objeto reivindicada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 La FIGURA 1 muestra la reactividad (ELISA) y la actividad neutralizante de los ZIKV y DENV1 de anticuerpos derivados de cuatro donantes inmunitarios del ZIKV (ZKA, ZKB, ZKC y ZKD) a la proteína E de los ZIKV y DENV1-4 y al dominio del EDIII de la proteína E del ZIKV; NNB: anticuerpos neutralizantes que no se unen a la proteína E.

La FIGURA 2 muestra la unión de los anticuerpos ZKA190, ZKA78 y ZKA64 a los ZIKV
20 y DENV1 E y a las proteínas del EDIII del ZIKV medidas por ELISA.

La FIGURA 3 muestra la unión de los anticuerpos ZKA185 y ZKA190 a los ZIKVE, DENV1 VLP y a las proteínas del EDIII del ZIKV como se mide por ELISA.

La FIGURA 4 muestra para el Ejemplo 3 la actividad neutralizante de los anticuerpos ZKA190, ZKA64, ZKA64-LALA, ZKA230 y ZKA78 contra el ZIKV (cepa H/PF/2013) y el
25 DENV1 en células Vero, medida por citometría de flujo (% de células infectadas).

La FIGURA 5 muestra para el Ejemplo 3 la actividad neutralizante de los anticuerpos ZKA190, ZKA64, ZKA185, ZKA230 y ZKA78 contra el ZIKV (cepa H/PF/2013) en células Vero, medido con una lectura de viabilidad celular (wst-1, Roche).

La FIGURA 6 muestra para el Ejemplo 4 la actividad potenciadora de la infección
30 (ADE, potenciación dependiente de anticuerpos) de los anticuerpos ZKA190, ZKA64, ZKA64-LALA, ZKA185, ZKA230 y ZKA78 para el ZIKV (cepa H/PF/2013) en células K562 no permisivas medida por citometría de flujo (% de células infectadas).

La FIGURA 7 muestra para el Ejemplo 4 que cuatro plasma inmune al ZIKV y un plasma inmune al DENV mostraron una capacidad similar para mejorar la infección por el
35 ZIKV de las células K562 (panel superior). Este efecto de ADE fue completamente bloqueado en los cinco plasma inmunitarios por el anticuerpo ZKA64-LALA específico del EDIII (panel inferior).

La FIGURA 8 muestra la alineación de aminoácidos de la región del EDIII de 39 cepas del ZIKV del linaje asiático desde 2013 (incluida la cepa prototípica MR766 del linaje africano aislada en 1947).

La FIGURA 9 muestra para el Ejemplo 3 la actividad neutralizante de los anticuerpos ZKA190 y ZKA190-LALA contra tres cepas del ZIKV (H/PF/2013, MR766 y MRS_OPY_Martinique_PaRi_2015) en células Vero medida por citometría de flujo (% de infectados células).

Las FIGURAS 10A-10C muestran para el Ejemplo 5 la neutralización de los mAbs ZKA190 y C8 probados contra un panel de cuatro cepas del ZIKV, según lo determinado por el porcentaje de células Vero infectadas en presencia de cantidades crecientes de los mAbs (FIGURA 10A). También se muestran los valores (FIGURA 10B) y las estadísticas (FIGURA 10C) de IC50. Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes.

Las FIGURAS 11A-11E muestran para el Ejemplo 6 la neutralización y mejora de la infección por el ZIKV por el anticuerpo ZKA190. (FIGURA 11A) Neutralización de la infección por la cepa ZIKV PRVABC59 de hNPC por ZKA190, ZKA190-LALA y un mAb de control según lo determinado por el ensayo de placa en células Vero (panel izquierdo) y la inmunofluorescencia indirecta de hNPC infectados usando anticuerpo anti-E etiquetado con fluoróforo (panel derecho). (FIGURA 11B) La ADE de la infección por el ZIKV de células K562 no permisivas por ZKA190 y ZKA190-LALA. (FIGURA 11C) La ADE inducida en células K562 cuando el ZIKV se incubaba previamente con diluciones en serie de suero plasmático de diferentes pacientes con el ZIKV positivo (panel izquierdo). Cuando se agrega ZKA190-LALA a los complejos de suero ZIKV, se inhibe ADE (panel derecho). (FIGURA 11D) La ADE inducida en células K562 cuando el ZIKV se incubaba previamente con diluciones en serie de un mAb con reactividad cruzada prM (DV62) derivado de un donante inmunitario DENV. ZKA190-LALA inhibe la ADE del ZIKV cuando forma un complejo con el anticuerpo DV62 reactivo a DV62. (FIGURA 11E) Efecto sobre la ADE inducido por la dilución de aumento de pico de un plasma DENV2 (panel izquierdo) o mAb DV62 anti-prM (panel derecho) mediante diluciones en serie de mAbs indicados.

Las FIGURAS 12A-12E muestran para el Ejemplo 7 la identificación del epítipo ZKA190 y el análisis de su conservación en cepas del ZIKV. (FIGURA 12A) Superposición del espectro [^{15}N , ^1H]-HSQC del EDIII del ZIKV etiquetado con ^{15}N en ausencia (negro) o presencia (rojo) sin etiqueta ZKA190 Fab. Las diferencias identifican los residuos del EDIII afectados por la unión de anticuerpos. (FIGURA 12B) Mapeo de epítipo de RMN de ZKA190 Fab en complejo con el EDIII del ZIKV. La perturbación de desplazamiento químico (CSP, eje y) se traza contra el número de residuo del EDIII. Los residuos afectados por la unión de anticuerpos están en rojo. (FIGURA 12C) Los residuos en el bucle FG identificados por el mapeo del epítipo de RMN están parcialmente ocultos en la proteína E mol A pero en gran

parte expuestos en los moles B y C. El EDIII de la proteína E se coloreó en azul. Los residuos identificados por el mapeo de epítomos de RMN están coloreados en magenta, excepto aquellos en el bucle FG que están coloreados en verde. Las proteínas E adyacentes se muestran como superficie gris. (FIGURA 12D) Nivel de conservación de residuos de aminoácidos en el epítopo ZKA190 calculado mediante el análisis de secuencias de 217 cepas del ZIKV encontradas en las bases de datos del ZIKV Resources (NCBI) a partir del 24 de noviembre de 2016. (FIGURA 12E) Representación de libro abierto que muestra la complementariedad de carga entre el epítopo y el parátipo del resultado de acoplamiento. Los límites del epítopo y el parátipo están rodeados de verde. Los bordes entre las cadenas pesadas y ligeras de Fab y su huella correspondiente en el EDIII se muestran como líneas discontinuas amarillas.

Las FIGURAS 13A-13C muestran para el Ejemplo 7 el epítopo ZKA190 identificado por RMN y acoplamiento. (FIGURA 13A) Representación de dibujos de las 12 estructuras de RMN de energía más baja del EDIII del ZIKV, con residuos afectados por la unión de ZKA190 en rojo. La flexibilidad en el extremo N del constructo es evidente. (FIGURA 13B) Modelo del complejo ZKA190:EDIII derivado por acoplamiento computacional y simulación molecular validado por resultados de RMN. El epítopo identificado por RMN en el EDIII (gris) está en rojo. La cadena pesada y ligera ZKA190 está coloreada en verde oscuro y verde claro, respectivamente. Los residuos del EDIII que afectan o no la unión del anticuerpo cuando mutan se muestran como barras de color naranja y azul, respectivamente. (FIGURA 13C) El epítopo ZKA190 identificado por RMN (rojo) es accesible en la superficie del virus (blanco).

La FIGURA 14 muestra para los Ejemplos 7 y 10 la unión de tn o el EDIII mutado a ZKA190 IgG. Se muestran los datos de SPR y la cinética de unión. Los mutantes del EDIII que afectan (resaltados en rojo) o no afectan la unión se muestran como se indica en la FIGURA.

La FIGURA 15 muestra para el Ejemplo 8 los resultados de los experimentos de microscopía confocal. El ZIKV incubado con una concentración superior a 10'000 veces el valor IC50 de Fab ZKA190 o IgG completa se añadieron a las células Vero. El complejo ZIV:anticuerpo se detecta dentro de las células (verde) y se localiza junto con los endosomas (superposición roja, amarilla). Los endosomas y los orgánulos ácidos están etiquetados con rojo Lysotracker; ZKA190 conjugado Alexa-488 está en verde. Los núcleos se tiñen con DAPI (azul).

Las FIGURAS 16A-16B muestran para el Ejemplo 9 la eficacia profiláctica y terapéutica de ZKA190. (FIGURA 16A) ZKA190 es fuertemente protector contra la infección por el ZIKV cuando se administra profilácticamente a ratones (A129 en (FIGURA 16A) y AG129 en (FIGURA 16B)) desafiados con una dosis letal de la cepa del ZIKV MP17451. Los experimentos utilizaron N = 4-8 ratones por grupo. Se muestran las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (FIGURA 16A). La importancia se determinó mediante el uso de la prueba

logrank de Mantel-Cox. Panel A, arriba a la izquierda: ZKA190 a 5.1 y 0.2 mg/kg versus Ctr mAb, $P = 0.0031$; ZKA190 a 0.04 mg/kg versus Ctr mAb, $P = 0.0116$; ZKA190-LALA a 5.1, 0.2 y 0.04 mg/kg versus Ctr mAb, $P = 0.0031$. El panel A, arriba a la derecha: puntuación de morbilidad de ratones vigilados durante un período de 14-15 días (se utilizaron dos métodos de puntuación diferentes; ver (Dowall, S.D., Graham, V.A., Rayner, E., Atkinson, B., Hall, G., Watson, R.J., Bosworth, A., Bonney, L.C., Kitchen, S., and Hewson, R. (2016). A Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0004658-13). El panel A, paneles inferiores: peso corporal de ratones. Los paneles B: ZKA190 o ZKA190-LALA se administraron a 15 mg/kg en diferentes puntos de tiempo después de la infección por el ZIKV.

El panel B, arriba a la izquierda: se muestra una curva de supervivencia de Kaplan-Meier. Los experimentos utilizaron $N = 5$ ratones por grupo. La importancia se determinó mediante el uso de la prueba logrank de Mantel-Cox. ZKA190 y ZKA190-LALA administrados el día 1, 2, 3 o 4 versus Ctr., $P = 0.0016$. El panel B, arriba a la derecha: puntuación de morbilidad de ratones vigilados durante 14 días según (Dowall et al., 2016). Los ratones fueron vigilados durante un período de 14 días para la pérdida de peso corporal (Panel B, paneles inferiores). El anticuerpo de control es MPE8 específico para la proteína RSVF (Corti, D., et al. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature* 501, 439-443 (2013))

Las FIGURAS 17A-17D muestran para el Ejemplo 9 la eficacia profiláctica del mAb ZKA190 anti-ZIKV específico del EDIII contra las cepas del ZIKV MP1741. (FIGURA 17A) Se muestra la viremia medida como UFP/ml el día 5 en sangre de todos los animales. (FIGURA 17B) La carga viral se midió como copias genómicas/ml por qPCR el día 5 en sangre de todos los animales y en sangre y tejidos indicados cuando los animales se sacrificaron al final del estudio o cuando se cumplieron los puntos finales humanos. (FIGURA 17C) Los ratones se vigilaron durante un período de 14 días para determinar la pérdida de peso corporal. (FIGURA 17D) La concentración de IgG en suero humano en muestras de sangre del día 5. La importancia se determinó en comparación con el tratamiento con anticuerpos de control mediante la prueba U no paramétrica de Mann-Whitney. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$.

Las FIGURAS 18A-18C muestran para el Ejemplo 9 la eficacia terapéutica del mAb ZKA190 anti-ZIKV específico del EDIII. (FIGURA 18A) Las cargas virales se midieron como UFP en el día 5 en sangre de todos los animales. (FIGURA 18B) Las cargas virales se midieron como copias genómicas mediante qPCR el día 5 en sangre de todos los animales y en sangre y tejidos indicados cuando los animales se sacrificaron al final del estudio o cuando se cumplieron los puntos finales humanos. La importancia se determinó en comparación con el tratamiento con anticuerpos de control mediante la prueba U no paramétrica de Mann-Whitney. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$. (FIGURA 18C) Concentración de IgG en suero humano en muestras de sangre del día 5.

Las FIGURAS 19A-19K muestran para el Ejemplo 11 y 12 la ingeniería de ZKA190 en el FIT-1 mAb biespecífico y su caracterización *in vitro*. (FIGURA 19A) Los mAbs ZKA185 y ZKA230 se probaron para neutralizar cuatro cepas del ZIKV, según lo determinado por el porcentaje de células Vero infectadas en presencia de cantidades crecientes de mAbs. Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes. (FIGURA 19B) Unión de ZKA185 y ZKA230 IgG y Fab al ZIKV VLP recombinante, y antígenos EDIII y E evaluados por ELISA. (FIGURA 19C) ZKA190, ZKA185 y ZKA230 se probaron para neutralizar H/PF/2013 (tn) y MARMs 1-4. (FIGURA 19D) Representación de superficie de dos dímeros de la proteína E unidos por ZKA190 (verde); el epítipo derivado de ZKA190 NMR está en rojo; las posiciones mutadas en MARM se indican en amarillo bajo (E370), azul (T335), naranja (D67) y magenta (K84). (FIGURA 19E) Modelo de FIT-1. Los enlazadores naturales entre Fabs internos y externos permiten un movimiento flexible de Fabs en el anticuerpo FIT-1. Las regiones variables de ZKA185 y ZKA190 se resaltan en azul y verde, respectivamente. (FIGURA 19F) Unión de FIT-1 IgG y Fab a los antígenos recombinantes ZIKV VLP, E y DIM según lo evaluado por ELISA. (FIGURA 19G) ZKA190, ZKA185 y mAb FIT-1 se probaron para neutralizar cuatro cepas (valores IC₅₀, G) y cuatro MARM (H) del ZIKV. (FIGURA 19I) Neutralización de la cepa ZIKV H/PF/2013 por ZKA185, ZKA230 y FIT-1 IgG y Fab determinados como en (FIGURA 19A). (FIGURA 19J) Experimentos de microscopía confocal como se muestra en la FIGURA 3G. (FIGURA 19K) Efecto sobre ADE inducido por dilución potenciadora de pico de mAb DV62 anti-prM o plasma de DENV2 por diluciones en serie de FIT-1 IgG y Fab.

Las FIGURAS 20A-20E muestran la eficacia terapéutica de FIT-1. FIT-1 es muy eficaz contra la infección por el ZIKV cuando se administra terapéuticamente en diferentes puntos de tiempo a ratones (A129) desafiados con una dosis letal de la cepa ZIKV MP17451. Los experimentos utilizaron N = 5-6 ratones por grupo. (FIGURA 20A) Se muestran las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. La importancia se determinó mediante el uso de la prueba logrank de Mantel-Cox. FIT-1 a 15, 5 y 1 mg/kg administrados en el día 1, 2 versus Ctr mAb, P = 0.0012; ZKA190 a 15 y 5 mg/kg administrados en el día 3 versus Ctr mAb, P = 0.0012; ZKA190 a 1 mg/kg administrado el día 3 versus Ctr mAb, P = 0.0170. (FIGURA 20B) Puntuación de morbilidad de ratones vigilados durante un período de 21 días (Dowall et al., 2016). (FIGURA 20C) Las cargas virales se midieron como UFP en el día 5 en sangre de todos los animales. (FIGURA 20D) Los ratones fueron vigilados durante un período de 21 días para la pérdida de peso corporal. El mAb de control en el panel A es mAb MPE8 (específico para la proteína F del RSV (Corti, D., et al. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. Nature 501, 439-443 (2013)). (FIGURA 20E) Las cargas virales se midieron como copias genómicas mediante qPCR en el día 5 en sangre de todos los animales y en sangre y tejidos indicados cuando los animales se culminaron al final del

estudio o cuando se cumplieron los puntos finales humanos. Se determinó la importancia en comparación con el tratamiento con anticuerpos de control mediante la prueba U no paramétrica de Mann-Whitney. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

La FIGURA 21 muestra para el Ejemplo 14 que los ratones AG129 hembras tratados con FIT-1 después del desafío con el ZIKV de Malasia estaban protegidos de la mortalidad en comparación con los ratones tratados con placebo.

La FIGURA 22 muestra para el Ejemplo 14 restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) en cachorros nacidos de hembras tratadas con FIT-1 y desafiadas con el ZIKV.

La FIGURA 23 muestra para el Ejemplo 14 el peso promedio de las crías en la fecha de nacimiento de las hembras tratadas con FIT-1 e infectadas con el ZIKV.

La FIGURA 24 muestra para el Ejemplo 14 el peso de la placenta recolectada 11 dpi de hembras tratadas con FIT-1.

Las FIGURAS 25A-25D muestran para el Ejemplo 14 la cuantificación de ARN viral en (FIGURA 25A) feto, (FIGURA 25B) placenta, (FIGURA 25C) bazo materno y (FIGURA 25D) cerebro materno (** $P < 0.001$, * $P < 0.01$, en comparación con el tratamiento con MPE8).

La FIGURA 26 muestra para el Ejemplo 15 la supervivencia de ratones AG129 machos infectados con el ZIKV y tratados con FIT-124 o 72 horas después de la exposición al virus (* $P < 0.05$, en comparación con el tratamiento de control negativo MPE8).

La FIGURA 27 muestra para el Ejemplo 15 el porcentaje de cambio de peso medio de ratones AG129 tratados con FIT-1 en diversos momentos después de la exposición con el ZIKV.

Las FIGURAS 28A-28B muestran para el Ejemplo 15 la puntuación de enfermedad de (FIGURA 28A) testículo o (FIGURA 28B) epidídimo de ratones AG129 machos tratados con FIT-124 o 72 horas después de la exposición con el ZIKV. El tratamiento con resultados reactivos de Ab reduce la enfermedad del testículo y el epidídimo.

La FIGURA 29 muestra para el Ejemplo 16 la carga viral en suero de los 3 grupos analizados. La línea horizontal indica el LLOQ de 860 GC/mL.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Aunque la presente invención se describe en detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente, ya que pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada sólo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica.

A continuación, se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con modalidades específicas, sin embargo, debe entenderse que

pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear modalidades adicionales. Los ejemplos y las modalidades preferidas descritas de diversas maneras no deben interpretarse para limitar la presente invención a sólo las modalidades descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción justifica y abarca modalidades que combinan las modalidades descritas explícitamente con cualquier número de los elementos descritos y/o preferidos. Además, cualesquier permutaciones y combinaciones de todos los elementos descritos en esta solicitud deben considerarse revelados por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique lo contrario.

A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que el término “comprende” y variaciones tales como “comprende” y “que comprende” implican la inclusión de un miembro, número entero o etapa establecida, pero no la exclusión de cualquier otro miembro, entero o etapa no especificada. El término “consiste de” es una modalidad particular del término “comprende”, en donde se excluye cualquier otro miembro, número entero o etapa no establecida. En el contexto de la presente invención, el término “comprende” abarca el término “consiste de”. El término “que comprende” abarca así “que incluye” así como “que consiste”, por ejemplo, una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

Los términos “un”, “una/uno” y “el/la” y una referencia similar utilizada en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. La recitación de intervalos de valores en la presente solo pretende servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente, cada valor individual se incorpora a la especificación como si se mencionara individualmente en la presente. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como indicativo de ningún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente”, por ejemplo, una composición que está “sustancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra “sustancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

El término “alrededor de” en relación con un valor numérico x significa $x \pm 10\%$.

El término “enfermedad” como se usa en la presente pretende ser generalmente sinónimo, y se usa indistintamente con los términos “trastorno” y “afección” (como en una afección médica), ya que todos reflejan una condición anormal del cuerpo humano o animal o de una de sus partes que deteriora el funcionamiento normal, generalmente se manifiesta al

distinguir signos y síntomas, y hace que el ser humano o animal tenga una duración o calidad de vida reducida.

Como se usa en la presente, la referencia al “tratamiento” de un sujeto o paciente pretende incluir prevención, profilaxis, atenuación, aminoración y terapia. Los términos “sujeto” o “paciente” se usan indistintamente en la presente para referirse a todos los mamíferos, incluidos los humanos. Ejemplos de sujetos incluyen humanos, vacas, perros, gatos, caballos, cabras, ovejas, cerdos y conejos. En una modalidad, el paciente es un humano.

Como se usa en la presente, los términos “fragmento de unión al antígeno”, “fragmento” y “fragmento de anticuerpo” se usan indistintamente para referirse a cualquier fragmento de un anticuerpo de la invención que retiene la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo de cadena sencilla, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv. Además, el término “anticuerpo” como se usa en la presente incluye tanto anticuerpos como fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

Como se usa en la presente, el término “anticuerpo” abarca diversas formas de anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos, en particular fragmentos de unión al antígeno, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos recombinantes y anticuerpos genéticamente modificados (variante o anticuerpos mutantes) siempre que se conserven las propiedades características de acuerdo con la invención. Se prefieren los anticuerpos monoclonales y se prefieren especialmente los anticuerpos monoclonales con CDR humanas o regiones variables humanas. En particular, los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, de acuerdo con la presente invención se derivan preferiblemente de anticuerpos humanos (es decir, comprenden CDR y/o regiones variables de anticuerpos humanos). Más preferiblemente, los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, de acuerdo con la presente invención, también comprenden regiones constantes de anticuerpos humanos. Aún más preferiblemente, todas las regiones constantes y variables de los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, de acuerdo con la presente invención son de origen humano, es decir, regiones variables humanas y constantes humanas, tales como regiones constantes y variables de un anticuerpo humano.

Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M. A., and van de Winkel, J. C, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en tales ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos

humanos tras la exposición al antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90 (1993) 2551 -2555; Jakobovits, A., et al., *Nature* 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., *Year Immunol.* 7 (1993) 3340). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en bibliotecas de exhibición de fagos (Hoogenboom, H. R. y Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381 -388; Marks, J. D., et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581 - 597). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner, P., et al., *J. Immunol* 147 (1991) 86-95). Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales humanos se preparan usando la inmortalización de células EBV-B mejorada como se describe en

Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. (2004): An Método eficiente para producir anticuerpos monoclonales humanos a partir de células B de memoria: neutralización potente del coronavirus del SARS. *Nat Med.* 10(8):871 -5. Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. (2004): An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med.* 10(8):871-5. El término “anticuerpo humano” como se usa en la presente también comprende tales anticuerpos que se modifican, por ejemplo, en una región variable o en una región constante, para generar las propiedades de acuerdo con la invención como se describe en la presente.

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

El anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, puede ser un anticuerpo purificado o un anticuerpo de cadena sencilla, tal como un fragmento Fv de cadena sencilla biespecífico (scFv).

La invención también proporciona fragmentos de los anticuerpos de la invención, particularmente fragmentos que retienen la actividad de unión al antígeno de los anticuerpos. Aunque la especificación, incluidas las reivindicaciones, puede, en algunos lugares, referirse explícitamente a fragmentos de unión al antígeno, fragmentos de anticuerpo, variante(s) y/o derivado(s) de anticuerpos, se entiende que el término “anticuerpo” o “anticuerpo de la invención” incluye todas las categorías de anticuerpos, a saber, fragmento(s) de unión al antígeno, fragmento(s) de anticuerpo, variante(s) y derivado(s) de anticuerpos. Los fragmentos de los anticuerpos de la invención pueden obtenerse a partir de los anticuerpos mediante métodos que incluyen la digestión con enzimas, tales como pepsina o papaína, y/o mediante la escisión de enlaces disulfuro mediante reducción química. Alternativamente, los fragmentos

de los anticuerpos se pueden obtener por clonación y expresión de parte de las secuencias de las cadenas pesadas o ligeras. Por ejemplo, la invención incluye un scFv biespecífico que comprende las CDR de un anticuerpo de la invención. Los fragmentos de anticuerpos de la invención pueden impartir interacciones monovalentes o multivalentes y estar contenidos en una variedad de estructuras. Por ejemplo, las moléculas scFv pueden sintetizarse para crear un “triacuerpo” trivalente o un “tetracuerpo” tetravalente”. Las moléculas scFv pueden incluir un dominio de la región Fc que resulta en minicuerpos bivalentes.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden proporcionarse en forma purificada. Típicamente, el anticuerpo estará presente en una composición que está sustancialmente libre de otros polipéptidos, por ejemplo, donde menos del 90% (en peso), usualmente menos del 60% y más usualmente menos del 50% de la composición está compuesta de otros polipéptidos

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden ser inmunogénicos en humanos y/o en hospederos no humanos (o heterólogos), por ejemplo, en ratones. Por ejemplo, los anticuerpos pueden tener un idiótipo que es inmunogénico en hospederos no humanos, pero no en un hospedero humano. Los anticuerpos de la invención para uso humano incluyen aquellos que no pueden aislarse fácilmente de hospederos tales como ratones, cabras, conejos, ratas, mamíferos no primates, etc. y generalmente no pueden obtenerse por humanización o de ratones xeno.

Como se usa en la presente, un “anticuerpo neutralizante” es uno que puede neutralizar, es decir, prevenir, inhibir, reducir, impedir o interferir con la capacidad de un patógeno para iniciar y/o perpetuar una infección en un hospedero. Los términos “anticuerpo neutralizante” y “un anticuerpo que neutraliza” o “anticuerpos que neutralizan” se usan indistintamente en la presente. Estos anticuerpos se pueden usar solos, o en combinación, como agentes profilácticos o terapéuticos con la formulación apropiada, en asociación con la vacunación activa, como una herramienta de diagnóstico o como una herramienta de producción como se describe en la presente.

Las dosis a menudo se expresan en relación con el peso corporal. Por lo tanto, una dosis que se expresa como [g, mg u otra unidad]/kg (o g, mg, etc.) generalmente se refiere a [g, mg u otra unidad] “por kg (o g, mg, etc.) peso corporal”, incluso si el término “peso corporal” no se menciona explícitamente.

El término “unión específica” y una referencia similar no abarca la adhesión no específica.

El término “vacuna” como se usa en la presente se entiende típicamente como un material profiláctico o terapéutico que proporciona al menos un antígeno, preferiblemente un inmunógeno. El antígeno o inmunógeno puede derivarse de cualquier material que sea adecuado para la vacunación. Por ejemplo, el antígeno o inmunógeno puede derivarse de un

patógeno, tal como de bacterias o partículas de virus, etc., o de un tumor o tejido canceroso. El antígeno o inmunógeno estimula el sistema inmunitario adaptativo del cuerpo para proporcionar una respuesta inmunitaria adaptativa. En particular, un “antígeno” o un “inmunógeno” se refiere típicamente a una sustancia que puede ser reconocida por el sistema inmunitario, preferiblemente por el sistema inmunitario adaptativo, y que es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria específica de antígeno, por ejemplo, mediante la formación de anticuerpos y/o células T específicas de antígeno como parte de una respuesta inmunitaria adaptativa. Típicamente, un antígeno puede ser o puede comprender un péptido o proteína que el MHC puede presentar a las células T.

Como se usa en la presente, “variante de secuencia” (también denominada “variante”) se refiere a cualquier alteración en una secuencia de referencia, mediante la cual una secuencia de referencia es cualquiera de las secuencias enumeradas en las “Tablas de Secuencias y SEQ ID Números” (listado de secuencias), es decir SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 273. Por lo tanto, el término “variante de secuencia” incluye variantes de secuencia de nucleótidos y variantes de secuencia de aminoácidos. Cabe destacar que las variantes de secuencia a las que se hace referencia en la presente son en particular variantes de secuencia funcionales, es decir, variantes de secuencia que mantienen la función biológica de, por ejemplo, el anticuerpo. En el contexto de la presente invención, dicha función biológica mantenida es preferiblemente la neutralización de la infección por el ZIKV y/o la unión del anticuerpo a la proteína E del ZIKV. Las variantes de secuencia preferidas son, por lo tanto, variantes de secuencia funcional que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia a una secuencia de referencia. La frase “*variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia*”, como se usa en este documento, significa (i) que la variante de secuencia es funcional como se describe en la presente y (ii) cuanto mayor sea el% de identidad de secuencia, la más preferida es la variante de secuencia. En otras palabras, la frase “*variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia*” significa en particular que la variante de secuencia funcional tiene al menos 70% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 75% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 80% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 85% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 88% de identidad de secuencia, incluso más preferiblemente al menos 90% de identidad de secuencia, incluso más preferiblemente al menos 92% de

identidad de secuencia, aún más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente al menos 96% de identidad de secuencia, particularmente preferiblemente al menos 97% de identidad de secuencia, particularmente preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia y aún más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia respectiva.

El término “variante de secuencia” incluye en particular tales variantes que comprenden mutaciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia de referencia. Las variantes ejemplares de una secuencia de la porción Fc incluyen, pero no se limitan a, aquellas que tienen una sustitución de L hasta A en la posición CH2 4, CH2 5, o ambas.

La identidad de secuencia generalmente se calcula con respecto a la longitud completa de la secuencia de referencia (es decir, la secuencia mencionada en la solicitud). El porcentaje de identidad, como se menciona en la presente, se puede determinar, por ejemplo, utilizando BLAST utilizando los parámetros predeterminados especificados por el NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [matriz Blosom 62; penalización por abertura de hueco=11 y penalización por extensión de hueco=1].

Como se usa en la presente, una “variante de secuencia de nucleótidos” tiene una secuencia alterada en la que uno o más de los nucleótidos en la secuencia de referencia se eliminan o sustituyen, o uno o más nucleótidos se insertan en la secuencia de la secuencia de nucleótidos de referencia. Los nucleótidos se mencionan en la presente mediante la designación estándar de una letra (A, C, G o T). Debido a la degeneración del código genético, una “variante de secuencia de nucleótidos” puede resultar en un cambio en la secuencia de aminoácidos de referencia respectiva, es decir, en una “variante de secuencia de aminoácidos” o no. Las variantes de secuencia preferidas son tales variantes de secuencia de nucleótidos, que no dan como resultados variantes de secuencia de aminoácidos (mutaciones silenciosas), pero también están dentro del alcance otras mutaciones no silenciosas, en particular secuencias de nucleótidos mutantes, que dan como resultado una secuencia de aminoácidos, que es al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% de secuencia idéntica a la secuencia de referencia.

Una “variante de secuencia de aminoácidos” tiene una secuencia alterada en la que uno o más de los aminoácidos en la secuencia de referencia se eliminan o sustituyen, o uno o más aminoácidos se insertan en la secuencia de la secuencia de aminoácidos de referencia. Como resultado de las alteraciones, la variante de secuencia de aminoácidos tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a la secuencia de referencia, preferiblemente, al menos 90% idéntica, más preferiblemente al menos 95% idéntica, aún más preferiblemente al menos 99% idéntico a la secuencia de referencia. Las secuencias variantes que son al menos 90% idénticas no tienen más de 10 alteraciones, es decir, cualquier combinación de deleciones, inserciones o sustituciones, por 100 aminoácidos de la secuencia

de referencia.

Si bien es posible tener sustituciones de aminoácidos no conservativas, se prefiere que las sustituciones sean sustituciones de aminoácidos conservativas, en las que el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares con el aminoácido correspondiente en la secuencia de referencia. A modo de ejemplo, las sustituciones conservadoras de aminoácidos implican la sustitución de un aminoácido alifático o hidrófobo, por ejemplo, alanina, valina, leucina e isoleucina, con otra; sustitución de un aminoácido que no contiene hidroxilo, por ejemplo, serina y treonina, con otra; sustitución de un residuo ácido, por ejemplo, ácido glutámico o ácido aspártico, con otro; reemplazo de un residuo que contiene amida, por ejemplo, asparagina y glutamina, con otro; reemplazo de un residuo aromático, por ejemplo, fenilalanina y tirosina, con otro; reemplazo de un residuo básico, por ejemplo, lisina, arginina e histidina, con otra; y el reemplazo de un aminoácido pequeño, por ejemplo, alanina, serina, treonina, metionina y glicina, con otro.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones de terminal amino y/o carboxilo que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen la fusión al extremo N o C de una secuencia de aminoácidos a una molécula informadora o una enzima.

Es importante destacar que las alteraciones en las variantes de secuencia no eliminan la funcionalidad de la secuencia de referencia respectiva, en el presente caso, por ejemplo, la funcionalidad de una secuencia de un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, para unirse al mismo epítipo y/o para neutralizar suficientemente la infección por el ZIKV. La orientación para determinar qué nucleótidos y residuos de aminoácidos, respectivamente, pueden sustituirse, insertarse o eliminarse sin abolir dicha funcionalidad se encuentra usando programas informáticos bien conocidos en la técnica.

Como se usa en la presente, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos “derivada de” un ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína designado se refiere al origen del ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos que se deriva de una secuencia particular tiene una secuencia de aminoácidos que es esencialmente idéntica a esa secuencia o una porción de la misma, de la que se deriva, por lo que “esencialmente idéntica” incluye variantes de secuencia como se define encima. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos que se deriva de un péptido o proteína particular, se deriva del dominio correspondiente en el péptido o proteína particular. De este modo, “correspondiente” se refiere en particular a la misma funcionalidad. Por ejemplo, un “dominio extracelular” corresponde a otro “dominio extracelular” (de otra proteína), o un “dominio transmembrana” corresponde a otro “dominio transmembrana” (de otra proteína). Por lo tanto,

las partes “correspondientes” de péptidos, proteínas y ácidos nucleicos son fácilmente identificables por un experto en la técnica. Del mismo modo, las secuencias “derivadas de” otra secuencia son generalmente fácilmente identificables para un experto en la técnica como que tienen su origen en la secuencia.

5 Preferiblemente, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos derivada de otro ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína puede ser idéntica al ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína de partida (del que se deriva). Sin embargo, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos derivada de otro ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína también puede tener una o más mutaciones en relación con el
10 ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína de partida (del que se deriva), en particular, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos derivada de otro ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína puede ser una variante de secuencia funcional como se describió anteriormente del ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína de partida (del cual se deriva). Por ejemplo, en un péptido/proteína, uno o más residuos de aminoácidos pueden
15 estar sustituidos con otros residuos de aminoácidos o pueden producirse una o más inserciones o deleciones de residuos de aminoácidos.

Como se usa en la presente, el término “mutación” se refiere a un cambio en la secuencia de ácido nucleico y/o en la secuencia de aminoácidos en comparación con una secuencia de referencia, por ejemplo, una secuencia genómica correspondiente. Una
20 mutación, por ejemplo, en comparación con una secuencia genómica, puede ser, por ejemplo, una mutación somática (natural), una mutación espontánea, una mutación inducida, por ejemplo, inducida por enzimas, productos químicos o radiación, o una mutación obtenida por mutagénesis dirigida al sitio (métodos de biología molecular para realizar cambios específicos e intencionales en la secuencia de ácido nucleico y/o en la secuencia de aminoácidos). Por lo
25 tanto, se entenderá que los términos “mutación” o “que muta” también incluyen hacer físicamente una mutación, por ejemplo, en una secuencia de ácido nucleico o en una secuencia de aminoácidos. Una mutación incluye la sustitución, eliminación e inserción de uno o más nucleótidos o aminoácidos, así como la inversión de varios nucleótidos o aminoácidos sucesivos. Para lograr una mutación en una secuencia de aminoácidos, preferiblemente se
30 puede introducir una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos para expresar un polipéptido mutado (recombinante). Se puede lograr una mutación, por ejemplo, alterando, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio, un codón de una molécula de ácido nucleico que codifica un aminoácido para dar como resultado un codón que codifica un aminoácido diferente, o sintetizando una variante de secuencia, por
35 ejemplo, conociendo la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido y diseñando la síntesis de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante del polipéptido sin la

necesidad de mutar uno o más nucleótidos de una molécula de ácido nucleico.

Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta especificación. Cada uno de los documentos citados en la presente (incluidas todas las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.), ya sea supra o
5 infra, se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. Nada en la presente debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a anteceder dicha descripción en virtud de una invención anterior.

Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente, ya que pueden variar. También debe
10 entenderse que la terminología utilizada en la presente tiene el propósito de describir modalidades particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica.

15 ***Anticuerpos multiespecíficos que se unen a distintos epítomos del virus del Zika***

La presente invención se basa, entre otros hallazgos, en el descubrimiento de que los anticuerpos multiespecíficos y sus fragmentos de unión al antígeno, que se unen específicamente a distintos epítomos del virus del Zika. Dichos anticuerpos minimizan o eliminan la generación de mutantes de escape del virus del Zika. En particular, actualmente no
20 hay prevención/tratamiento disponible para la infección por el virus del Zika. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son altamente efectivos para prevenir, así como para tratar o atenuar la infección por el virus del Zika. Además, debido a la especificidad de los anticuerpos para el virus del Zika, no provocan la ADE, sino que bloquean la ADE.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo multiespecífico
25 aislado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a distintos epítomos del virus del Zika. En otras palabras, la presente invención proporciona un anticuerpo multiespecífico aislado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende al menos dos sitios de unión de epítomos, que se unen específicamente a epítomos distintos del virus del Zika.

30 Es importante destacar que, en contraste con los anticuerpos convencionales (“ordinarios”) que exhiben una sola especificidad, los anticuerpos multiespecíficos pueden unirse a al menos dos epítomos diferentes. En el presente caso, los anticuerpos multiespecíficos se unen específicamente a (al menos dos) epítomos distintos del virus del Zika.

35 En consecuencia, como se usa en la presente, el término “multiespecífico” se refiere a la capacidad de unirse a al menos dos epítomos diferentes, por ejemplo, en diferentes antígenos, tales como diferentes proteínas del virus del Zika (ZIKV) o en el mismo antígeno,

por ejemplo, la misma proteína del ZIKV. Preferiblemente, los anticuerpos multiespecíficos, o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos, de acuerdo con la presente invención, se unen a al menos dos epítomos diferentes en la misma proteína del ZIKV, aún más preferiblemente a al menos dos epítomos diferentes en la proteína de envoltura (E) del virus del Zika.

Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención es biespecífico, triespecífico, tetraespecífico o pentaspecífico, más preferiblemente el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, es biespecífico, triespecífico o tetraespecífico, incluso más preferiblemente el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, es biespecífico o triespecífico, y aún más preferiblemente el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, es biespecífico.

Como se usa en la presente, términos como “biespecífico”, “triespecífico”, “tetraspecífico”, etc., se refieren al número de epítomos diferentes a los que se puede unir el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo. Por ejemplo, los anticuerpos monoespecíficos de tipo IgG convencionales tienen dos sitios de unión de epítomos idénticos (parátomos) y, por lo tanto, solo pueden unirse a epítomos idénticos (pero no a epítomos diferentes). Un anticuerpo multiespecífico, por el contrario, tiene al menos dos tipos diferentes de sitios de unión de epítomos (parátomos) y, por lo tanto, puede unirse a al menos dos epítomos diferentes. Como se usa en la presente, el término “parátomo” se refiere a un sitio de unión al epítomo del anticuerpo. Por consiguiente, los términos “parátomo” y “sitio de unión al epítomo” se usan en la presente de manera intercambiable. Además, una única “especificidad” puede referirse a uno, dos, tres o más parátomos idénticos en un solo anticuerpo. El número real de parátomos en una sola molécula de anticuerpo se denomina “valencia”.

Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención es bivalente, trivalente, tetravalente, hexavalente u octavalente, más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, es bivalente o tetravalente, aún más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, es tetravalente.

Aún más preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención es biespecífico y tetravalente.

También se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprenda exactamente dos copias (idénticas) de cada uno de los sitios de unión del epítomo distintos que se unen específicamente a al menos dos epítomos distintos del virus del Zika.

Por ejemplo, un solo anticuerpo IgG nativo es monoespecífico y bivalente, ya que tiene dos parátomos idénticos (dos copias idénticas). Sin embargo, un anticuerpo multiespecífico

comprende al menos dos parátomos (diferentes). Por lo tanto, el término “multiespecífico” se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno, que tienen más de un parátomo y la capacidad de unirse a dos o más epítomos diferentes. El término “anticuerpos multiespecíficos/fragmentos de unión al antígeno” comprende en particular anticuerpos

5 bienespecíficos como se definió anteriormente, pero típicamente también proteína, por ejemplo, anticuerpos, andamios, que se unen en particular a tres o más epítomos diferentes, es decir, anticuerpos que tienen tres o más parátomos.

En particular, el anticuerpo multiespecífico, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, puede comprender dos o más parátomos, en donde algunos parátomos pueden ser

10 idénticos de modo que todos los parátomos del anticuerpo pertenezcan al menos a dos tipos diferentes de parátomos y, por lo tanto, el anticuerpo tiene al menos dos especificidades. Por ejemplo, el anticuerpo multiespecífico o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención puede comprender cuatro parátomos, en donde cada dos parátomos son idénticos (es decir, tienen la misma especificidad) y, por lo tanto, el anticuerpo o

15 fragmento del mismo es bienespecífico y tetravalente (dos idénticos parátomos para cada una de las dos especificidades). Por lo tanto, “una especificidad” se refiere en particular a uno o más parátomos que exhiben la misma especificidad (lo que generalmente significa que uno o más parátomos son idénticos) y, por lo tanto, “dos especificidades” pueden realizarse por dos, tres, cuatro cinco, seis o más parátomos siempre y cuando se refieran solo a dos especificidades.

20 Por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico puede comprender un solo parátomo para cada especificidad (de al menos dos), es decir, el anticuerpo multiespecífico comprende en total al menos dos parátomos.

Por ejemplo, un anticuerpo bienespecífico comprende un solo parátomo para cada una de las dos especificidades, es decir, el anticuerpo comprende en total dos parátomos. Aún más

25 preferiblemente, el anticuerpo comprende exactamente dos parátomos (idénticos) para cada una de las dos especificidades, es decir, el anticuerpo comprende en total cuatro parátomos. Alternativamente, el anticuerpo puede comprender tres parátomos (idénticos) para cada una de las dos especificidades, es decir, el anticuerpo comprende en total seis parátomos.

Como se usa en el presente documento, el término “antígeno” se refiere a cualquier

30 sustancia estructural que sirve como un objetivo para los receptores de una respuesta inmunitaria adaptativa, en particular como un objetivo para anticuerpos, receptores de células T y/o receptores de células B. Un “epítomo”, también conocido como “determinante antigénico”, es la parte (o fragmento) de un antígeno que es reconocido por el sistema inmunitario, en particular por anticuerpos, receptores de células T y/o receptores de células B. Por lo tanto, un

35 antígeno tiene al menos un epítomo, es decir, un solo antígeno tiene uno o más epítomos. Un antígeno puede ser (i) un péptido, un polipéptido o una proteína, (ii) un polisacárido, (iii) un lípido, (iv) una lipoproteína o un lipopéptido, (v) un glicolípido, (vi) un ácido nucleico, o (vii) un

fármaco de molécula pequeña o una toxina. Por lo tanto, un antígeno puede ser un péptido, una proteína, un polisacárido, un lípido, una combinación de los mismos que incluyen lipoproteínas y glucolípidos, un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARNip, ARNsh, oligonucleótidos antisentido, ADN señuelo, plásmido) o un fármaco de molécula pequeña (por ejemplo, ciclosporina A, paclitaxel, doxorubicina, metotrexato, ácido 5-aminolevulínico) o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, el antígeno se selecciona de (i) un péptido, un polipéptido o una proteína, (ii) un polisacárido, (iii) un lípido, (iv) una lipoproteína o un lipopéptido y (v) un glicolípido; más preferiblemente, el antígeno es un péptido, un polipéptido o una proteína.

El anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se une al menos a dos epítopos diferentes del virus del Zika. Los al menos diferentes epítopos del virus del Zika pueden ubicarse en diferentes antígenos del virus del Zika, como diferentes proteínas del virus del Zika (ZIKV), o en el mismo antígeno del virus del Zika, por ejemplo, en la misma proteína ZIKV. Los ejemplos preferidos de antígenos/proteínas del ZIKV incluyen cápside, prM, envoltura y las proteínas no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 y NS5B. Aún más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se une a (al menos dos) epítopos distintos en la proteína de la envoltura del virus del Zika (proteína E del ZIKV). En otras palabras, aún más preferiblemente el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos sitios de unión del epítipo, que se unen específicamente a epítopos distintos en la proteína de la envoltura del virus del Zika (proteína E del ZIKV). El ZIKV incluye un núcleo de nucleocápside, que comprende ARN monocatenario envuelto por proteínas centrales. El núcleo de la nucleocápside está encapsulado por una membrana bicapa lipídica con “proteínas de membrana” y “proteínas de envoltura”. La proteína de envoltura del ZIKV (proteína E) es el antígeno dominante. La estructura y los dominios de la proteína E del ZIKV se describen, por ejemplo, en Dai L, Song J, Lu X, Deng YQ, Musyoki AM, Cheng H, Zhang Y, Yuan Y, Song H, Haywood J, Xiao H, Yan J, Shi Y, Qin CF, Qi J, Gao GF. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host Microbe*. 11 de mayo de 2016; 19(5):696-704.

Preferiblemente, los (al menos dos) epítopos distintos del virus del Zika, a los que se une el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, son epítopos no superpuestos. En particular, los aminoácidos que forman el primer epítipo del virus del Zika, al que se une el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, son distintos de los aminoácidos que forman el segundo epítipo del virus del Zika, al cual el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se une a.

El anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención puede ser de cualquier formato de anticuerpo. En particular, los anticuerpos multiespecíficos preferiblemente abarcan anticuerpos “completos”, tales como moléculas completas de tipo IgG o IgG, mientras que los fragmentos de unión a antígeno en el contexto de la presente invención se refieren preferiblemente a formatos recombinantes pequeños, tales como un formato basado en activadores de células T biespecífico (BiTE®; excepto que en el contexto de la presente invención ambas especificidades se dirigen al virus del Zika, en consecuencia, la especificidad de células T de BiTE® puede reemplazarse por una (segunda) especificidad del ZIKV), moléculas de fragmento variable de cadena simple en tándem (taFvs), diacuerpos (Dbs), clacuerpos de cadena sencilla (scDbs) y varios otros derivados de estos (ref. formatos de anticuerpos biespecíficos como los descritos por Byrne H. *et al.* (2013) Trends Biotech, 31 (11): 621-632 con la FIGURA 2 que muestra varios formatos de anticuerpos biespecíficos; Weidle U.H. *et al.* (2013) Cancer Genomics and Proteomics 10: 1 -18, en particular la FIGURA 1 que muestra varios formatos de anticuerpos biespecíficos; y Chan, A.C. y Carter, P.J. (2010) Nat Rev Immu 10: 301-316 con la FIGURA 3 que muestra varios formatos de anticuerpos biespecíficos). Los ejemplos de formatos de anticuerpos biespecíficos incluyen, pero no se limitan a, Fabs en tándem Ig, DVD-Ig, quadroma, Fab acoplado químicamente (unión a antígeno de fragmento) y BiTE® (activador de células T biespecífico). En una modalidad de la presente invención, el anticuerpo es preferiblemente un Fabs en tándem Ig (FIT-Ig) o un DVD-Ig.

Por lo tanto, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, puede seleccionarse del grupo que comprende Fabs en tándem Ig (FIT-Ig); DVD-Ig; hibridoma híbrido (cuadroma); plataforma anticalina multiespecífica (Pieris); diacuerpos; diacuerpos de cadena simple; fragmentos de tándem de cadena simple Fv; TandAbs, Abs triespecífico (Affimed) (105-110 kDa); dardos (re-direccionado de doble afinidad; MacroGenics); Xmabs biespecíficos (Xencor); activadores de células T biespecíficos (bites; Amgen; 55 kDa); Triplecuerpos; Tribody = Fab-scFv Proteína de Fusión (Creative Biolabs) derivados de anticuerpos recombinantes multifuncionales (110 kDa); plataforma doblecuerpo (Genmab); plataforma de anclaje de seguridad; plataforma de perilla en orificio (KIH); Anticuerpo IgG biespecífico humanizado (REGN1979) (Regeneron); anticuerpos biespecíficos Mab² (F-Star); DVD-Ig = inmunoglobulina de dominio variable dual (Abbott); cuerpos kapa-lambda; TBTI = tándem biespecífico tetravalente Ig; y CrossMab.

El anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención puede seleccionarse de anticuerpos biespecíficos de tipo IgG (BsIgG) que comprenden CrossMab; DAF (dos en uno); DAF (cuatro en uno); DutaMab; DT-IgG; perillas en orificios comunes LC; conjunto de perillas en orificios; par de carga; intercambio de brazo Fab; SEEDcuerpo; Triomab; LUZ-Y; Fcab; cuerpo κλ; y ortogonal Fab. Estos formatos de

anticuerpos biespecíficos se muestran y describen, por ejemplo, en Spiess C, Zhai Q. y Carter P.J. (2015) *Molecular Immunology* 67: 95-106, en particular la FIGURA 1 y la descripción correspondiente, por ejemplo, págs. 95 - 101.

Preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, puede seleccionarse de fragmentos de anticuerpos biespecíficos que comprenden nanocuerpo; Nanocuerpo-HAS; BITE; Diacuerpo; DART; TandAb; scDiacuerpo; sc-Diacuerpo-CH3; Diacuerpo-CH3; Triple cuerpo; Minianticuerpo; Minicuerpo; Minicuerpo TriBi; scFv-CH3 KIH; Fab-scFv; scFv-CH-CL-scFv; F(ab')₂; F(ab')₂-scFv₂; scFv-KIH; Fab-scFv-Fc; HCAb tetravalente; scDiacuerpo-Fc; Diacuerpo-Fc; Tándem scFv-Fc; e Intracuerpo. Estos formatos de anticuerpos biespecíficos se muestran y describen, por ejemplo, en Spiess C, Zhai Q. y Carter P.J. (2015) *Molecular Immunology* 67: 95-106, en particular la FIGURA 1 y la descripción correspondiente, por ejemplo, págs. 95 - 101.

Más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, puede seleccionarse de anticuerpos añadidos a IgG con un fragmento de unión al antígeno adicional que comprende DVD-IgG; IgG(H)-scFv; scFv-(H)IgG; IgG(L)-scFv; scFv-(L)IgG; IgG(L,H)-Fv; IgG(H)-V; V(H)-IgG; IgG(L)-V; V(L)-IgG; KIH IgG-scFab; 2scFv-IgG; IgG-2scFv; scFv4-Ig; scFv4-Ig; Zycuerpo y DVI-IgG (cuatro en uno). Estos formatos de anticuerpos biespecíficos se muestran y describen, por ejemplo, en Spiess C, Zhai Q. y Carter P.J. (2015) *Molecular Immunology* 67: 95-106, en particular la FIGURA 1 y la descripción correspondiente, por ejemplo, págs. 95 - 101. De esos formatos de anticuerpos, DVD-Ig (inmunoglobulina de dominio variable dual (Abbott)) es aún más preferido. Este formato de anticuerpo se describe en detalle, por ejemplo, en Wu C, Ying H, Grinnell C, Bryant S, Miller R, Clabbers A, Bose S, McCarthy D, Zhu RR, Santora L, Davis-Taber R, Kunes Y, Fung E, Schwartz A, Sakorafas P, Gu J, Tarcsa E, Murtaza A, Ghayur T. Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. *Nat Biotechnol.* 2007 Nov;25(11):1290-7; o en DiGiammarino E, Ghayur T, Liu J. Design and generation of DVD-IgTM molecules for dual-specific targeting. *Methods Mol Biol.* 2012; 899:145-56.

Aún más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, es un anticuerpo añadido a IgG del formato Fabs en tándem Ig (FIT-Ig). En otras palabras, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, es más preferiblemente del formato Fabs en tándem Ig (FIT-Ig). El formato Fabs en tándem Ig (FIT-Ig) se describe en detalle, por ejemplo, en el documento WO 2015/103072 A1, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad, o en Gong S, Ren F, Wu D, Wu X, Wu C: Fabs-in-tandem immunoglobulin is a novel and versatile bispecific design for engaging multiple therapeutic targets. *MAbs* 2017. Similar a DVD-Ig, también FIT-Ig es un formato simétrico tetravalente

biespecífico. FIT-Ig puede producirse usando tres polipéptidos: el polipéptido 1 generalmente comprende la cadena ligera del Fab externo fusionado, preferiblemente sin conectores, a la región N-terminal de cadena pesada interna de Fab. El polipéptido 2 generalmente comprende la región de cadena pesada y las regiones CH1 del Fab externo, y el polipéptido 3 generalmente comprende la cadena ligera del Fab interno. Por consiguiente, un anticuerpo del formato FIT-Ig generalmente comprende un “Fab interno” y un “Fab externo”.

Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, neutraliza la infección por el virus del Zika. En otras palabras, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, reduce preferiblemente la infectividad viral del virus del Zika.

Para estudiar y cuantificar la infectividad del virus (o “neutralización”) en el laboratorio, el experto en la técnica conoce varios “ensayos de neutralización” estándar. Para un ensayo de neutralización, los virus animales se propagan típicamente en células y/o líneas celulares. En el contexto de la presente invención, se prefiere un ensayo de neutralización, en donde las células cultivadas se incuban con una cantidad fija de virus del Zika (ZIKV) en presencia (o ausencia) del anticuerpo a analizar. Como lectura, por ejemplo, se puede usar citometría de flujo. Alternativamente, también son concebibles otras lecturas, como determinar la cantidad de proteínas no estructurales del ZIKV (como la NS1 del ZIKV) secretadas en el sobrenadante de cultivo. Por ejemplo, se puede utilizar una prueba de dosis nociva infecciosa 50 (TCID₅₀) basada en el cultivo de tejidos basada en el ensayo de inmunosorción de captura de antígeno de proteína 1 (NS1) no estructural del ZIKV (TCID₅₀-ELISA) como alternativa al ensayo de placa estándar para titular el virus del Zika - de una manera similar a la descrita para el virus del dengue (DENV) por Li J, Hu DM, Ding XX, Chen Y, Pan YX, Qiu LW, Che XY: Li J, Hu D-M, Ding X-X, Chen Y, Pan Y-X, Qiu L-W, Che X-Y: Enzyme-linked immunosorbent assay-format tissue culture infectious dose-50 test for titrating dengue virus. PLoS ONE 2011, 6:e22553. En dicho ensayo, por ejemplo, se pueden usar ventajosamente los anticuerpos de unión a la NS1 del ZIKV como se describe en la presente solicitud.

En una modalidad preferida de un ensayo de neutralización del ZIKV, las células cultivadas, por ejemplo células Vero, se incuban con una cantidad fija del ZIKV en presencia o ausencia del anticuerpo a analizar, por ejemplo durante alrededor de cuatro días. Después de la incubación, las células se pueden lavar y seguir cultivando. Para medir la infectividad del virus, se puede usar citometría de flujo. Para este fin, las celdas pueden ser reparadas, por ejemplo, con 2% de formaldehído, permeabilizante, por ejemplo, en PBS (solución amortiguadora salina con fosfato) 1% de FCS (suero de ternera fetal) 0.5% de saponina y teñido, por ejemplo, con anticuerpo de ratón 4G2. Las células se pueden incubar con una IgG anti-ratón de cabra conjugada con un tinte, como Alexa Fluor488 y analizarse por citometría de flujo. Alternativamente, las células viables pueden detectarse mediante citometría de flujo

utilizando, por ejemplo, el reactivo WST-1 (Roche). Una cepa del ZIKV preferida para usar en dicho ensayo de neutralización es H/PF/2013 del ZIKV.

El anticuerpo y el fragmento de unión al antígeno de la invención tienen una alta potencia neutralizante. La concentración del anticuerpo requerida para la neutralización del 50% del virus del Zika (IC_{50}) en comparación con los controles sin anticuerpos es, por ejemplo, de hasta alrededor de 3 $\mu\text{g/ml}$ o hasta alrededor de 1 $\mu\text{g/ml}$. Preferiblemente, la concentración del anticuerpo de la invención requerida para la neutralización del 50% del ZIKV (IC_{50}) es de hasta alrededor de 500 ng/ml, más preferiblemente la concentración del anticuerpo de la invención requerida para la neutralización del 50% del ZIKV (IC_{50}) es hasta alrededor de 250 ng/ml, incluso más preferiblemente la concentración del anticuerpo de la invención requerida para la neutralización del 50% del ZIKV (IC_{50}) es de hasta alrededor de 150 ng/ml. Más preferiblemente, la concentración del anticuerpo de la invención requerida para la neutralización del 50% del ZIKV (IC_{50}) es de alrededor de 100 ng/ml o menos, por ejemplo, alrededor de 90 ng/ml o menos, alrededor de 80 ng/ml o menos, alrededor de 70 ng/ml o menos, alrededor de 60 ng/ml o menos, alrededor de 50 ng/ml o menos, alrededor de 45 ng/ml o menos, alrededor de 40 ng/ml o menos, alrededor de 35 ng/ml o menos, alrededor de 30 ng/ml o menos, alrededor de 25 ng/ml o menos, alrededor de 20 ng/ml o menos o, particularmente preferiblemente, alrededor de 15 ng/ml o menos. En particular, la concentración del anticuerpo de la invención requerida para la neutralización del 50% del ZIKV (IC_{50}) es preferiblemente de alrededor de 50 ng/ml o menos. Esto significa que solo se requieren bajas concentraciones del anticuerpo para la neutralización del 50% del ZIKV. La concentración del anticuerpo de la invención requerida para la neutralización del 50% del ZIKV (IC_{50}) se puede medir usando ensayos de neutralización estándar como los conoce un experto en la técnica o, en particular, como se describe anteriormente.

En general, la unión de un anticuerpo puede evaluarse mediante el uso de un ELISA estándar (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), que es bien conocido por el experto en la técnica. Se puede realizar un ELISA estándar ejemplar como sigue: las placas ELISA se pueden recubrir (por ejemplo, durante la noche a 4°C) con una cantidad suficiente (por ejemplo, 1 $\mu\text{g/ml}$) de la proteína/complejo/partícula a la que se une el anticuerpo para ser probado (por ejemplo, para la unión al DENV como se describe a continuación, se usan proteínas del DENV y/o VLP del DENV), por ejemplo, en PBS. Las placas pueden bloquearse, por ejemplo, con una solución al 1% p/v de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS, y se incubó con el anticuerpo a analizar (por ejemplo, durante alrededor de 1.5 horas a temperatura ambiente). Después del lavado, se puede revelar la unión del anticuerpo, por ejemplo, utilizando IgG antihumana de cabra acoplada a fosfatasa alcalina. Luego se pueden lavar las placas, se puede agregar el sustrato requerido (por ejemplo, p-NPP) y se pueden leer las placas, por ejemplo a 405 nm. Las afinidades relativas de la unión del anticuerpo se

pueden determinar midiendo la concentración de mAb (EC_{50}) requerida para lograr la unión máxima del 50% en la saturación. Los valores de EC_{50} pueden calcularse mediante la interpolación de curvas de unión equipadas con una regresión no lineal de cuatro parámetros con una pendiente variable.

5 Preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, esencialmente no se une a partículas similares al virus del Dengue y/o a la proteína de envoltura del Dengue. Más preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, esencialmente no se une a partículas similares al virus del Dengue y/o a la proteína de envoltura del Dengue de cualquiera de los cuatro serotipos DENV DENV1, DENV2, DENV3 y 10 DENV4. Por lo tanto, “esencialmente no se une” significa que para el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, no hay valor de EC_{50} de hasta 10^2 ng/ml, preferiblemente hasta 5×10^3 ng/ml, más preferiblemente hasta 5×10^3 ng/ml, incluso más preferiblemente hasta 8×10^3 ng/ml, y aún más preferiblemente hasta 10^1 ng/ml se puede 15 determinar en un ELISA estándar para partículas similares al virus del dengue (VLP del DENV) y/o a la proteína de envoltura del dengue (proteína E del DENV). En otras palabras, la concentración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, se requiere para lograr una unión máxima del 50% en la saturación (EC_{50}) a partículas similares al virus del dengue (VLP del DENV) y/o a la proteína de envoltura del dengue (proteína E del DENV) 20 en un ELISA estándar es típicamente más de 10^2 ng/ml, preferiblemente más de 10^3 ng/ml, más preferiblemente más de 5×10^3 ng/ml, incluso más preferiblemente más de 8×10^3 ng/ml, y más preferiblemente más de 10^4 ng/ml.

Preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención no contribuye a la mejora dependiente de anticuerpos 25 (ADE) de la infección por el virus del Zika. Más preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, bloquea la potenciación dependiente de anticuerpo (ADE) de la infección por el virus del Zika.

La ADE puede evaluarse mediante un ensayo basado en citometría de flujo usando, por ejemplo, células cultivadas o líneas celulares, tales como células K562. Por ejemplo, los 30 anticuerpos a analizar y ZIKV pueden mezclarse durante 1 hora a 37°C y agregarse a 5000 células K562/pocillo. Después de cuatro días, las células pueden fijarse, permeabilizarse y teñirse con m4G2, por ejemplo, como se describió anteriormente para los ensayos de neutralización. El número de células infectadas se determinó por citometría de flujo, como se describió anteriormente para los ensayos de neutralización.

35 Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, elimina la generación de mutantes de escape del ZIKV. El experto en la técnica puede evaluar fácilmente la eliminación de la generación de mutantes de

escape. Por ejemplo, para identificar la propensión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo a generar mutantes de escape, el ZIKV se pasa repetidamente en presencia de concentraciones sub-neutralizantes del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de interés. Como se muestra en los ejemplos 10 y 11 de la presente solicitud, los mutantes de escape del ZIKV ("MARM") aparecen típicamente después del tercer o cuarta etapa del ZIKV. Por consiguiente, se puede considerar que un anticuerpo elimina la generación de mutantes de escape del ZIKV, si incluso después de cinco pases del virus (ZIKV) en presencia de concentraciones subneutralizantes de ese anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, no se pueden identificar mutantes de escape del ZIKV. Más preferiblemente, no se pueden identificar mutantes de escape del ZIKV después de seis pases del virus (ZIKV) en presencia de concentraciones sub-neutralizantes del anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención. Incluso más preferiblemente, no se pueden identificar mutantes de escape del ZIKV después de siete pases del virus (ZIKV) en presencia de concentraciones sub-neutralizantes del anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención. Aún más preferiblemente, no se pueden identificar mutantes de escape del ZIKV después de ocho pases del virus (ZIKV) en presencia de concentraciones sub-neutralizantes del anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención.

Por ejemplo, para evaluar la propensión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para generar mutantes de escape, el ZIKV, por ejemplo la cepa H/PF/2013, se incuba con diversas concentraciones subneutralizantes del fragmento de interés de unión anticuerpo/antígeno, por ejemplo, durante al menos 30 min, por ejemplo, a alrededor de 37°C (temperatura corporal). Posteriormente, se agregan células (vivas), por ejemplo células Vero, seguidas de incubación, por ejemplo, durante al menos un día, preferiblemente de 3 a 4 días, por ejemplo, a alrededor de 37°C (temperatura corporal) para permitir que se produzca la propagación del virus. Luego, se pueden seleccionar los sobrenadantes de tres condiciones: la concentración más baja del fragmento de unión de anticuerpo/antígeno de interés a la que se observó la protección completa de la monocapa, una vez que la concentración a la que se observó un efecto parcial de CPE en la monocapa celular y una concentración a cuyo 100% de la monocapa celular fue destruido por el CPE del ZIKV. Una parte del sobrenadante seleccionado puede usarse para ensayos de micro-neutralización y la secuenciación posterior del virus (para identificar mutantes de escape), mientras que otra parte del (mismo) sobrenadante seleccionado puede usarse para la siguiente etapa de selección (pasaje). Es decir, para el siguiente pasaje, (una parte del) sobrenadante seleccionado puede mezclarse con las diversas concentraciones subneutralizantes del fragmento de interés de unión a anticuerpo/antígeno e incubarse, como se describió anteriormente, seguido de la adición de células (vivas) y incubación como se describió anteriormente, para finalmente seleccionar

nuevamente los sobrenadantes. Este proceso de selección y propagación se repite para llegar al menos a cinco etapas, preferiblemente al menos seis etapas, más preferiblemente al menos siete etapas, y aún más preferiblemente al menos ocho etapas.

Preferiblemente, cada CDR o cada región variable de al menos un sitio de unión a epítipo del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, es una CDR humana o una región variable humana, respectivamente. Más preferiblemente, cada CDR o cada región variable comprendida en el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, es una CDR humana o una región variable humana, respectivamente. Aún más preferiblemente, todas las regiones constantes y regiones variables comprendidas en el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, son regiones constantes humanas y regiones variables humanas.

También se prefiere que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, sea un anticuerpo monoclonal, preferiblemente un anticuerpo monoclonal en donde cada CDR o cada región variable comprendida en el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención es una CDR humana o una región variable humana, respectivamente.

Preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, es del tipo IgC, tal como el tipo IgC1, el tipo IgG2, el tipo IgG3 o el tipo IgG4, más preferiblemente del tipo IgG1. Más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende (i) una región constante de cadena pesada del tipo IgG1 CH1-CH2-CH3, en donde "CH1" se refiere al dominio constante 1 de cadena pesada, "CH2" se refiere al dominio constante 2 de cadena pesada, y "CH3" se refiere al dominio constante 3 de cadena pesada; y (ii) una región constante de la cadena ligera del tipo CL de IgG, en donde "CL" se refiere al dominio constante de la cadena ligera. Incluso más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende una región constante de cadena pesada del tipo IgG1 CH1-CH2-CH3 que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 91 o 92, o una variante de secuencia funcional de la misma, y una región constante de cadena ligera del tipo CL de IgG que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 93 o 94, o una variante de secuencia funcional de la misma.

Por consiguiente, se prefiere que el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, comprenda una porción Fc. Más preferiblemente, la porción Fc se deriva de origen humano, por ejemplo, de IgG1 humana, IgG2, IgG3 y/o IgG4, por lo que se prefiere particularmente la IgG1 humana. En la técnica se conocen diversos formatos de anticuerpos multiespecíficos que comprenden una porción Fc.

Los formatos de anticuerpos preferidos que comprenden una porción Fc son los formatos de anticuerpos añadidos a IgG descritos anteriormente. Típicamente, un anticuerpo que comprende una porción Fc es más efectivo y muestra una vida media más larga que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos sin la porción Fc.

5 Como se usa en la presente, el término “porción Fc” se refiere a una secuencia derivada de la porción de una cadena pesada de inmunoglobulina que comienza en la región bisagra justo arriba del sitio de escisión de papaína (por ejemplo, residuo 216 en IgG nativa, tomando el primer residuo de la región constante de cadena pesada es 114) y termina en el extremo C de cadena pesada de inmunoglobulina. Por consiguiente, una porción Fc puede ser
10 una porción Fc completa o una porción (por ejemplo, un dominio) de la misma. Una porción Fc completa comprende al menos un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 (por ejemplo, las posiciones de aminoácidos de la EU 216-446). Un residuo de lisina (K) adicional a veces está presente en el extremo C terminal de la porción Fc, pero a menudo se escinde de un anticuerpo maduro. Cada una de las posiciones de aminoácidos dentro de una porción Fc
15 se ha numerado de acuerdo con el sistema de numeración EU de Kabat, reconocido por la técnica, véase, por ejemplo, Kabat et al., en “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, U.S. Dept. Health and Human Services, 1983 y 1987.

Preferiblemente, en el contexto de la presente invención, una porción Fc comprende al menos uno de: un dominio de bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o
20 inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, o una porción variante o fragmento de los mismos. En modalidades preferidas, una porción Fc comprende al menos un dominio de bisagra, un dominio CH2 o un dominio CH3. Más preferiblemente, la porción Fc es una porción Fc completa. La porción Fc también puede comprender una o más inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en relación con una porción Fc natural. Por ejemplo, al menos
25 uno de un dominio de bisagra, dominio CH2 o dominio CH3 (o parte del mismo) puede ser eliminado. Por ejemplo, una porción Fc puede comprender o consistir en: (i) dominio bisagra (o porción del mismo) fusionado a un dominio CH2 (o porción del mismo), (ii) un dominio bisagra (o porción del mismo) fusionado a un dominio CH3 (o una porción del mismo), (iii) un dominio CH2 (o una porción del mismo) fusionado a un dominio CH3 (o una porción del mismo), (iv) un dominio bisagra (o una porción del mismo), (v) un dominio CH2 (o una porción del mismo), o (vi) un dominio CH3 o una porción del mismo.
30

Un experto en la técnica entenderá que la porción Fc puede modificarse de modo que varíe en la secuencia de aminoácidos de la porción Fc completa de una molécula de inmunoglobulina natural, mientras que retiene al menos una función deseable conferida por la
35 porción Fc que se producen naturalmente. Dichas funciones incluyen la unión al receptor Fc (FcR), la modulación de la vida media del anticuerpo, la función ADCC, la unión a la proteína A, la unión a la proteína G y la unión al complemento. Los expertos en la materia conocen

bien las funciones de porciones Fc que se producen naturalmente, que son responsables y/o esenciales para tales funciones.

Por ejemplo, para activar el complemento, la cascada C1q se une a al menos dos moléculas de IgG1 o una molécula de IgM, unida al objetivo antigénico (Ward, E. S. y Ghetie, V., *Ther. Immunol.* 2 (1995) 77-94). Burton, D. R., describió (*Mol. Immunol.* 22 (1985) 161-206) que la región de cadena pesada que comprende los residuos de aminoácidos 318 a 337 está implicada en la fijación del complemento. Duncan, A. R. y Winter, G. (*Nature* 332 (1988) 738-740), utilizando mutagénesis dirigida al sitio, informaron que Glu318, Lys320 y Lys322 forman el sitio de unión a C1q. El papel de los residuos Glu318, Lys320 y Lys322 en la unión de C1q se confirmó por la capacidad de un péptido sintético corto que contiene estos residuos para inhibir la lisis mediada por el complemento.

Por ejemplo, la unión de FcR puede estar mediada por la interacción de la porción Fc (de un anticuerpo) con receptores Fc (FcR), que son receptores especializados de la superficie celular en células hematopoyéticas. Los receptores Fc pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas, y se demostró que median tanto la eliminación de los patógenos recubiertos de anticuerpos por la fagocitosis de los complejos inmunitarios, como la lisis de los eritrocitos y otros objetivos celulares (por ejemplo, células tumorales) recubiertas con el anticuerpo correspondiente, a través de la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC; Van de Winkel, J. C. y Anderson, C. L., *J. Leukoc. Biol.* 49 (1991) 511-524). Los FcR se definen por su especificidad para las clases de inmunoglobulina; los receptores Fc para anticuerpos IgG se denominan FcγR, para IgE como FcεR, para IgA como FcαR, etc., y los receptores Fc neonatales se denominan FcRn. La unión al receptor Fc se describe, por ejemplo, en Ravetch, J. V., y Kinet, J. P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492; Capel, P. J., et al., *Immunomethods* 4 (1994) 25-34; de Haas, M y col. *Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341; y Gessner, J. E., y col., *Ann. Hematol* 76 (1998) 231-248.

La reticulación de los receptores por el dominio Fc de los anticuerpos IgG nativos (FcγR) desencadena una amplia variedad de funciones efectoras, incluida la fagocitosis, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la liberación de mediadores inflamatorios, así como la eliminación del complejo inmunitario y la regulación de la producción de anticuerpos. Por lo tanto, se prefieren las porciones Fc que proporcionan reticulación de receptores (FcγR). En humanos, se han caracterizado tres clases de FcγR, que son: (i) FcγRI (CD64), que une IgG monomérica con alta afinidad y se expresa en macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos; (ii) FcγRII (CD32), que une IgG compleja con afinidad media a baja, se expresa ampliamente, en particular en los leucocitos, se sabe que es un jugador central en la inmunidad mediada por anticuerpos, y que se puede dividir en FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIC, que realiza diferentes funciones en el sistema inmunitario, pero se une con baja afinidad similar a la IgG-Fc, y los ectodominios de estos receptores son altamente homólogos; y (iii)

FcγRIII (CD16), que une IgG con afinidad media a baja y existe en dos tipos: FcγRIIIA que se encuentra en las células NK, macrófagos, eosinófilos y algunos monocitos y células T y mediando ADCC y FcγRHIB, que se expresa altamente en neutrófilos. El FcγRIIA se encuentra en muchas células involucradas en la muerte (por ejemplo, macrófagos, monocitos, neutrófilos) y parece capaz de activar el proceso de muerte. El FcγRIIB parece jugar un papel en los procesos inhibitorios y se encuentra en células B, macrófagos y en mastocitos y eosinófilos. Es importante destacar que el 75% de todos los FcγRIIB se encuentran en el hígado (Ganesan, L. P. et al., 2012: FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. *Journal of Immunology* 189: 4981-4988). El FcγRIIB se expresa abundantemente en el endotelio sinusoidal del hígado, llamado LSEC, y en las células de Kupffer en el hígado y el LSEC son el sitio principal de eliminación de complejos inmunitarios pequeños (Ganesan, L. P. et al., 2012: FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. *Journal of Immunology* 189: 4981-4988).

Por consiguiente, en la presente invención, se prefieren tales anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que pueden unirse a FcγRIIb, por ejemplo anticuerpos que comprenden una porción Fc para unirse a FcγRIIb, en particular una región Fc, tal como, por ejemplo, IgG -tipo de anticuerpos. Además, es posible diseñar la porción Fc para mejorar la unión de FcγRIIB mediante la introducción de las mutaciones S267E y L328F como se describe por Chu, S. Y. et al., 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies. *Molecular Immunology* 45, 3926-3933. De este modo, se puede mejorar la eliminación de los complejos inmunitarios (Chu, S., et al., 2014: Accelerated Clearance of IgE In Chimpanzees Is Mediated By Xmab7195, An Fc-Engineered Antibody With Enhanced Affinity For Inhibitory Receptor FcγRIIb. *Am J Respir Crit*, resumen de la Conferencia Internacional de la American Thoracic Society). Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, se prefieren tales anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una porción Fc modificado genéticamente con las mutaciones S267E y L328F, en particular de acuerdo con lo descrito por Chu, S. Y. et al., 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies. *Molecular Immunology* 45, 3926-3933

En células B parece funcionar para suprimir la producción de inmunoglobulina adicional y el cambio de isotipo para decir, por ejemplo, la clase IgE. En los macrófagos, FcγRIIB actúa para inhibir la fagocitosis mediada por FcγRIIA. En los eosinófilos y los mastocitos, la forma b puede ayudar a suprimir la activación de estas células a través de la unión de IgE a su receptor separado.

Con respecto a la unión de FcγRI, la modificación en IgG nativa de al menos uno de E233-G236, P238, D265, N297, A327 y P329 reduce la unión a FcγRI. Los residuos de IgG2

en las posiciones 233-236, sustituidos en IgG1 y IgG4, reducen la unión a FcγRI por 10³ veces y eliminan la respuesta de monocitos humanos a los glóbulos rojos sensibilizados por anticuerpos (Armor, K. L., et al. *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613-2624). Con respecto a la unión de FcγRII, se encuentra una unión reducida para FcγRIIA, por ejemplo, para la mutación de IgG de al menos uno de E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 y K414. Con respecto a la unión de FcγRIII, se encuentra una unión reducida a FcγRIIIA, por ejemplo, para la mutación de al menos uno de E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 y D376. El mapeo de los sitios de unión en IgG1 humana para los receptores Fc, los sitios de mutación mencionados anteriormente y los métodos para medir la unión a FcγRI y FcγRIIA se describen en Shields, R. L, et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591 -6604.

Con respecto a la unión al FcγRII crucial, dos regiones de Fc de IgG nativo parecen ser críticas para las interacciones de FcγRIIs e IgG, a saber (i) el sitio de bisagra inferior de Fc de IgG, en particular los residuos de aminoácidos L, L, G, G (234 - 237, numeración de la EU), y (ii) la región adyacente del dominio CH2 de Fc de IgG, en particular un bucle y hebras en el dominio CH2 superior adyacente a la región bisagra inferior, por ejemplo, en una región de P331 (Wines, B.D., et al., *J. Immunol.* 2000; 164: 5313 - 5318). Además, FcγRI parece unirse al mismo sitio en Fc de IgG, mientras que FcRn y la proteína A se unen a un sitio diferente en Fc de IgG, que parece estar en la interfaz CH2-CH3 (Wines, BD, et al., *J. Immunol.* 2000; 164: 5313 - 5318).

Por ejemplo, la porción Fc puede comprender o consistir en al menos la porción de una porción Fc que se sabe en la técnica que se requiere para la unión a FcRn o una vida media prolongada. Alternativa o adicionalmente, la porción Fc del anticuerpo de la invención comprende al menos la porción de la conocida en la técnica que se requiere para la unión a la proteína A y/o la porción Fc del anticuerpo de la invención comprende al menos la porción de una molécula Fc conocida en la técnica que se requiere para la unión a la proteína G. Preferiblemente, la función retenida es la neutralización de la infección por el virus del Zika, que se supone que está mediada por la unión de FcγR. Por consiguiente, una porción Fc preferida comprende al menos la porción conocida en la técnica que se requiere para la unión de FcγR. Como se describe anteriormente, una porción Fc preferida puede comprender al menos (i) el sitio de bisagra inferior de Fc de IgG nativa, en particular los residuos de aminoácidos L, L, G, G (234 - 237, numeración de la UE), y (ii) la región adyacente del dominio CH2 de la Fc de IgG nativo, en particular un bucle y hebras en el dominio CH2 superior adyacente a la región bisagra inferior, por ejemplo, en una región de P331, por ejemplo, una región de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos consecutivos en el dominio CH2 superior de Fc de IgG nativo alrededor de P331, por ejemplo, entre los aminoácidos 320 y 340 (numeración UE) de Fc de IgG nativo.

Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende una región Fc. Como se usa en la presente, el término “región Fc” se refiere a la porción de una inmunoglobulina formada por dos o más porciones Fc de cadenas pesadas de anticuerpos. Por ejemplo, la región Fc puede ser una

5 región Fc monomérica o de “cadena sencilla” (es decir, una región scFc). Las regiones Fc de cadena sencilla están compuestas por porciones Fc unidas dentro de una cadena de polipéptidos única (por ejemplo, codificada en una secuencia de ácido nucleico contigua única). Se describen regiones scFc ejemplares en el documento WO 2008/143954 A2. Preferiblemente, la región Fc es una región Fc dimérica. Una “región Fc dimérica” o “dcFc” se

10 refiere al dímero formado por las porciones Fc de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina separadas. La región Fc dimérica puede ser un homodímero de dos porciones Fc idénticos (por ejemplo, una región Fc de una inmunoglobulina natural) o un heterodímero de dos porciones Fc no idénticas.

Las porciones Fc de la región Fc pueden ser de la misma o diferente clase y/o

15 subclase. Por ejemplo, las porciones Fc pueden derivarse de una inmunoglobulina (por ejemplo, una inmunoglobulina humana) de una subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Preferiblemente, las porciones Fc de la región Fc son de la misma clase y subclase. Sin embargo, la región Fc (o uno o más porciones Fc de una región Fc) también puede ser quimérica, por lo que una región Fc quimérica puede comprender porciones Fc derivadas de

20 diferentes clases y/o subclases de inmunoglobulina. Por ejemplo, al menos dos de las porciones Fc de una región Fc dimérica o monocatenaria pueden ser de diferentes clases y/o subclases de inmunoglobulina. Adicional o alternativamente, las regiones Fc quiméricas pueden comprender uno o más porciones Fc quiméricos. Por ejemplo, la región o porción Fc quimérico puede comprender una o más porciones derivadas de una inmunoglobulina de una

25 primera subclase (por ejemplo, una subclase IgG1, IgG2 o IgG3) mientras que la porción de la región o porción Fc es de una subclase diferente. Por ejemplo, una región o porción Fc de un polipéptido Fc puede comprender un dominio CH2 y/o CH3 derivado de una inmunoglobulina de una primera subclase (por ejemplo, una subclase IgG1, IgG2 o IgG4) y una región bisagra de una inmunoglobulina de una segunda subclase (por ejemplo, una subclase IgG3). Por

30 ejemplo, la región o porción Fc puede comprender un dominio bisagra y/o CH2 derivado de una inmunoglobulina de una primera subclase (por ejemplo, una subclase IgG4) y un dominio CH3 de una inmunoglobulina de una segunda subclase (por ejemplo, una subclase IgG1, IgG2 o IgG3). Por ejemplo, la región Fc quimérica puede comprender una porción Fc (por ejemplo, una porción Fc completo) de una inmunoglobulina para una primera subclase (por ejemplo,

35 una subclase IgG4) y una porción Fc de una inmunoglobulina de una segunda subclase (por ejemplo, una subclase IgG1, IgG2 o IgG3). Por ejemplo, la región o porción Fc puede comprender un dominio CH2 de una inmunoglobulina IgG4 y un dominio CH3 de una

inmunoglobulina IgG1. Por ejemplo, la región o porción Fc puede comprender un dominio CH1 y un dominio CH2 de una molécula IgG4 y un dominio CH3 de una molécula IgG1. Por ejemplo, la región o porción Fc puede comprender una porción de un dominio CH2 de una subclase particular de anticuerpo, por ejemplo, las posiciones de la UE 292-340 de un dominio CH2. Por ejemplo, una región o porción Fc puede comprender aminoácidos, posiciones 292-340 de CH2 derivadas de una porción IgG4 y la porción de CH2 derivado de una porción IgG1 (alternativamente, 292-340 de CH2 pueden derivarse de una porción IgG1 y la porción de CH2 derivado de una porción IgG4).

Además, una región Fc o una porción Fc puede (adicionalmente o alternativamente) comprender, por ejemplo, una región bisagra quimérica. Por ejemplo, la bisagra quimérica puede derivarse, por ejemplo, en parte, de una molécula IgG1, IgG2 o IgG4 (por ejemplo, una secuencia de bisagra media superior e inferior) y, en parte, de una molécula IgG3 (por ejemplo, una secuencia de bisagra media). En otro ejemplo, una región o porción Fc puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4. En otro ejemplo, la bisagra quimérica puede comprender dominios de bisagra superior e inferior de una molécula de IgG4 y un dominio de bisagra media de una molécula de IgG1. Tal bisagra quimérica se puede hacer, por ejemplo, introduciendo una sustitución de prolina (Ser228Pro) en la posición 228 de la UE en el dominio de bisagra central de una región de bisagra IgG4. En otra realización, la bisagra quimérica puede comprender aminoácidos en las posiciones de la UE 233-236 son de un anticuerpo IgG2 y/o la mutación Ser228Pro, en donde los aminoácidos restantes de la bisagra son de un anticuerpo IgG4 (por ejemplo, una bisagra quimérica del secuencia ESKYGPPCPPCPAPPVAGP). Bisagras quiméricas adicionales, que pueden usarse en la porción Fc del anticuerpo de acuerdo con la presente invención se describen en el documento US 2005/0163783 A1.

En la presente invención, se prefiere que la porción Fc, o la región Fc, comprenda o consista en una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de inmunoglobulina humana (por ejemplo, de una región Fc o porción Fc de una molécula de IgG humana). Sin embargo, los polipéptidos pueden comprender uno o más aminoácidos de otra especie de mamífero. Por ejemplo, una porción Fc de primates o un sitio de unión de primates puede incluirse en los polipéptidos sujetos. Alternativamente, uno o más aminoácidos murinos pueden estar presentes en la porción Fc o en la región Fc.

Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende, en particular además de una porción Fc como se describe anteriormente, otras partes derivadas de una región constante, en particular de una región constante de IgG, preferiblemente de una región constante de IgG1, más preferiblemente de una región constante de IgG1 humana. Más preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende, en particular además de una porción Fc como se describió anteriormente, todas las otras partes

de las regiones constantes, en particular todas las otras partes de las regiones constantes de IgG, preferiblemente todas las otras partes de las regiones constantes de IgG1, más preferiblemente todas las demás partes de las regiones constantes de IgG1 humana.

Las secuencias de regiones constantes particularmente preferidas son las secuencias de aminoácidos según las SEQ ID NO: 91 - 94 (codificadas, por ejemplo, por secuencias de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 95 - 98, respectivamente). Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de IgG1 CH1-CH2-CH3 está de acuerdo con la SEQ ID NO: 91 o una variante de secuencia funcional de la misma, como se describe en la presente. Incluso más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de IgG1 CH 1-CH2-CH3 está de acuerdo con la SEQ ID NO: 92 o una variante de secuencia funcional de la misma, como se describe en la presente, en la que se mantiene la mutación "LALA".

Como se describe anteriormente, un anticuerpo particularmente preferido de acuerdo con la presente invención comprende una región Fc (completa) derivada de IgG1 humana. Más preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende, en particular, además de una región Fc (completa) derivada de IgG1 humana, también todas las demás partes de las regiones constantes de IgG, preferiblemente todas las otras partes de las regiones constantes de IgG1, más preferiblemente todas las otras partes de las regiones constantes de IgG1 humana.

Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que la mejora dependiente de anticuerpos (ADE) de la infección por el virus del Zika se produce mediante la unión de la porción Fc del anticuerpo, en particular, la porción Fc de cadena pesada de una molécula de IgG, a un receptor Fc, por ejemplo, un receptor Fey en una célula hospedero. Por lo tanto, se prefiere que el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprenda una o más mutaciones en la porción Fc. Las mutaciones pueden ser cualquier mutación que reduzca la unión del anticuerpo a un receptor Fc (FcR), en particular reduce la unión del anticuerpo a un receptor Fey (FcγR). Por otro lado, se prefiere que el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprenda una porción Fc/región Fc (completa), en donde la interacción/unión con FcRn no se vea comprometida. Por consiguiente, se prefiere particularmente que el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprenda una o más mutaciones en la porción Fc, que (i) reduzca la unión del anticuerpo a un receptor Fey, pero no comprometer la interacción con FcRn. Un ejemplo de dicha mutación es la mutación "LALA" que se describe a continuación.

En general, la unión del anticuerpo a un receptor Fc puede evaluarse mediante varios métodos conocidos por el experto, como ELISA (Hessell AJ, Hangartner L, Hunter M, Havenith CEC, Beurskens FJ, Bakker JM, Lanigan CMS, Landucci G, Forthal DN, Parren PWHI, et al.: Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. Nature

2007, 449:101 -104; Grevys A, Bern M, Foss S, Bratlie DB, Moen A, Gunnarsen KS, Aase A, Michaelsen TE, Sandlie I, Andersen JT: Fc Engineering of Human IgG1 for Altered Binding to the Neonatal Fc Receptor Affects Fc Effector Functions. 2015, 194:5497-5508) or flow-cytometry (Perez LG, Costa MR, Todd CA, Haynes BF, Montefiori DC: Utilization of immunoglobulin G Fc receptors by human immunodeficiency virus type 1: a specific role for antibodies against the membrane-proximal external region of gp41. J Virol 2009, 83:7397-7410; Piccoli L, Campo I, Fregni CS, Rodriguez BMF, Minola A, Sallusto F, Luisetti M, Corti D, Lanzavecchia A: Neutralization and clearance of GM-CSF by autoantibodies in pulmonary alveolar proteinosis. Nat Commun 2015, 6:1-9).

10 En general, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede estar glicosilado. Los glicanos unidos a N unidos al dominio CH2 de una cadena pesada, por ejemplo, pueden influir en la unión de C1q y FcR, con anticuerpos aglicosilados que tienen menor afinidad por estos receptores. Por consiguiente, el dominio CH2 de la porción Fc del anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede comprender una o más mutaciones, 15 en las que un residuo glucosilado está sustituido por un residuo no glucosilado. La estructura del glucano también puede afectar la actividad, por ejemplo, pueden observarse diferencias en la muerte celular mediada por el complemento dependiendo del número de azúcares de galactosa (0, 1 o 2) en el extremo de la cadena biantenaria de un glucano. Preferiblemente, los glucanos del anticuerpo no conducen a una respuesta inmunogénica humana después de 20 la administración.

Además, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede modificarse mediante la introducción de mutaciones de aminoácidos aleatorias en una región particular del dominio CH2 o CH3 de cadena pesada para alterar su afinidad de unión por FcR y/o su vida media en suero en comparación a anticuerpos no modificados. Los ejemplos de tales 25 modificaciones incluyen, pero no se limitan a, sustituciones de al menos un aminoácido de la región constante de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 250, 314 y 428.

De manera particularmente preferible, la porción Fc de un anticuerpo de la invención comprende una sustitución en las posiciones CH2 4, CH2 5, o ambas. En general, el aminoácido en las posiciones 4 y 5 de CH2 de IgG1 y IgG3 de tipo salvaje es una leucina ("L"). 30 Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende un aminoácido en la posición CH2 4, CH2 5, o ambos, que no es una L. Más preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende una alanina ("A") en la posición CH2 4, o CH2 5, o ambos. Aún más preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende tanto una sustitución CH2 L4A como una sustitución CH2 L5A. Dichos anticuerpos se denominan en la presente una variante "LALA". Curiosamente, dicha mutación 35 "LALA" en la porción Fc no solo da como resultado una falta de contribución del anticuerpo

respectivo en la mejora dependiente de anticuerpos (ADE) de la infección por el virus del Zika, sino que también bloquea la mejora dependiente de anticuerpos (ADE) de Zika Infección vírica. Una secuencia de aminoácidos ejemplar de IgG1 CH1-CH2-CH3 que comprende la mutación "LALA" es de acuerdo con la SEQ ID NO: 92. Por consiguiente, la secuencia de aminoácidos de IgG1 CH1 -CH2-CH3 es preferiblemente de acuerdo con la SEQ ID NO: 92 o una variante de secuencia funcional de la misma, como se describe en la presente, en la que se mantiene la mutación "LALA". Aún más preferiblemente, el anticuerpo es del formato FIT-Ig descrito anteriormente que comprende una mutación "LALA" en la porción Fc como se describe en la presente.

10 Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención no comprende un sitio de unión para un receptor Fc. Más preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, no comprende una región Fc, incluso más preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, no comprende una porción Fc. Varios formatos de anticuerpos multiespecíficos sin la porción Fc se conocen en la técnica y se describen anteriormente.

Como se describió anteriormente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se une específicamente a (al menos dos) epítomos distintos en la proteína de envoltura del virus del Zika (proteína E del ZIKV). Más preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se une al dominio 20 III de la proteína de envoltura del virus del Zika (EDIII, también denominado "DIII"). En otras palabras, se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se una a un epítopo de la proteína de envoltura del virus del Zika, que incluye uno o más residuos de aminoácidos del dominio III de la proteína de envoltura del virus del Zika (EDIII) del ZIKV incluye un núcleo de nucleocápside, que 25 comprende ARN monocatenario envuelto por proteínas centrales. El núcleo de la nucleocápside está encapsulado por una membrana bicapa lipídica con "proteínas de membrana" y "proteínas de envoltura". La proteína de envoltura del ZIKV (proteína E) es el antígeno dominante. El ectodominio de la proteína de envoltura comprende tres dominios distintos: dominio de proteína EI (EDI), dominio de proteína EII (EDII) y dominio de proteína EIII (EDIII). El EDIII está altamente conservado entre diferentes cepas del ZIKV (ver FIGURA 8 para una alineación de secuencias de aminoácidos de EDIII de diferentes cepas del ZIKV). Los anticuerpos que se unen al dominio III de la proteína de envoltura del virus del Zika (EDIII) muestran (i) una mayor neutralización del ZIKV y (ii) una disminución de la reactividad cruzada con el DENV (en particular, esencialmente ninguna reactividad cruzada con el DENV) en 35 comparación con los anticuerpos que se unen al dominio I/II de la proteína de envoltura del virus del Zika (EDI/II).

Por consiguiente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se une

más preferiblemente al dominio III de la proteína de envoltura del virus del Zika (EDIII) con el EDIII que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 263):

TAAFTFTKXPAEXXHGTVTVEXQYXGXDGPCCKXPXQMAVDXQTLTPVGRLITANPVITEXTEN
SKMMLELDPPFGDSY1VIGXGXKKITHHWHRS

5 en donde X puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente). En otras palabras, se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se una a un epítipo de la proteína de envoltura del virus del Zika, que incluye uno o más residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 263.

También se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de
10 acuerdo con la presente invención se una al dominio III de la proteína de envoltura del virus del Zika (EDIII) con el EDIII que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 265):

X₁GX₂X₃YSLCTAAFTFTKX₄PAEX₅X₆HGTVTVEX₇QYX₈GX₉DGPCCKX₁₀PX₁₁QMAVDX₁₂QTLTP
VGRLITANPVITEX₁₃TX₁₄NSKMMLELDPPFGDSYIVIGX₁₅GX₁₆X₁₇KITHHWHRSG

15 en donde X₁ es un aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente K, A o E;

X₂ puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente V, F o L;

X₃ puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente S
20 o F;

X₄ puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente I o V;

X₅ puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente T o V;

25 X₆ puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente L o D;

X₇ puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente V o G;

30 X₈ puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente A o G;

X₉ puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente) excepto R, preferiblemente T o A;

X₁₀ puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente V o I;

35 X₁₁ puede ser cualquier amina (ácido natural), preferiblemente A o V;

X₁₂ puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente M o T;

X13 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente S o G;

X14 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente E o K;

5 X15 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente V o I;

X16 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente E, A, K o D; y

10 X17 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente E, A o K, más preferiblemente K o A.

En otras palabras, se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se una a un epítipo de la proteína de envoltura del virus del Zika, que incluye uno o más residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 265.

15 Por ejemplo, el EDIII se extiende del aminoácido 309 al aminoácido 403 de la proteína E del ZIKV de la cepa ZIKV H/PF/2013 (número de acceso de Genbank KJ776791). Por consiguiente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se une más preferiblemente al dominio III de la proteína de envoltura del virus del Zika (EDIII) con el EDIII que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 264):

20 TAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCVPAQMAVDMQTLTPVGRLITANPVITESTENSK
MMLELDPPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHS.

En otras palabras, se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se una a un epítipo de la proteína de envoltura del virus del Zika, que incluye uno o más residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 264.

25 Más preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se une a un epítipo de la proteína de envoltura del virus del Zika, que incluye uno o más residuos de aminoácidos de la cresta lateral (LR) del EDIII y/o uno o más residuos de aminoácidos de la región bisagra EDI-EDIII. La cresta lateral del EDIII y la región de bisagra EDI-EDIII son conocidas por la persona experta y se describen, por ejemplo, en Zhao, H., Fernandez, E., Dowd, K.A., Speer, S.D., Piatt, D.J., Gorman, M.J.,
30 Govero, J., Nelson, C.A., Pierson, T.C., Diamond, M.S., et al. (2016). Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. Cell 166(4):1016-27 and in Kostyuchenko VA, Lim EX, Zhang S, Fibriansah G, Ng TS, Ooi JS, Shi J, Lok SM. Structure of the thermally stable Zika virus. Nature. 2016 May 19;533(7603):425-8. Sin estar vinculado a ninguna teoría, se supone
35 que (i) la unión al LR puede inhibir la fusión al atrapar un estado de transición de fusión del virus y (ii) la unión a la bisagra del EDI-EDIII y EDIII puede dificultar el movimiento del EDIII a formar la estructura trimérica posterior a la fusión, deteniendo así la fusión de la membrana.

Por consiguiente, se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención (sea capaz de) inhibir (s) una etapa posterior a la unión del ZIKV. “Postadhesión” típicamente se refiere a cualquier etapa de la infección por el ZIKV después de la unión del ZIKV a la membrana celular (de la célula objetivo del ZIKV).

- 5 Por ejemplo, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención preferiblemente (es capaz de) prevenir la fusión de la membrana. Además, también se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención (sea capaz de) causar la (s) agregación (s) del ZIKV (partículas). Aún más preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención (es capaz de) (i) inhibir una etapa posterior a la
10 unión del ZIKV y (ii) causar la agregación del ZIKV (partículas).

- De manera particularmente preferible, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende al menos una CDR, preferiblemente las seis CDR, más preferiblemente una región variable, incluso más
15 preferiblemente ambas regiones variables (es decir, un sitio de unión a epítipo), en una especificidad particular, del anticuerpo humano ejemplificado ZKA190, que se une al EDIII del ZIKV (ref. Ejemplo 1, FIGURA 1). Las secuencias de aminoácidos de las CDR y las regiones variables de ZKA190, que preferiblemente están comprendidas en el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se
20 describen en las Tablas 1 y 2 a continuación.

- También se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se una a un epítipo cuaternario que se muestra en un virión infeccioso ZIKV. A pesar de la considerable actividad neutralizante, dichos anticuerpos generalmente no muestran una unión detectable a la proteína E del ZIKV recombinante o al EDIII del ZIKV en un ELISA estándar
25 (como se describe anteriormente), es decir, si se prueban *in vitro*, en particular en forma purificada (por ejemplo, la proteína E del ZIKV “fuera/sin” un virión, una partícula similar a un virus o similar). De este modo, “no unión detectable” típicamente significa que no se detectó EC_{50} hasta 10000 ng/ml en un ELISA estándar. En otras palabras, si la EC_{50} detectable en un ELISA estándar está por encima de 10000 ng/ml, se denomina “unión no detectable”.

- 30 Por lo tanto, dichos anticuerpos también se denominan en la presente anticuerpos “neutralizantes que no se unen a E” (NNB). El epítipo cuaternario que se muestra en un virión infeccioso del ZIKV es típicamente un epítipo conformacional. Por ejemplo, el epítipo cuaternario que se muestra en un virión infeccioso del ZIKV puede formarse en la interfaz de dos monómeros de proteínas de envoltura que forman un dímero (“epítipo de dímero de envoltura”; EDE) o puede formarse a través de dímeros vecinos (“epítipo de espina de
35 pescado”).

De manera particularmente preferible, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno

del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende al menos una CDR, preferiblemente las seis CDR, más preferiblemente una región variable, incluso más preferiblemente ambas regiones variables (es decir, un sitio de unión a epítipo), en una especificidad particular, del anticuerpo humano ejemplificado ZKA230, que se une a un epítipo cuaternario mostrado en un virión infeccioso del ZIKV (ref. Ejemplo 1, FIGURA 1). No se describen secuencias ácidas de CDR y regiones variables del ZKA230, que preferiblemente están comprendidas en el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, en las Tablas 1 y 2 a continuación.

También se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se una al dominio II de la proteína de envoltura del virus del Zika (EDII). El EDII es un dominio alargado similar a un dedo que contiene un bucle de fusión conservado que interactúa con la membrana endosómica de la célula hospedero que se extiende aproximadamente desde la posición de aminoácidos 52 hasta la posición de aminoácidos 132 y aproximadamente desde la posición de aminoácidos 193 hasta la posición de aminoácidos 280 de la proteína E del ZIKV (Dai L, Song J, Lu X, Deng YQ, Musyoki AM, Cheng H, Zhang Y, Yuan Y, Song H, Haywood J, Xiao H, Yan J, Shi Y, Qin CF, Qi J, Gao GF. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. Cell Host Microbe. 11 Mayo 2016; 19(5):696-704.

De manera particularmente preferible, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende al menos una CDR, preferiblemente las seis CDR, más preferiblemente una región variable, incluso más preferiblemente ambas regiones variables (es decir, un sitio de unión a epítipo), en una especificidad particular, del anticuerpo humano ejemplificado ZKA185, que se une a el EDII del ZIKV. Las secuencias de aminoácidos de las CDR y las regiones variables de ZKA185, que preferiblemente están comprendidas en el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se describen en las Tablas 1 y 2 a continuación.

Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención (i) se une al dominio III de la proteína de envoltura del virus del Zika (EDIII) y (ii) se une al dominio II de la proteína de envoltura del virus del Zika (EDII). En otras palabras, se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprenda (i) un sitio de unión al epítipo, que se une específicamente al dominio III de la proteína de envoltura del virus del Zika (EDIII), y (ii) un sitio de unión del epítipo, que se une específicamente al dominio II de la proteína de envoltura del virus del Zika (EDII). Como se describió anteriormente, se prefiere que el dominio III de la proteína de envoltura del virus del Zika comprenda o consista en una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 263 o 265, en particular como se establece

en SEQ ID NO: 264. Además, como se describió anteriormente, también se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se una a un epítipo de la proteína de envoltura del virus del Zika, que incluye uno o más residuos de aminoácidos de la cresta lateral (LR) del EDIII y/o uno o más residuos de aminoácidos de la región bisagra del EDI-EDIII. En otras palabras, el sitio de unión del epítipo dirigido al EDIII se une preferiblemente a uno o más residuos de aminoácidos del borde lateral (LR) del EDIII y/o uno o más residuos de aminoácidos de la región bisagra del EDI-EDIII.

También se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención (i) se una al dominio III de la proteína de envoltura del virus del Zika (EDIII) y (ii) se una a un epítipo cuaternario mostrado en un virión infeccioso del ZIKV. En otras palabras, se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprenda (i) un sitio de unión al epítipo, que se une específicamente al dominio III de la proteína de envoltura del virus del Zika (EDIII), y (ii) un sitio de unión del epítipo, que se une específicamente a un epítipo cuaternario que se muestra en un virión infeccioso del ZIKV. Como se describió anteriormente, se prefiere que el dominio III de la proteína de envoltura del virus del Zika comprenda o consista en una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 263 o 265, en particular como se establece en SEQ ID NO: 264. Además, como se describió anteriormente, también se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se una a un epítipo de la proteína de envoltura del virus del Zika, que incluye uno o más residuos de aminoácidos de la cresta lateral (LR) del EDIII y/o uno o más residuos de aminoácidos de la región bisagra del EDI-EDIII. En otras palabras, el sitio de unión del epítipo dirigido al EDIII se une preferiblemente a uno o más residuos de aminoácidos del borde lateral (LR) del EDIII y/o uno o más residuos de aminoácidos de la región bisagra del EDI-EDIII.

En general, un único sitio de unión al epítipo (también denominado “parátipo” o “receptor de antígeno”) del anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende preferiblemente tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) en una cadena y (al menos) tres CDR en una cadena ligera. En general, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son las regiones hipervariables presentes en los dominios variables de cadena pesada y los dominios variables de la cadena ligera. Típicamente, las CDR de una cadena pesada y la cadena ligera conectada de un anticuerpo juntas forman el receptor de antígeno (sitio de unión al epítipo). Por lo general, los tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) se organizan de forma no consecutiva en el dominio variable. Dado que los sitios de unión al epítipo están compuestos típicamente por dos dominios variables (por ejemplo, en dos cadenas de polipéptidos diferentes, es decir, la cadena pesada y la cadena ligera), hay seis CDR para cada sitio de unión al epítipo (cadena pesada: CDRH1, CDRH2 y CDRH3; cadena ligera: CDRL1, CDRL2 y CDRL3). Las CDR en la

cadena pesada y/o ligera pueden estar separadas por regiones marco, por lo que una región marco (FR) es una región en el dominio variable que es menos “variable” que la CDR. Por ejemplo, una cadena (o cada cadena, respectivamente) puede estar compuesta por cuatro regiones marco, separadas por tres CDR.

- 5 Se determinaron las secuencias de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de varios anticuerpos anti-proteína E del ZIKV humanos ejemplificados, que comprenden tres CDR diferentes en la cadena pesada y tres CDR diferentes en la cadena ligera (ref. Tablas 1 y 2 a continuación). La posición de los aminoácidos CDR se define de acuerdo con el sistema de numeración IMGT (IMGT: <http://www.imgt.org/>; ref. Lefranc, M.-P. et al. (2009) Nucleic
- 10 Acids Res. 37, D1006-D1012). Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende al menos una CDR de los siguientes anticuerpos ejemplificados. Más preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende las seis CDR (de un sitio de unión a epítipo) de los siguientes anticuerpos ejemplificados. Incluso más
- 15 preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende la región variable de cadena pesada (VH) y la región variable de cadena ligera (VL) de los siguientes anticuerpos ejemplificados.

La Tabla 1 muestra las SEQ ID NO de las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y de la región variable de cadena pesada (denominada “VH”) de anticuerpos ejemplares:

20

Nombre del anticuerpo	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VH
ZKA190	1	2	3	8
ZKA185	19	20	21	26
25 ZKA230	37	38	39	44
ZKA78	55	56	57	62
ZKA64	73	74	75	80
ZKA3	99	100	101	102
30 ZKA4	103	104	105	106
ZKA5	107	108	109	110
ZKA6	111	112	113	114
ZKA7	115	116	117	118
ZKA8	119	120	121	122
35 ZKA76	123	124	125	126
ZKA117	127	128	129	130
ZKB27	131	132	133	134

5	ZKB29	135	136	137	138
	ZKB34	139	140	141	142
	ZKB39	143	144	145	146
	ZKB46	147	148	149	150
	ZKB53	151	152	153	154
10	ZKC26	155	156	157	158
	ZKD5	159	160	161	162
	ZKD7	163	164	165	166
	ZKD8	167	168	169	170
	ZKD15	171	172	173	174
15	ZKD16	175	176	177	178
	ZKD17	179	180	181	182
	ZKD20	183	184	185	186
	ZKA134	187	188	189	190
	ZKA246	191	192	193	194
20	ZKA256	195	196	197	198
	ZKB42	199	200	201	202
	ZKB85	203	204	205	206
	ZKB47	207	208	209	210
	ZKC6	211	212	213	214
25	ZKA160	215	216	217	218
	ZKA172	219	220	221	222
	ZKA174	223	224	225	226
	ZKA189	227	228	229	230
	ZKA195	231	232	233	234
30	ZKA215	235	236	237	238
	ZKA218	239	240	241	242
	ZKB75	243	244	245	246
	ZKB83	247	248	249	250
	ZKC3	251	252	253	254
35	ZKC18	255	256	257	258
	ZKD1	259	260	261	262

La Tabla 2 a continuación muestra las SEQ ID NO de las secuencias de aminoácidos de las CDR de la cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3) y de la región variable de la cadena ligera (denominada “VL”) de anticuerpos ejemplares:

Nombre del anticuerpo	CDRL1	CDRL2	CDRL2 larga	CDRL3	VL
ZKA190	4	5	6	7	9
ZKA185	22	23	24	25	27
ZKA230	40	41	42	43	45
ZKA78	58	59	60	61	63
ZKA64	76	77	78	79	81

Por lo tanto, se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprenda secuencias de aminoácidos que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con al menos una de las secuencias CDR, la secuencia VH y/o la secuencia VL que se muestra en la Tabla 1 y/o en la Tabla 2.

Se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprenda una cadena pesada que comprenda al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprenda al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde al menos una CDR, preferiblemente la al menos una CDRH3 de cadena pesada, comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 75, 39, 21, 57, 101, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 141, 145, 149, 153, 157, 161, 165, 169, 173, 177, 181, 185, 189, 193, 197, 201, 205, 209, 213, 217, 221, 225, 229, 233, 237, 241, 245, 249, 253, 257 y 261, o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene en al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde al menos una CDR, preferiblemente la al menos una CDRH3 de cadena pesada, comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 21 y 39, 57 y 75 o un variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, identidad de secuencia de al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%. Más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del

5 mismo, de acuerdo con la presente invención comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde al menos una CDR, preferiblemente la al menos una CDRH3 de cadena pesada, comprende o
 5 consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 21 y 39 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

10 También se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprenda una cadena pesada que comprenda al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprenda al menos una CDRL1, en al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde
 15 al menos una CDR, preferiblemente la al menos una CDRH3 de cadena pesada, comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 21 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 39; o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

20 Aún más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde al menos una CDR, preferiblemente la al menos una CDRH3 de cadena pesada, comprende o
 25 consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de
 30 acuerdo con la presente invención comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde

(i) la al menos una CDRH1 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 19, 37, 55, 73, 99, 103, 107,
 35 111, 115, 119, 123 127, 131, 135, 139, 143, 147, 151, 155, 159, 163, 167, 171, 175, 179, 183, 187, 191, 195, 199, 203, 207, 211, 215, 219, 223, 227, 231, 235, 239, 243, 247, 251, 255 y 259, o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos

75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) la al menos una CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 20, 38, 56, 74, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 88, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 216, 220, 224, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256 y 260, o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) la al menos una CDRH3 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 21, 39, 57, 75, 101, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 141, 145, 149, 153, 157, 161, 165, 169, 173, 177, 181, 185, 189, 193, 197, 201, 205, 209, 213, 217, 221, 225, 229, 233, 237, 241, 245, 249, 253, 257 y 261, o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Aún más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, en al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde

(i) la al menos una CDRH1 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 19, 37, 55 y 73 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) la al menos una CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 20, 38, 56 y 74 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) la al menos una CDRH3 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 21, 39, 57 y 75 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Incluso más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, en al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde

5 (i) la al menos una CDRH1 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 19 y 37 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

10 (ii) la al menos una CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 20 y 38 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

15 (iii) la al menos una CDRH3 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 21 y 39 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

20 Aún más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde

(i) la al menos una CDRH1 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 73; o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

25 (ii) la al menos una CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 74; o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

30 (iii) la al menos una CDRH3 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 75; o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

También se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprenda una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde

(i) la al menos una CDRH1 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 19 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 37; o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) la al menos una CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 38; o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) la al menos una CDRH3 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 21 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 39; o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Aún más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde

(i) la al menos una CDRH1 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) la al menos una CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) la al menos una CDRH3 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%,

al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

También se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprenda una cadena pesada que comprenda al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprenda al menos una CDRL1, en al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde

(i) la al menos una CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 22, 40, 58 y 76 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) la al menos una CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 6, 23, 24, 41, 42, 59, 60, 77 y 78 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) la al menos una CDRL3 de amino comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 25, 43, 61 y 79 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde

(i) la al menos una CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 22 y 40 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) la al menos una CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 6, 23, 24, 41 y 42, o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% identidad de secuencia; y/o

(iii) el al menos una CDRL3 de amino comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 25 y 43 o una variante de secuencia funcional

del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

5 Incluso más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde

10 (i) la al menos una CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 76; o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

15 (ii) la al menos una CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 6, 77 y 78 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

20 (iii) la al menos una CDRL3 de amino comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 79; o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

25 También se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprenda una cadena pesada que comprenda al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprenda al menos una CDRL1, en al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde

30 (i) la al menos una CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 40; o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

35 (ii) la al menos una CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 24, 41 y 42 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) la al menos una CDRL3 de amino comprende una secuencia de aminoácidos de

acuerdo con la SEQ ID NO: 25 o de acuerdo con la SEQ ID NO: 43; o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

5 Aún más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3 y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos una CDRL3, en donde

(i) la al menos una CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con
10 la SEQ ID NO: 4 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) la al menos una CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con
15 la SEQ ID NO: 5 o 6, o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, identidad de secuencia de al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%; y/o

(iii) la al menos una CDRL3 de amino comprende una secuencia de aminoácidos de
20 acuerdo con la SEQ ID NO: 7 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de
25 acuerdo con la presente invención, comprende las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 (i) de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 - 3; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) de acuerdo con la SEQ ID NO: 19
30 - 21; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 37 - 39; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos
35 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iv) de acuerdo con las SEQ ID NO: 55 - 57; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al

menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxvi) de acuerdo con las SEQ ID NO: 179 - 181; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxvii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 183 - 185; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxviii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 187 - 189; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxix) según las SEQ ID NO: 191 - 193; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxx) de acuerdo con las SEQ ID NO: 195 - 197; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxi) según las SEQ ID NO: 199 - 201; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxii) según las SEQ ID NO: 203 - 205; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxiii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 207 - 209; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxiv) de acuerdo con las SEQ ID NO: 211 - 213; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxv) de acuerdo con las SEQ ID NO: 215 - 217; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxvi) de acuerdo con las SEQ ID NO: 219 - 221; o variantes de

secuencia funcional teniendo al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al
 menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al
 menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxvii) de acuerdo con las SEQ ID
 NO: 223 - 225; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al
 5 menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al
 menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de
 secuencia; (xxxviii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 227 - 229; o variantes de secuencia
 funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos
 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos
 10 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxix) de acuerdo con las
 SEQ ID NO: 231 - 233; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos
 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos
 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de
 identidad de secuencia; (xl) de acuerdo con las SEQ ID NO: 235 - 237; o variantes de
 15 secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%,
 al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%,
 al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xli) según las SEQ
 ID NO: 239 - 241; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%,
 al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%,
 20 al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de
 secuencia; (xlii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 243 - 245; o variantes de secuencia funcional
 de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al
 menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al
 menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xliii) de acuerdo con las SEQ ID NO:
 25 247 - 249; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al
 menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al
 menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de
 secuencia; (xliv) de acuerdo con las SEQ ID NO: 251 - 253; o variantes de secuencia funcional
 de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al
 30 menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al
 menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xlv) de acuerdo con las SEQ ID NO:
 255 - 257; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al
 menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al
 menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de
 35 secuencia; o (xlvi) de acuerdo con las SEQ ID NO: 259 - 261; o variantes de secuencia
 funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos
 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos

97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Por consiguiente, también se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprenda secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y secuencias de aminoácidos CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con las SEQ ID NO : 1 - 5 y 7; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 - 4 y 6 - 7; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 19 - 23 y 25; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iv) de acuerdo con las SEQ ID NO: 19 - 22 y 24 - 25; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (v) de acuerdo con las SEQ ID NO: 37-41 y 43; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (vi) de acuerdo con las SEQ ID NO: 37 - 40 y 42 - 43; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (vii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 55 - 59 y 61; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (viii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 55 - 58 y 60 - 61; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ix) de acuerdo con las SEQ ID NO: 73 - 77 y 79; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (x) de acuerdo con las SEQ ID NO: 73 - 76 y 78 - 79; o variantes de secuencia funcional de las mismas que

tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y las secuencias de aminoácidos CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 - 5 y 7; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 - 4 y 6 - 7; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 19 - 23 y 25; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iv) de acuerdo con las SEQ ID NO: 19 - 22 y 24 - 25; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (v) de acuerdo con las SEQ ID NO: 37 - 41 y 43; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (vi) de acuerdo con las SEQ ID NO: 37 - 40 y 42 - 43; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia (vii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 73 - 77 y 79; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (viii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 73 - 76 y 78 - 79; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Incluso más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y las secuencias de aminoácidos CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de

acuerdo con las SEQ ID NO: 1 - 5 y 7; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 - 4 y 6 - 7; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 73 - 77 y 79; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (iv) de acuerdo con las SEQ ID NO: 73 - 76 y 78 - 79; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

También se prefiere que, preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprenda las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y secuencias de aminoácidos CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con la SEQ ID NO: 19 - 23 y 25; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 19 - 22 y 24 - 25; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 37 - 41 y 43; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (vi) de acuerdo con las SEQ ID NO: 37 - 40 y 42 - 43; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Aún más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y secuencias de aminoácidos CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 - 5 y 7; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos

90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (ii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 - 4 y 6 - 7; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

También se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, como se describe anteriormente, comprenda secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y secuencias de aminoácidos CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con la SEQ ID NO: 19 - 23 y 25; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (ii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 19 - 22 y 24 - 25; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Aún más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende

(a) un primer sitio de unión a epítipo que comprende las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y secuencias de aminoácidos CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 - 5 y 7; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (ii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 - 4 y 6 - 7; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y

(b) un segundo sitio de unión al epítipo que comprende las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y secuencias de aminoácidos CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con las SEQ ID NO: 19 - 23 y 25; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (ii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 19 - 22 y 24 - 25; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de

secuencia.

También se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención como se describe anteriormente, comprenda las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y las secuencias de aminoácidos CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con la SEQ ID NOs: 37 - 41 y 43; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (ii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 37 - 40 y 42 - 43; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende

(a) un primer sitio de unión al epítipo que comprende las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y secuencias de aminoácidos CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 - 5 y 7; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (ii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 - 4 y 6 - 7; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y

(b) un segundo sitio de unión al epítipo que comprende las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y las secuencias de aminoácidos CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con las SEQ ID NO: 37 - 41 y 43; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (ii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 37-40 y 42-43; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Además, también se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprenda una región variable de cadena pesada (VH) y, opcionalmente, una región variable de cadena ligera (VL), en donde la región

variable de cadena pesada (VH) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 8, 26, 44, 62, 80, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142, 146, 150, 154, 158, 162, 166, 170, 174, 178, 182, 186, 190, 194, 198, 202, 206, 210, 214, 218, 222, 226, 230, 234, 238, 242, 246, 250, 254, 258 y 262; o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Además, también se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprenda (i) una secuencia de aminoácido de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 8 o una variante de secuencia funcional teniendo al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 9 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% identidad de secuencia; (ii) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 26 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 27 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 44 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 45 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iv) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 62 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al

- menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 63 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (v) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 80 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 81 o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.
- Más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende (i) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 8 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 9 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 26 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 27 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 44 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena

ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 45 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (iv) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 80 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 81 o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Incluso más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende (i) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 8 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 9 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (ii) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 80 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 81 o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

También se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprenda (i) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 26 o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una

secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 27 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (ii) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 44 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 45 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Aún más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 8 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 9 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

También se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, como se describe anteriormente, comprenda una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 26 o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 27 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Aún más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, como se describe anteriormente, comprende

(a) un primer sitio de unión al epítipo que comprende una secuencia de

- aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 8 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una
- 5 secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 9 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y
- 10 (b) un segundo sitio de unión del epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 26 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una
- 15 secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 27 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.
- 20 También se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención como se describe anteriormente, comprenda una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 44 o una variante de secuencia funcional del mismo que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos al menos 98% o al menos 99% de
- 25 identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 45 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o
- 30 al menos 99% de identidad de secuencia.
- Más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención como se describe anteriormente, comprende
- (a) un primer sitio de unión al epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 8 o
- 35 una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una

secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 9 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y

(b) un segundo sitio de unión al epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 44 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 45 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

De manera particularmente preferible, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención está en el formato Fabs en tándem Ig (FIT-Ig) y el Fab externo del formato FIT-Ig comprende un sitio de unión al epítipo que comprende las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y las secuencias de aminoácidos CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 - 5 y 7; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (ii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 - 4 y 6 - 7; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia. Más preferiblemente, el Fab externo del formato FIT-Ig comprende un sitio de unión al epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 8 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 9 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia. Incluso más preferiblemente, el Fab interno del formato FIT-Ig comprende un sitio de unión al

- epítopo que comprende las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y secuencias de aminoácidos CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con las SEQ ID NO: 19 - 23 y 25; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (ii) de acuerdo con las SEQ ID NO: 19 - 22 y 24 - 25; o variantes de secuencia funcional de las mismas que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia. Aún más preferiblemente, el Fab interno del formato FIT-Ig comprende un sitio de unión al epítopo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de acuerdo con la SEQ ID NO: 26 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VL) de acuerdo con la SEQ ID NO: 27 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.
- Preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención es para uso como medicamento. En otras palabras, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención puede usarse en la preparación de un medicamento. Más preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención es para uso en la prevención y/o tratamiento de la infección por el virus del Zika. En otras palabras, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, puede usarse en la preparación de un medicamento o en la prevención y/o tratamiento de la infección por el virus del Zika. Este aspecto se describe con más detalle a continuación.
- Moléculas de ácido nucleico**
- En otro aspecto, la invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un polinucleótido que codifica el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención como se describe anteriormente o un fragmento del mismo, en donde el fragmento comprende al menos una CDR de el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo.

Una molécula de ácido nucleico es una molécula que comprende, preferiblemente que consiste en componentes de ácido nucleico. El término molécula de ácido nucleico se refiere

preferiblemente a moléculas de ADN o ARN. En particular, se usa como sinónimo del término “polinucleótido”. Preferiblemente, una molécula de ácido nucleico es un polímero que comprende o consiste en monómeros de nucleótidos que están unidos covalentemente entre sí por enlaces fosfodiéster de una cadena principal de azúcar/fosfato. El término “molécula de ácido nucleico” también abarca moléculas de ácido nucleico modificadas, tales como moléculas de ADN o ARN modificadas en base, modificadas con azúcar o modificadas en la cadena principal, etc.

En la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el fragmento codificado del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención comprende al menos una CDR del anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo. Las Tablas 1 y 2 proporcionan los números de SEQ ID para las secuencias de aminoácidos de las CDR y VH y VL de anticuerpos ejemplares de acuerdo con la presente invención. Por consiguiente, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprende preferiblemente un polinucleótido que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos mostradas en las Tablas 1 y 2. Preferiblemente, el fragmento codificado del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención comprende tres CDR, más preferiblemente las tres CDR de cadena pesada de un sitio de unión a epítipo (CDRH1, CDRH2, CDRH3) y/o tres CDR de cadena ligera de un sitio de unión de epítipo (CDRL1, CDRL2, CDRL3). Por consiguiente, se prefiere que el fragmento codificado del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprenda (exactamente) tres o seis CDR. Por consiguiente, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprende preferiblemente un polinucleótido que codifica tres o seis de las secuencias de aminoácidos de CDR mostradas en las Tablas 1 y 2, en particular las secuencias correspondientes de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y/o CDRL1, CDRL2, y secuencias CDRL3. Más preferiblemente, el fragmento codificado del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región variable, por ejemplo, una región variable de cadena pesada (VH) y/o una región variable de cadena ligera (VL). Por consiguiente, se prefiere que el fragmento codificado del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprenda (exactamente) una o dos regiones variables. Por consiguiente, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprende preferiblemente un polinucleótido que codifica una o dos de las secuencias de aminoácidos de la región variable mostradas en las Tablas 1 y 2. Aún más preferiblemente, el fragmento codificado del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una cadena polipeptídica (completa) del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención. Tal cadena de polipéptidos (completa) puede ser, por ejemplo, una cadena pesada (completa) o una cadena ligera (completa). Sin embargo, dicha cadena de polipéptidos (completa) también puede comprender elementos de cadena pesada y

ligera, lo que se conoce en la técnica para muchos formatos de anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, cadenas de polipéptidos que comprenden regiones constantes de cadena pesada, pero también, por ejemplo, además de una o más regiones variables de cadena pesada, una región variable de cadena ligera).

5 La molécula de ácido nucleico puede ser mono, bi o multicistrónica, como tricistrónica. Una molécula de ácido nucleico bicistrónica o multicistrónica es típicamente una molécula de ácido nucleico que típicamente puede tener dos (bicistrónico) o más (multicistrónico) marcos de lectura abiertos (ORFs). Un marco de lectura abierto en este contexto es una secuencia de codones que se puede traducir en un péptido o proteína. De manera más general, la molécula
10 de ácido nucleico de la presente invención contiene al menos un polinucleótido que codifica al menos un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención. Si más la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprende más de un polinucleótido codificante, el segundo, tercer etc. polinucleótido codificante puede codificar otros péptidos/proteínas y/o codificar anticuerpos,
15 por ejemplo de acuerdo con la presente invención, o fragmentos de la misma también, que pueden ser iguales o distintos de la primera región de codificación de anticuerpos. En una modalidad preferida, la molécula de ácido nucleico de la invención contiene al menos dos polinucleótidos codificantes, por ejemplo (exactamente) dos o tres polinucleótidos codificantes, todos ellos codifican anticuerpos idénticos o distintos o fragmentos o variantes de los mismos.
20 Por ejemplo, distintos fragmentos de un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, pueden estar codificados por diferentes polinucleótidos en la misma molécula de ácido nucleico. En otra modalidad más de la presente invención, una molécula de ácido nucleico de la invención puede codificar más de un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo dentro de la misma región de codificación. En
25 resumen, la molécula de ácido nucleico de la invención puede ser mono, bi o multicistrónica.

Por ejemplo, en una modalidad preferida, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención puede ser un anticuerpo de cadena sencilla. En este caso, se prefiere que la cadena única completa del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo esté codificado por un único polinucleótido. Por consiguiente,
30 se prefiere que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención sea monocistrónica, en particular puede comprender un (único) polinucleótido que codifica el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención.

También se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo,
35 de acuerdo con la presente invención, comprenda (exactamente) dos cadenas de polipéptidos distintas, tales como, por ejemplo, una cadena pesada y una cadena ligera. Esto puede ilustrarse con una molécula de IgG nativa clásica, que comprende dos cadenas pesadas

idénticas y dos cadenas ligeras idénticas y, por lo tanto, dos cadenas de polipéptidos distintas (aunque el anticuerpo finalmente comprende cuatro cadenas de polipéptidos, pueden estar codificadas por dos polinucleótidos (distintas)). Preferiblemente, tales dos cadenas de polipéptidos distintas (por ejemplo, una cadena pesada y una cadena ligera) del anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, pueden estar codificadas por dos polinucleótidos distintos, que pueden estar ubicados en el mismo núcleo molécula de ácido, por ejemplo en una molécula de ácido nucleico bicistrónico, o en (exactamente dos) moléculas de ácido nucleico distintas (por ejemplo, cada molécula de ácido nucleico puede ser monocistrónica). Por consiguiente, se prefiere que la molécula de ácido nucleico, de acuerdo con la presente invención, sea bicistrónica, en particular puede comprender (exactamente) dos polinucleótidos que codifican (juntos) el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención. También se prefiere que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, comprenda (al menos o exactamente) un polinucleótido que codifica un fragmento del anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, como se describe anteriormente (por ejemplo, una (completa) cadena polipeptídica). Por consiguiente, se prefiere que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención sea monocistrónica. Además, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, puede estar codificado por una pluralidad de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, monocistrónicas). Por ejemplo, un anticuerpo que comprende dos cadenas de polipéptidos distintas puede estar codificado por dos polinucleótidos ubicados en dos moléculas de ácido nucleico distintas.

También se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprenda (exactamente) tres cadenas de polipéptidos distintas. Por consiguiente, se prefiere que la molécula de ácido nucleico sea tricistrónica (por ejemplo, que codifica las tres cadenas de polipéptidos comprendidas en dicho anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención). Sin embargo, también se prefiere que la molécula de ácido nucleico sea mono o bicistrónica, por ejemplo, que codifique una o dos cadenas de polipéptidos comprendidas en dicho anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, una pluralidad de moléculas de ácido nucleico, tales como dos o tres moléculas de ácido nucleico, puede codificar (en conjunto) el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención.

Por ejemplo, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, está particularmente preferiblemente en el formato Fabs en tándem Ig (FIT-Ig), que generalmente comprende las siguientes tres cadenas de polipéptidos:

- Polipéptido 1 que comprende o que consiste en la cadena ligera del Fab externo y la cadena pesada del Fab interno que incluye los dominios constantes CH1-CH2-CH3, preferiblemente con la mutación “LALA” como se describió anteriormente, en donde preferiblemente la cadena ligera de Fab externo está fusionado, preferiblemente sin conectores, con el extremo N de cadena pesada del Fab interno;
- Polipéptido 2 que comprende o consiste en la cadena pesada del Fab externo (VH y CH1 del Fab externo); y
- Polipéptido 3 que comprende o consiste en la cadena ligera del Fab interno.

En consecuencia, dicho FIT-Ig puede estar codificado preferiblemente por una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, tricistrónica), por tres moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, monocistrónica) o por dos moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico monocistrónica, una bicistrónica).

Por consiguiente, se prefiere que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, comprenda un polinucleótido que codifica el polipéptido 1 de un anticuerpo FIT-Ig de acuerdo con la presente invención. Más preferiblemente, la molécula de ácido nucleico no comprende polinucleótidos que codifican el polipéptido 2 o el polipéptido 3 del anticuerpo FIT-Ig de acuerdo con la presente invención. Dicha molécula de ácido nucleico es preferiblemente monocistrónica.

También se prefiere que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, comprenda un polinucleótido que codifica el polipéptido 2 de un anticuerpo FIT-Ig de acuerdo con la presente invención. Más preferiblemente, la molécula de ácido nucleico no comprende polinucleótido que codifica el polipéptido 1 o el polipéptido 3 del anticuerpo FIT-Ig de acuerdo con la presente invención. Dicha molécula de ácido nucleico es preferiblemente monocistrónica.

También se prefiere que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, comprenda un polinucleótido que codifica el polipéptido 3 de un anticuerpo FIT-Ig de acuerdo con la presente invención. Más preferiblemente, la molécula de ácido nucleico no comprende polinucleótidos que codifican el polipéptido 1 o el polipéptido 2 del anticuerpo FIT-Ig de acuerdo con la presente invención. Dicha molécula de ácido nucleico es preferiblemente monocistrónica.

También se prefiere que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, comprenda un polinucleótido que codifica el polipéptido 1 y un polinucleótido que codifica el polipéptido 2 de un anticuerpo FIT-Ig de acuerdo con la presente invención. Más preferiblemente, la molécula de ácido nucleico no comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido 3 del anticuerpo FIT-Ig de acuerdo con la presente invención. Dicha molécula de ácido nucleico es preferiblemente bicistrónica.

También se prefiere que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, comprenda un polinucleótido que codifica el polipéptido 1 y un polinucleótido que codifica el polipéptido 3 de un anticuerpo FIT-Ig de acuerdo con la presente invención. Más preferiblemente, la molécula de ácido nucleico no comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido 2 del anticuerpo FIT-Ig de acuerdo con la presente invención. Dicha molécula de ácido nucleico es preferiblemente bicistrónica.

También se prefiere que la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, comprenda un polinucleótido que codifica el polipéptido 2 y un polinucleótido que codifica el polipéptido 3 de un anticuerpo FIT-Ig de acuerdo con la presente invención. Más preferiblemente, la molécula de ácido nucleico no comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido 1 del anticuerpo FIT-Ig de acuerdo con la presente invención. Dicha molécula de ácido nucleico es preferiblemente bicistrónica.

De manera particularmente preferible, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido 1, un polinucleótido que codifica el polipéptido 2 y un polinucleótido que codifica el polipéptido 3 de un anticuerpo FIT-Ig de acuerdo con la presente invención. Dicha molécula de ácido nucleico es preferiblemente tricistrónica.

En general, la molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ADN o una molécula de ARN. Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico y/o polinucleótidos incluyen, por ejemplo, un polinucleótido recombinante, un vector, un oligonucleótido, una molécula de ARN como un ARNr, un ARNm, un ARNmi, un ARNsi o un ARNt, o una molécula de ADN como un ADNc. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico es un plásmido de ADN o una molécula de ARNm.

Un plásmido de ADN es una molécula de ADN circular, preferiblemente de doble cadena.

La Tabla 3 a continuación proporciona los números de SEQ ID para secuencias de ácido nucleico ejemplares que codifican las CDR y VH y VL de anticuerpos ejemplares de acuerdo con la presente invención. Debido a la redundancia del código genético, la presente invención también comprende variantes de secuencia de estas secuencias de ácido nucleico y, en particular, tales variantes de secuencia, que codifican las mismas secuencias de aminoácidos.

La Tabla 3 muestra secuencias de ácido nucleico ejemplares de las CDR y la región variable de cadena pesada (VH) y la región variable de cadena ligera (VL) de cinco anticuerpos ejemplares ("ZKA190", "ZKA64", "ZKA230", "ZKA185", "ZKA78"):

5

10

15

20

25

30

35

ZKA190	SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
CDRH1	10	ggattcaccttcagtaa atattggc
CDRH2	11	atatcatatgaggg aagtaataaa
CDRH3	12	gcgaaatcg gggacccaataactatgatactactggttatg agtataggggtttggaatactttggctac
CDRL1	13	cagagtg tttagtagcagttac
CDRL2	14	gatgcatcc
CDRL2 largo	15	ctcatctat gatgcatcc agcagggcc
CDRL3	16	cagcagtatggtaggtcaaggtggaca
VH	17	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagc ctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctct ggatt caccttcagtaa atattggcatgcactgggtccgccaggct ccaggcaaggggctggagtgggtggcagtt atatcatatg aggggaagtaataa atattatgcagactccgtgaagggccg attcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat ctgcaaataaacagcctgagagctgaggacacggcagtg attactgt gcgaaatcg gggacccaataactatgatactac

5

10

15

20

25

30

35

		tggttatgagtataggggtttggaatactttggctactgg ggccaggggaaccctggtcaccgtctcctcag
VL	18	gaaattgtgttgacgcagtcctccaggcaccctgtctttgt ctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagt ca gagtgttagtagcagttact tagcctggtaccagcagaaa cgtggccaggctcccaggctcctcatctat gatgcatcca gcagggccactggcatcccagacaggttcagtggcagtgg gtctgggacagacttcactctcaccatcagcagactggag cctgaagatTTTgcagtgtattactgt cagcagtatggta ggtcaaggtggacatt cggccaagggaccaaggtggaaat caaac
ZKA185	SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
CDRH1	28	ggatatagttttaccagttactgg
CDRH2	29	tttgatcctagtgactctcaaacc
CDRH3	30	gcgagaagatatattgtagtagtagtagttgttatgtggaca at
CDRL1	31	gcattgccaaataaattt
CDRL2	32	gaggacaac
CDRL2 largo	33	gtcatctat gaggacaac aaacgaccc
CDRL3	34	tactcaacagacagcagttctaatcccctgggagta
VH	35	gaagtgcagctggtgcagtcaggagcagaggtgaaaaagc ccggggagtctctgaggatctcctgtaagggttct ggata tagttttaccagttactgg atcacctgggtgcgccagatg ccgggaaaggcctggagtggatggcgaag tttgatccta gtgactctcaaacca actacagcccgtccttccaaggcca cgtcaccatctcagttgacaagtccatcagcactgcctac ttgcagtggagcagcctgaaggcctcggacaccgcatgt attactgt gcgagaagatatattgtagtagtagtagttgta

5

10

15

20

25

30

35

		tgtggacaat tggggccagggaaccctggtcaccatcttc tcag
VL	36	tcctatgagctgacacagccaccctcgggtgtcagtgtccc caggacaaacggccaggatcacctgctctggagat gcatt gccaaataaattt gcttattggtaccggcagaagtcaggc caggccctgttctggtcatctat gaggaca acaaacgac cctccgggatccctgagagattctctggtccagctcagg gacaatggccaccttgactatcagtggggcccagggtggag gatgaagctgactaccactgt tactcaacagacagcagtt ctaatcccctgggag tattcggcggagggaaccaagctgac cgtcctag
ZKA230	SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
CDRH1	46	ggtggctccatcagtagtgactac
CDRH2	47	atctattacagtgggagcacc
CDRH3	48	gcgaggaggaggaagtatgattccctttgggggagttttg cttttgatatac
CDRL1	49	agctccaacatcggaggtaattat
CDRL2	50	attaatgat
CDRL2 largo	51	ctcatctgt attaatgat caccggccc
CDRL3	52	gcaacatgggatgacagcctgggtggccttgta
VH	53	caggtgcagctgcaggagtcgggcccaggcctggtgaagc cttcggagaccctgtccctcacctgcgcagtcctct ggtgg ctccatcagtagtgactact ggagctggatccggcagccc ccagggaagggactggagtggattgggtat atctattaca gtgggagcacc aactacaacccctccctcaagagtcgagt caccatatcagtagacacgtccaagaaccacttctccctg aagctgaactctgtgaccgctgcggaacaggccgtgtatt actgt gcgaggaggaggaagtatgattccctttgggggag ttttgcttttgatatac tggggccaagggaacaatggtcacc gtctcttcag
VL	54	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggaccc ccgggcagagggtcaccatctcttgttctggaagc agctc caacatcggaggtaattat gtatactggtaccagcagctc ccagggaacggcccccaactcctcatctgt attaatgatc

5

10

15

20

25

30

35

		accggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaa gtctggcacctcagcctccctggccatcagtgggctccag tccgaggatgaggctgattattactgt gcaacatgggatg acagcctgggtggccttgtatt cggcggaggggaccaagct gaccgtcctag
ZKA78	SEQ ID NO.	Séqüencia de ácido nucleico
CDRH1	64	ggcttcacttttagtaactatgca
CDRH2	65	atcgggcgcaacggggactctatc
CDRH3	66	gtgaaagatctggccatccccgagtcctacagaattgaag ctgattat
CDRL1	67	cagtccgtgctgtacogctctaacaacaagaattac
CDRL2	68	tgggcttca
CDRL2 largo	69	ctgatctatt tgggcttca accogggaa
CDRL3	70	cagcagtagtattctagtcctogaact
VH	71	gaggtgcagctggcagaatcaggcgggggactgggtccagc ctggcggcagcctgacactgtcttgacagtggatc aggctt cacttttagtaactatgca atgggtgtgggcaaggcaggct cctgggaagggaactggagtatgtctctggc atcgggcgca acggggactctatct actatactgatagtgtgaagggccg gttcaccatcagcagagacaatagcaaataccatgggtgtac ctgcagatgagctccctgcgaaccgaagacacagcagtgt actattgc gtgaaagatctggccatccccgagtcctacag aattgaagctgattatt ggggacagggcaccctgggtcatc gtgagcgccg
VL	72	gacatcgtgatgacacagtctccagatagtctggcagtca gtctgggggagagggccactattaactgcaagagctcc ca gtccgtgctgtaccgctctaacaacaagaattac ctgtct tggtatcagcagaagcccggacagccccctaaactgctga tctat tgggcttca accogggaaagcggcgtcccagacag attctcaggcagcgggtccggaacagacttcaccctgaca attagccccctgcaggcagaggacgtggctgtctactatt gt cagcagtagtattctagtcctogaact ttcggccaggg gaccaaggtggaaatcaaac
ZKA64	SEQ ID NO.	Séqüencia de ácido nucleico

5	CDRH1	82	ggctacaccttcacagggatatcac
	CDRH2	83	attaaccctaattcttggcgggacc
	CDRH3	84	gctcggatgagctcctctatttggggcttcgatcat
	CDRL1	85	cagtctgtgctgattaac
	CDRL2	86	ggagcatcc
10	CDRL2 largo	87	ctgatctat ggagcatcc tcagggt
	CDRL3	88	cagcagtacaatgattggccccctatcaca
15	VH	89	caggtgcagctgggtccagagcggagcagaggtgaagaaac ccggcgccctcagtgaaggtcagctgcaaagcttcc ggcta caccttcacagggatatcac atcgactgggtgaggcaggca agaggacagggactggaatggatgggacgg attaacccta attcttggcgggacca actacgcccagaagtcttcagggtccg agtgactatgaccagagacaccagcatctccacagcttat atgcagctgtcccggctgagatctgacgatagtgcctct actattgt gctcggatgagctcctctatttggggcttcga tcatt ggggggcagggaaactggtgactgtcagttcag
	VL	90	gagatcgtgatgactcagctcaccagccaccctgtcagtc gccaggagaacgggcaaccctgtcttgagagcctcc ca gtctgtgctgattaac ctggcttggtaccagcagaagcca ggccaggcaccctgactgctgatctat ggagcatcc tcca gggtaccggcattcctgcacgcttcagtggtcaggaag cggaacagagtttaccctgacaatctctagtctgcagtcc gaagacttcgctgtctactattgt cagcagtacaatgatt ggccccctatcacat ttggccaggggactagactggagat caagc
25			

Preferiblemente, la secuencia de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 10 - 18, 28 - 36, 46 - 54, 64 - 72 y 82 - 90; o una variante de secuencia funcional de los mismos.

También se prefiere que las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención incluyan secuencias de ácido nucleico que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con el ácido nucleico que codifica una CDR, una secuencia VH y/o una secuencia VL mostrada en las Tablas 1 y 2, por ejemplo, a las secuencias que se muestran en la Tabla 3.

En general, la molécula de ácido nucleico puede manipularse para insertar, eliminar o alterar ciertas secuencias de ácido nucleico. Los cambios de dicha manipulación incluyen, pero no se limitan a, cambios para introducir sitios de restricción, enmendar el uso de codones, agregar u optimizar secuencias reguladoras de transcripción y/o traducción, etc.

5 También es posible cambiar el ácido nucleico para alterar los aminoácidos codificados. Por ejemplo, puede ser útil introducir una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 1, etc.) sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en el secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Dichas mutaciones puntuales pueden modificar las funciones efectoras, la afinidad de unión al antígeno, las modificaciones postraduccionales, la inmunogenicidad, etc., pueden
10 introducir aminoácidos para la unión de grupos covalentes (por ejemplo, etiquetas) o pueden introducir marcadores (por ejemplo, con fines de purificación). Las mutaciones se pueden introducir en sitios específicos o se pueden introducir al azar, seguido de una selección (por ejemplo, evolución molecular). Por ejemplo, uno o más ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las regiones CDR, una secuencia VH y/o una secuencia VL de un anticuerpo
15 (ejemplar) de la invención pueden mutarse aleatoria o direccionalmente para introducir diferentes propiedades en los aminoácidos codificados. Tales cambios pueden ser el resultado de un proceso iterativo en donde se retienen los cambios iniciales y se introducen nuevos cambios en otras posiciones de nucleótidos. Además, los cambios logrados en etapas independientes pueden combinarse. Las diferentes propiedades introducidas en los
20 aminoácidos codificados pueden incluir, entre otras, afinidad mejorada.

En otro aspecto, la presente invención también proporciona una pluralidad de moléculas de ácido nucleico como se describió anteriormente, en donde cada molécula de ácido nucleico comprende al menos un polinucleótido que codifica un fragmento del anticuerpo, o del fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente
25 invención, como se describió anteriormente. Preferiblemente, la pluralidad de fragmentos codificados por la pluralidad de moléculas de ácido nucleico forma un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención. En otras palabras, se prefiere que la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención codifique el anticuerpo (completo), o el fragmento de unión al antígeno
30 (completo) del mismo, de acuerdo con la presente invención. Esto significa que, en particular, no se requieren más moléculas de ácido nucleico (además de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención) para codificar/producir el anticuerpo (completo), o el fragmento (completo) de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con
35 la presente invención, codifica todas las cadenas de polipéptidos de un anticuerpo, o de un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención.

Un ejemplo preferido de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con

la presente invención, son (exactamente) dos moléculas de ácido nucleico, en donde cada una de las moléculas de ácido nucleico comprende uno o más de uno (por ejemplo, dos o tres) polinucleótidos, cada polinucleótido que codifica una cadena polipeptídica (distinta) del anticuerpo, o del fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención. Por consiguiente, las moléculas de ácido nucleico de dicha pluralidad de moléculas de ácido nucleico son preferiblemente mono o bicistrónicas. Un ejemplo de esto son dos moléculas de ácido nucleico que codifican juntas un anticuerpo FIT-Ig de acuerdo con la presente invención como se describe anteriormente (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico bicistrónico combinada con la molécula de ácido nucleico monocistrónico correspondiente, de modo que los polipéptidos 1, 2 y 3 de la FIT-Ig están codificados por las dos moléculas de ácido nucleico; como se describió anteriormente).

En otro ejemplo preferido, la presente invención proporciona (exactamente) tres moléculas de ácido nucleico, en donde cada una de las moléculas de ácido nucleico comprende un (único) polinucleótido que codifica una cadena polipeptídica (distinta) del anticuerpo, o del fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención. Por consiguiente, las moléculas de ácido nucleico de tal pluralidad de moléculas de ácido nucleico son preferiblemente monocistrónicas. Un ejemplo de ello son tres moléculas de ácido nucleico que codifican juntas un anticuerpo FIT-Ig de acuerdo con la presente invención, como se describe anteriormente (por ejemplo, tres (por ejemplo, monocistrónicas) moléculas de ácido nucleico, un polipéptido codificador 1 del FIT-Ig, otro polipéptido codificador 2 del FIT-Ig, y el tercer polipéptido codificador 3 del FIT-Ig; como se describió anteriormente).

Vector

Se incluyen además dentro del alcance de la invención los vectores, por ejemplo, los vectores de expresión, que comprenden una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, un vector comprende una molécula de ácido nucleico como se describe anteriormente.

El término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico, preferiblemente a una molécula de ácido nucleico recombinante, es decir, una molécula de ácido nucleico que no ocurre en la naturaleza. Un vector en el contexto de la presente invención es adecuado para incorporar o albergar una secuencia de ácido nucleico deseada. Dichos vectores pueden ser vectores de almacenamiento, vectores de expresión, vectores de clonación, vectores de transferencia, etc. Un vector de almacenamiento es un vector que permite el almacenamiento conveniente de una molécula de ácido nucleico. Por lo tanto, el vector puede comprender una secuencia correspondiente, por ejemplo, a un anticuerpo deseado o fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con la presente invención. Se puede usar un vector de expresión para la producción de productos de expresión tales como ARN, por ejemplo, ARNm, o péptidos, polipéptidos o proteínas. Por ejemplo, un vector de expresión puede comprender secuencias

necesarias para la transcripción de un tramo de secuencia del vector, tal como una secuencia promotora. Un vector de clonación es típicamente un vector que contiene un sitio de clonación, que puede usarse para incorporar secuencias de ácido nucleico en el vector. Un vector de clonación puede ser, por ejemplo, un vector plasmídico o un vector bacteriófago. Un vector de transferencia puede ser un vector adecuado para transferir moléculas de ácido nucleico a células u organismos, por ejemplo, vectores virales. Un vector en el contexto de la presente invención puede ser, por ejemplo, un vector de ARN o un vector de ADN. Preferiblemente, un vector es una molécula de ADN, tal como un plásmido de ADN. Por ejemplo, un vector en el sentido de la presente solicitud comprende un sitio de clonación, un marcador de selección, tal como un factor de resistencia a antibióticos, y una secuencia adecuada para la multiplicación del vector, tal como un origen de replicación. Preferiblemente, un vector en el contexto de la presente solicitud es un vector plasmídico.

En otro aspecto, la presente invención también proporciona una pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, que codifican preferiblemente el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención. Por consiguiente, las modalidades preferidas y los ejemplos de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención como se describe anteriormente también se aplican a la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención.

Células

En otro aspecto, la presente invención también proporciona células que expresan el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención; y/o que comprende el vector de acuerdo con la presente invención o la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención.

Los ejemplos de tales células incluyen, pero sin limitación, células eucariotas, por ejemplo, células de levadura, células animales o células vegetales. Preferiblemente, las células son células de mamífero, más preferiblemente una línea celular de mamífero. Los ejemplos preferidos incluyen células humanas, células CHO, células HEK293T, células PER.C6, células NSO, células hepáticas humanas, células de mieloma o células de hibridoma.

En particular, la célula puede transfectarse con el vector de acuerdo con la presente invención, o con la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, preferiblemente con un vector de expresión o una pluralidad de los mismos. El término “transfección” se refiere a la introducción de moléculas de ácido nucleico, tales como moléculas de ADN o ARN (por ejemplo, ARNm), en las células, preferiblemente en las células eucariotas. En el contexto de la presente invención, el término “transfección” abarca cualquier método conocido por la persona experta para introducir moléculas de ácido nucleico en células, preferiblemente en células eucariotas, tales como células de mamífero. Dichos métodos abarcan, por ejemplo, electroporación, lipofección, por ejemplo, basado en lípidos

cati6nicos y/o liposomas, precipitaci6n de fosfato de calcio, transfecci6n basada en nanopartículas, transfecci6n basada en virus o transfecci6n basada en polímeros cati6nicos, como DEAE dextrano o polietilenimina, etc. Preferiblemente, la introducci6n es no viral.

Además, las células de la presente invenci6n pueden transfectarse de manera estable o transitoria con el vector de acuerdo con la presente invenci6n o con la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invenci6n, por ejemplo, para expresar el anticuerpo, o el fragmento de uni6n al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invenci6n. Preferiblemente, las células se transfectan de manera estable con el vector de acuerdo con la presente invenci6n o con la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invenci6n, que codifican el anticuerpo o el fragmento de uni6n al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invenci6n. Alternativamente, también se prefiere que las células se transfecten transitoriamente con el vector de acuerdo con la presente invenci6n o con la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invenci6n, que codifican el anticuerpo o el fragmento de uni6n al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invenci6n.

15 ***Características adicionales opcionales de los anticuerpos***

Los anticuerpos de la invenci6n se pueden acoplar, por ejemplo, a un fármaco para administrar a un sitio de tratamiento o se pueden acoplar a una etiqueta detectable para facilitar la obtenci6n de imágenes de un sitio que comprende células de interés. Los métodos para acoplar anticuerpos a fármacos y etiquetas detectables son bien conocidos en la técnica, al igual que los métodos para formar imágenes usando etiquetas detectables. Los anticuerpos etiquetados pueden emplearse en una amplia variedad de ensayos, empleando una amplia variedad de etiquetas. La detecci6n de la formaci6n de un complejo anticuerpo-antígeno entre un anticuerpo de la invenci6n y un epítipo de interés se puede facilitar uniendo una sustancia detectable al anticuerpo. Los medios de detecci6n adecuados incluyen el uso de etiquetas tales como radionúclidos, enzimas, coenzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, crom6genos, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, complejos de grupos protésicos, radicales libres, partículas, colorantes y similares. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente es el luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen 1251, 1311, 35S o 3H. Dichos reactivos etiquetados pueden usarse en una variedad de ensayos bien conocidos, tales como radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo, ELISA, inmunoensayos fluorescentes y similares. Los anticuerpos etiquetados de acuerdo con la

presente invención se pueden usar de este modo en tales ensayos, por ejemplo, como se describe en los documentos US 3,766,162; US 3,791,932; US 3,817,837; y US 4,233,402.

Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede conjugarse con una porción terapéutico tal como una citotoxina, un agente terapéutico o un ion metálico radioactivo o radioisótopo. Los ejemplos de radioisótopos incluyen, entre otros, 1-131, 1-123, 1-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111 y similares. Dichos conjugados de anticuerpos pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada; la porción del fármaco no debe interpretarse como limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción del fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de la difteria.

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

Alternativamente, un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo del mismo, puede conjugarse con un segundo anticuerpo, o fragmento de anticuerpo del mismo, para formar un heteroconjugado de anticuerpo como se describe en el documento US 4,676,980. Además, se pueden usar enlazadores entre los etiquetas y los anticuerpos de la invención, por ejemplo, como se describe en el documento US 4,831,175. Los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno pueden marcarse directamente con yodo radiactivo, yodo, itrio u otras partículas radiactivas conocidas en la técnica, por ejemplo, como se describe en el documento US 5,595,721. El tratamiento puede consistir en una combinación de tratamiento con anticuerpos conjugados y no conjugados administrados simultáneamente o posteriormente, por ejemplo, como se describe en WO00/52031; WO00/52473.

Los anticuerpos de la invención también pueden unirse a un soporte sólido. Además, los anticuerpos de la invención, o sus fragmentos de anticuerpos funcionales, pueden modificarse químicamente mediante conjugación covalente a un polímero para, por ejemplo, aumentar su vida media circulante. Ejemplos de polímeros, y métodos para unirlos a péptidos, se muestran en los documentos US 4,766,106; US 4,179,337; US 4,495,285 y US 4,609,546.

En algunas modalidades, los polímeros pueden seleccionarse de polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a temperatura ambiente y tiene la fórmula general: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, en donde R puede ser hidrógeno, o un grupo protector tal como un grupo alquilo o alanol. Preferiblemente, el grupo protector puede tener entre 1 y 8 carbonos. Por ejemplo, el grupo protector es metilo. El símbolo n es un entero positivo. En una modalidad, n está entre 1 y 1,000. En otra modalidad, n está entre 2 y 500. Preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular promedio entre 1,000 y 40,000, más preferiblemente el PEG tiene un peso molecular entre 2,000 y 20,000, incluso más preferiblemente el PEG tiene un peso molecular entre 3,000 y 12,000. Además, el PEG puede tener al menos un grupo hidroxilo, por ejemplo, el PEG puede tener un grupo hidroxilo terminal. Por ejemplo, es el grupo hidroxilo terminal el que se activa para reaccionar con un grupo amino libre en el inhibidor. Sin embargo, se entenderá que el tipo y la cantidad de los grupos reactivos se pueden variar para lograr un PEG/anticuerpo conjugado covalentemente de la presente invención.

Los polioles polioxietilados solubles en agua también son útiles en la presente invención. Incluyen sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG) y similares. En una modalidad, se usa el POG. Sin estar sujeto a ninguna teoría, dado que la cadena principal del glicerol del glicerol polioxietilado es la misma cadena principal que ocurre naturalmente, por ejemplo, en animales y humanos en mono-, di-, triglicéridos, esta ramificación no necesariamente sería vista como un agente extraño en el cuerpo. El POG puede tener un peso molecular en el mismo intervalo que el PEG. Otro sistema de administración de fármacos que puede usarse para aumentar la vida media circulatoria es el liposoma. Los métodos para preparar sistemas de administración de liposomas son conocidos por un experto en la técnica. Otros sistemas de suministro de fármacos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Poznansky et al. (1980) y Poznansky (1984).

Los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse en forma purificada. Típicamente, el anticuerpo estará presente en una composición que está sustancialmente libre de otros polipéptidos, por ejemplo, donde menos del 90% (en peso), generalmente menos del 60% y más habitualmente menos del 50% de la composición está compuesta por otros polipéptidos.

Los anticuerpos de la invención pueden ser inmunogénicos en hospederos no humanos (o heterólogos), por ejemplo, en ratones. En particular, los anticuerpos pueden tener un idiótipo que es inmunogénico en hospederos no humanos, pero no en un hospedero humano. En particular, los anticuerpos de la invención para uso humano incluyen aquellos que no pueden aislarse fácilmente de hospederos tales como ratones, cabras, conejos, ratas, mamíferos no primates, etc. y generalmente no pueden obtenerse por humanización o de xeno-ratones.

Composición farmacéutica

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más de:

- 5 (i) el anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo del mismo, de acuerdo con la presente invención;
- (ii) la molécula de ácido nucleico o la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención;
- (iii) el vector o la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención; y/o
- (iv) la célula de acuerdo con la presente invención.

10 En otras palabras, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención y/o la célula de acuerdo con la presente invención.

15 La composición farmacéutica también puede contener preferiblemente un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Aunque el portador o excipiente puede facilitar la administración, no debe inducir la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Tampoco debería ser tóxico. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas virales inactivas. En general, los portadores farmacéuticamente aceptables en una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención pueden ser componentes activos o componentes inactivos.

25 Preferiblemente, el portador farmacéuticamente aceptable en una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención no es un componente activo con respecto a la infección por el virus del Zika.

30 Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables en una composición farmacéutica pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, salina, glicerol y etanol. Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias amortiguadoras de pH, en tales composiciones. Dichos portadores permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, mezclas espesas y suspensiones, para su ingestión por el sujeto.

35

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección (por ejemplo, una
5 composición liofilizada, similar a Synagis™ y Herceptin™, para reconstitución con agua estéril que contiene un conservante). La composición puede prepararse para administración tópica, por ejemplo, como una pomada, crema o polvo. La composición puede prepararse para administración oral, por ejemplo, como una tableta o cápsula, como un aerosol o como un jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición puede prepararse para administración
10 pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, usando un polvo fino o un aerosol. La composición puede prepararse como un supositorio o pesario. La composición puede prepararse para administración nasal, auditiva u ocular, por ejemplo, en forma de gotas. La composición puede estar en forma de kit, diseñada de tal manera que una composición combinada se reconstituya justo antes de la administración a un sujeto. Por ejemplo, un anticuerpo liofilizado puede
15 proporcionarse en forma de kit con agua estéril o una solución amortiguadora estéril.

Se prefiere que el ingrediente activo en la composición sea una molécula de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o variantes y derivados del mismo, en particular el ingrediente activo en la composición es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o variantes y derivados del mismo, de acuerdo con la presente invención. Como tal, puede ser
20 susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición se va a administrar por una ruta que usa el tracto gastrointestinal, la composición puede contener agentes que protegen al anticuerpo de la degradación pero que liberan el anticuerpo una vez que ha sido absorbido por el tracto gastrointestinal.

En Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición,
25 ISBN: 0683306472, se encuentra disponible una discusión exhaustiva sobre los portadores farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la invención generalmente tienen un pH entre 5.5 y 8.5, en algunas modalidades esto puede estar entre 6 y 8, y en otras modalidades alrededor de 7. El pH puede mantenerse mediante el uso de una solución amortiguadora. La
30 composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. La composición puede ser isotónica con respecto a los humanos. En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la invención se suministran en envases herméticamente cerrados.

Dentro del alcance de la invención hay composiciones presentes en varias formas de administración; las formas incluyen, pero no se limitan a, aquellas formas adecuadas para
35 administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección en bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un portador oleoso o acuoso y

puede contener agentes de formulación, como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para su reconstitución antes de su uso con un líquido estéril apropiado. Típicamente, se entiende que un vehículo es un material que es adecuado para almacenar, transportar y/o administrar un compuesto, tal como un compuesto farmacéuticamente activo, en particular los anticuerpos de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, el vehículo puede ser un líquido fisiológicamente aceptable, que sea adecuado para almacenar, transportar y/o administrar un compuesto farmacéuticamente activo, en particular los anticuerpos de acuerdo con la presente invención. Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. En una modalidad, las composiciones están adaptadas para la administración a mamíferos, por ejemplo, sujetos humanos.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por cualquier número de rutas que incluyen, pero no se limitan a, oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea, tópica, subcutánea, intranasal, enteral, vías sublinguales, intravaginales o rectales. Las hiposprays también se pueden usar para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Preferiblemente, la composición farmacéutica puede prepararse para administración oral, por ejemplo, como comprimidos, cápsulas y similares, para administración tópica, o como inyectables, por ejemplo, como soluciones o suspensiones líquidas, por lo que se prefiere particularmente que la composición farmacéutica sea un inyectable. También se prefieren formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en portadores líquidos antes de la inyección, por ejemplo, que la composición farmacéutica está en forma liofilizada.

Para inyección, por ejemplo, inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el sitio de la afección, el ingrediente activo estará preferiblemente en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que esté libre de pirógenos y tenga un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia son capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos como la inyección de cloruro de sodio, la inyección de Ringer, la inyección de Ringer lactato. Se pueden incluir conservantes, estabilizadores, soluciones amortiguadoras, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario. Ya sea que se trate de un polipéptido, péptido o molécula de ácido nucleico, otro compuesto farmacéuticamente útil de acuerdo con la presente invención que se administrará a un individuo, la administración se realiza preferiblemente en una "cantidad profilácticamente efectiva" o en una "cantidad terapéuticamente efectiva" (como el caso puede ser), esto es suficiente para mostrar beneficio al individuo. La cantidad real administrada, y la velocidad y el tiempo de administración dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se esté

tratando. Para inyección, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede proporcionarse, por ejemplo, en una jeringa precargada.

La composición farmacéutica de la invención como se definió anteriormente también se puede administrar por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable que incluye, pero no se limita a, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los portadores comúnmente utilizados incluyen lactosa y almidón de maíz. Los agentes lubricantes, como el estearato de magnesio, también se suelen agregar. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo, es decir, la molécula conjugada de carga transportadora de la invención como se definió anteriormente, se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también se pueden agregar ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

La composición farmacéutica de la invención también se puede administrar por vía tópica, especialmente cuando el objetivo del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica, por ejemplo, incluyendo enfermedades de la piel o de cualquier otro tejido epitelial accesible. Las formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos. Para aplicaciones tópicas, la composición farmacéutica inventiva puede formularse en una pomada adecuada, que contiene la composición farmacéutica inventiva, particularmente sus componentes como se definieron anteriormente, suspendidos o disueltos en uno o más portadores. Los portadores para administración tópica incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, la composición farmacéutica de la invención se puede formular en una loción o crema adecuada. En el contexto de la presente invención, los portadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple. En particular, la composición farmacéutica se puede proporcionar como producto de dosis única. Preferiblemente, la cantidad de anticuerpo en la composición farmacéutica, en particular si se proporciona como producto de dosis única, no excede de 200 mg, más preferiblemente no excede de 100 mg, e incluso más preferiblemente no excede de 50 mg.

Por ejemplo, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse diariamente, por ejemplo, una o varias veces al día, por ejemplo, una, dos, tres o cuatro veces al día, preferiblemente una o dos veces al día, más preferible una vez al día, para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 o más días, por ejemplo diariamente por 1, 2, 3, 4, 5, 6 meses. Preferiblemente, la composición farmacéutica

de acuerdo con la presente invención puede administrarse semanalmente, por ejemplo, una o dos veces por semana, para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 o más semanas, por ejemplo semanalmente por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses o semanalmente por 2, 3, 4 o 5 años. Además, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse preferiblemente mensualmente, por ejemplo, una vez al mes o, más preferiblemente, cada dos meses durante 1, 2, 3, 4 o 5 o más años. También se prefiere que la administración continúe durante toda la vida. Además, también se prevé una única administración, en particular con respecto a ciertas indicaciones, por ejemplo, para la prevención de la infección por el virus del Zika en caso de exposición accidental, por ejemplo, en sujetos no inmunizados. Sin embargo, el programa de tratamiento más preferido es la profilaxis posterior a la exposición (PEP, por sus siglas en inglés), en la que una o más dosis individuales se administran tan pronto como sea posible después de la infección por Zika. También se prefiere un entorno profiláctico, en donde se administran una o más dosis individuales para prevenir la infección por Zika (es decir, antes de la infección por Zika, en particular en sujetos no inmunizados con Zika).

En particular, se prefiere que para una dosis única, por ejemplo, una dosis diaria, semanal o mensual, preferiblemente para una dosis semanal, la cantidad del anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, en la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, no excede 1 g, preferiblemente no excede 500 mg, más preferiblemente no excede 200 mg, incluso más preferiblemente no excede 100 mg, y particularmente preferiblemente no excede 50 mg.

Las composiciones farmacéuticas típicamente incluyen una cantidad “efectiva” de uno o más anticuerpos de la invención, es decir, una cantidad que es suficiente para tratar, mejorar, atenuar o prevenir una enfermedad o afección deseada, o para exhibir un efecto terapéutico detectable. Los efectos terapéuticos también incluyen reducción o atenuación en la potencia patogénica o síntomas físicos. La cantidad efectiva precisa para cualquier sujeto en particular dependerá de su tamaño, peso y salud, la naturaleza y el alcance de la afección, y la terapéutica o combinación de terapias seleccionadas para la administración. La cantidad efectiva para una situación dada está determinada por la experimentación de rutina y está a juicio de un médico clínico. Para los fines de la presente invención, una dosis efectiva generalmente será de alrededor de 0.005 a alrededor de 100 mg/kg, preferiblemente de alrededor de 0.0075 a alrededor de 50 mg/kg, más preferiblemente de alrededor de 0.01 a alrededor de 10 mg/kg, e incluso más preferiblemente de alrededor de 0.02 a alrededor de 5 mg/kg del anticuerpo de la presente invención (por ejemplo, la cantidad del anticuerpo en la composición farmacéutica) en relación con el peso corporal (por ejemplo, en kg) del individuo al que se administra.

Además, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención también

puede comprender un componente activo adicional, que puede ser un anticuerpo adicional o un componente, que no es un anticuerpo. El componente activo adicional es preferiblemente un inhibidor de punto de control. También se prefiere que un anticuerpo neutralizante del ZIKV, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, como se describe en la presente, se combine con un anticuerpo de unión a la NS1 del ZIKV, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, como se describe en la presente como componente activo adicional (coagente). De este modo, el papel patogénico de la NS1 puede bloquearse además de la neutralización del ZIKV. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede comprender uno o más de los componentes activos adicionales, por ejemplo, como se describe como coagentes a continuación en el contexto de una terapia combinada.

El anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno, de acuerdo con la presente invención, puede estar presente en la misma composición farmacéutica que el componente activo adicional o, preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno, de acuerdo con la presente invención, está compuesto por un la primera composición farmacéutica y el componente activo adicional está compuesto por una segunda composición farmacéutica diferente de la primera composición farmacéutica. Por consiguiente, si se prevé más de un componente activo adicional, cada componente activo adicional y el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno, de acuerdo con la presente invención, está preferiblemente compuesto por una composición farmacéutica diferente. Dichas composiciones farmacéuticas diferentes pueden administrarse combinadas/simultáneamente o en momentos separados o en ubicaciones separadas (por ejemplo, partes separadas del cuerpo).

Preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno, de acuerdo con la presente invención y el componente activo adicional proporcionan un efecto terapéutico aditivo o, preferiblemente, un efecto terapéutico sinérgico. El término “sinergia” se usa para describir un efecto combinado de dos o más agentes activos que es mayor que la suma de los efectos individuales de cada agente activo respectivo. Por lo tanto, cuando el efecto combinado de dos o más agentes da como resultado “inhibición sinérgica” de una actividad o proceso, se pretende que la inhibición de la actividad o proceso sea mayor que la suma de los efectos inhibitorios de cada agente activo respectivo. El término “efecto terapéutico sinérgico” se refiere a un efecto terapéutico observado con una combinación de dos o más terapias en donde el efecto terapéutico (medido por cualquiera de varios parámetros) es mayor que la suma de los efectos terapéuticos individuales observados con las respectivas terapias individuales.

Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con gZKA190, gZKA64, gZKA230, gZKA1 85, gZKA78 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y se prefiere un portador farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, una composición de la invención puede incluir anticuerpos de la

invención, en donde los anticuerpos pueden constituir al menos 50% en peso (por ejemplo, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más) de la proteína total en la composición. En tal composición, los anticuerpos están preferiblemente en forma purificada.

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

En otra modalidad, un método para preparar una composición farmacéutica comprende la etapa de: mezclar un anticuerpo con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se obtuvo de una célula B transformada o una célula plasmática cultivada de invención.

Como alternativa a la administración de anticuerpos o células B con fines terapéuticos, es posible administrar ácido nucleico (típicamente ADN) que codifica el anticuerpo monoclonal (o fragmento activo del mismo) de interés derivado de la célula B o las células plasmáticas cultivadas para un sujeto, de modo que el ácido nucleico puede expresarse en el sujeto *in situ* para proporcionar un efecto terapéutico deseado. La terapia génica adecuada y los vectores de administración de ácido nucleico son conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir un antimicrobiano, particularmente si se envasan en un formato de dosis múltiple. Pueden comprender detergente, por ejemplo, un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los detergentes generalmente están presentes en niveles bajos, por ejemplo, menos del 0.01%. Las composiciones también pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para dar tonicidad. Por ejemplo, es típica una concentración de 10 ± 2 mg/ml de NaCl.

Además, las composiciones farmacéuticas pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o un disacárido (por ejemplo, sacarosa o trehalosa) por ejemplo, en torno a 15-30 mg/ml (por ejemplo, 25 mg/ml), particularmente si van a ser liofilizados o si incluyen material reconstituido a partir de material liofilizado. El pH de una composición para liofilización puede ajustarse entre 5 y 8, o entre 5.5 y 7, o alrededor de 6.1 antes de la liofilización.

Las composiciones de la invención también pueden comprender uno o más agentes inmunorreguladores. En una modalidad, uno o más de los agentes inmunorreguladores incluyen uno o más adyuvantes.

Tratamientos médicos, kits y usos

Tratamientos médicos

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de nucleicos moléculas de ácido de acuerdo con la presente invención,

la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención en (i) prevención y/o tratamiento de la infección por el virus del Zika; o en (ii) diagnóstico de infección por el virus del Zika. De este modo, el uso del anticuerpo, o un fragmento de unión al
5 antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención (y en particular sus modalidades preferidas como se describe anteriormente) o de la (pluralidad) de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que codifica el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se prefiere en (i) prevención y/o
10 tratamiento de la infección por el virus del Zika como se describe en la presente; o en (ii) diagnóstico de infección por el virus del Zika como se describe en la presente.

Los métodos de diagnóstico pueden incluir poner en contacto un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con una muestra. Dichas muestras pueden aislarse de un sujeto, por ejemplo, una muestra de tejido aislada tomada de, por ejemplo, fosas nasales, cavidades sinusales, glándulas salivales, pulmón, hígado, páncreas, riñón, oído, ojo, placenta, tracto
15 alimentario, corazón, ovarios, hipófisis, glándulas suprarrenales, tiroides, cerebro, piel o sangre, preferiblemente plasma o suero. Los métodos de diagnóstico también pueden incluir la detección de un complejo antígeno/anticuerpo, en particular después del contacto de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con una muestra. Tal etapa de detección se realiza típicamente en el banco, es decir, sin ningún contacto con el cuerpo humano o animal. Los
20 ejemplos de métodos de detección son bien conocidos por la persona experta en la técnica e incluyen, por ejemplo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).

La prevención de la infección por el virus del Zika se refiere en particular a entornos profilácticos, en los que el sujeto no fue diagnosticado con infección por el virus del Zika (o no se realizó un diagnóstico o los resultados del diagnóstico fueron negativos) y/o el sujeto no
25 muestra síntomas de infección por el virus del Zika. En consecuencia, la prevención de la infección por el virus del Zika incluye la "profilaxis posterior a la exposición" (PEP), es decir, el tratamiento preventivo después de una posible infección por el virus del Zika, por ejemplo, después de una picadura de mosquito en un área afectada por el virus del Zika. La prevención de la infección por el virus del Zika es particularmente útil en sujetos de alto riesgo, como en
30 mujeres embarazadas y/o sujetos que permanecen en áreas afectadas por el virus del Zika (como sujetos que viven en áreas afectadas por el virus del Zika o que viajan a áreas afectadas por el virus del Zika).

Por el contrario, en entornos terapéuticos, el sujeto suele estar infectado por el virus del Zika, diagnosticado con infección por el virus del Zika y/o mostrando síntomas de infección
35 por el virus del Zika. Cabe destacar que los términos "tratamiento" y "terapia terapéutica" de la infección por el ZIKV incluyen la cura (completa) y la atenuación de la infección por ZIKV.

En consecuencia, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de

acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se usa preferiblemente para el tratamiento de la infección por el virus del Zika en sujetos diagnosticados con infección por el virus del Zika o en sujetos que muestran síntomas de infección por el Zika.

También se prefiere que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se usa para la prevención y/o tratamiento de la infección por el virus del Zika en sujetos asintomáticos. Esos sujetos pueden ser diagnosticados o no con infección por el virus del Zika.

Preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, se usa para la prevención y/o el tratamiento de la infección por el virus del Zika en mujeres embarazadas, en particular para prevenir la infección congénita. Por ejemplo, esto se puede realizar de manera similar a la prevención de la infección congénita por el HCMV como se describe en Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM, Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group: Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection; N Engl J Med 2005, 353:1350-1362.

Sin estar vinculado a ninguna teoría, se supone que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, puede pasar la placenta a través de la interacción con FcRn, por ejemplo, si se administra a una embarazada, por ejemplo por inyección (i.v.) o cualquier otra vía de administración como se describe en la presente. Es importante destacar que la interacción de las variantes de anticuerpos "LALA" como se describe en la presente con FcRn no se ve comprometida. Se cree que FcRn ya se expresa en el primer trimestre en la placenta.

Alternativamente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, o la (pluralidad) de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también se pueden administrar al espacio extraamniótico.

Preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, se usa para la prevención y/o tratamiento de la infección por el virus del Zika, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, el ácido, el vector, la pluralidad de ácidos nucleicos, la pluralidad de vectores, la célula o la composición farmacéutica se administran hasta siete días después de la (posible) infección por el virus del Zika, preferiblemente hasta cinco días después de la (posible) infección por el virus del Zika, más preferiblemente hasta cuatro días después de la (posible) infección por el virus del Zika, incluso más preferiblemente hasta tres días después de la (posible) infección por el virus del Zika, y aún más preferiblemente hasta un día o dos días después de la (posible) infección por el virus del Zika. Tal programa de tratamiento puede ser útil en entornos terapéuticos, así como en entornos profilácticos, en particular en la profilaxis posterior a la exposición (PEP).

En PEP, típicamente la primera administración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con el presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, es lo más pronto posible después de una posible infección por ZIKV, por ejemplo después de una picadura de mosquito en un área afectada por el ZIKV. Por consiguiente, en PEP la primera administración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, es típicamente hasta uno o más días después de la (posible) infección por el ZIKV, como se describió anteriormente.

También se prefiere que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, se use para la prevención y/o tratamiento

de la infección por el virus del Zika, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo, el ácido nucleico, el vector, la pluralidad de ácidos nucleicos, la pluralidad de vectores, la célula o la composición farmacéutica se administran hasta tres meses antes de la (posible) infección por el virus del Zika, preferiblemente hasta un mes antes de la (posible) infección por el virus del Zika, más preferiblemente hasta dos semanas antes de la (posible) infección por el virus del Zika, incluso más preferiblemente hasta una semana antes de la (posible) infección por el virus Zika, y aún más preferiblemente hasta un día antes de la (posible) infección por el virus del Zika. Tal programa de tratamiento se refiere en particular a un entorno profiláctico.

En general, y en particular en PEP, después de la primera administración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, pueden seguir una o más administraciones posteriores, preferiblemente una dosis única por día o por cada segundo día para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 días. También se prefiere que después de la primera administración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, pueden seguir una o más administraciones posteriores, preferiblemente una dosis única una o dos veces por semana para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 21 semanas. También se prefiere que después de la primera administración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, pueden seguir una o más administraciones posteriores, preferiblemente una dosis única cada 2 o 4 semanas por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 semanas. También se prefiere que después de la primera administración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de

moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, pueden seguir una o más administraciones posteriores, preferiblemente una dosis única cada dos o cuatro meses para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 meses. También se prefiere que después de la primera administración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, pueden seguir una o más administraciones posteriores, preferiblemente una dosis única una o dos veces al año para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 años.

Preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se administran a una dosis (única) de 0.005 a 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente a una dosis (única) de 0.0075 a 50 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente a una dosis (única) de 0.01 a 10 mg/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente a una dosis (única) de 0.05 a 5 mg/kg de peso corporal, y particularmente preferiblemente a una dosis (única) de 0.1 a 1 mg/kg de peso corporal.

El anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención pueden administrarse por cualquier número de vías tales como oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea, tópica, subcutánea, intranasal, enteral, sublingual, intravaginal o rectal. Se prefiere la administración intravenosa, o la administración subcutánea o la administración intramuscular, y la administración intravenosa o la administración subcutánea son más preferidas.

En mujeres embarazadas, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, o la (pluralidad) de molécula(s) de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también puede administrarse intra o extra amniótico, por ejemplo, por inyección.

Por consiguiente, la presente invención también proporciona un método para prevenir y/o tratar la infección por el virus del Zika en un sujeto, en donde el método comprende administrar a un sujeto que el mismo, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención. Las modalidades preferidas de este método corresponden a las modalidades preferidas del uso médico como se describió anteriormente (y a continuación, con respecto a la terapia de combinación). Por ejemplo, un sujeto preferido en este método es un sujeto diagnosticado con infección por el virus del Zika o que muestra síntomas de infección por el virus del Zika. Otro sujeto preferido en este método es un sujeto embarazada.

Terapia de combinación

La administración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención en los métodos y usos de acuerdo con la invención pueden llevarse a cabo solos o en combinación con un coagente (también referido como “componente activo adicional” en la presente), que es particularmente útil para prevenir y/o tratar la infección por el ZIKV.

La invención abarca la administración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con el presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, en la que se administra a un sujeto antes, simultáneamente o secuencialmente con otros regímenes terapéuticos o coagentes útiles para tratar y/o prevenir la infección por el ZIKV. Dicho anticuerpo, ácido nucleico, vector, composición celular o farmacéutica, que se administra simultáneamente con dichos coagentes, se puede administrar en la misma o diferentes composiciones y por la misma o diferentes rutas de administración.

Dichos otros regímenes terapéuticos o coagentes pueden ser, por ejemplo, un inhibidor de punto de control.

Por lo tanto, en otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo, o un fragmento de

unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se administra en combinación con un inhibidor de punto de control para los usos (médicos) como se describe en la presente.

Los inhibidores de punto de control preferidos se dirigen a un bloqueo de PD-1/PD-L1 y/o de CTLA4 y, por lo tanto, incluyen anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos anti-CTLA4.

Por lo tanto, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede comprender uno o más de los componentes activos adicionales.

También se prefiere que un anticuerpo neutralizante del ZIKV, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, como se describe en la presente, se combine con un anticuerpo de unión a la NS1 del ZIKV, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, como componente activo adicional (coagente). De este modo, el papel patogénico de la NS1 puede bloquearse además de la neutralización del ZIKV. En consecuencia, un anticuerpo de unión a la NS1 del ZIKV, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, por ejemplo como se describe en la PCT/EP2017/067581, que se incorpora aquí en su totalidad, es un componente activo adicional preferido (coagente).

El anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, o la célula de acuerdo con la presente invención, puede estar presente en la misma composición farmacéutica que el componente activo adicional (coagente) o, preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con el presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención o la célula de acuerdo con la presente la invención, está compuesta por una primera composición farmacéutica y el componente activo adicional (coagente) está comprendido por una segunda composición farmacéutica diferente de la primera composición farmacéutica. En consecuencia, si se prevé más de un componente activo adicional (coagente), cada componente activo adicional (coagente) está preferiblemente compuesto por una composición farmacéutica diferente. Dichas composiciones farmacéuticas diferentes pueden administrarse combinadas/simultáneamente o en momentos separados o en ubicaciones separadas (por

ejemplo, partes separadas del cuerpo).

Preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno, de acuerdo con la presente invención y el componente activo adicional (coagente) proporcionan un efecto terapéutico aditivo o, preferiblemente, un efecto terapéutico sinérgico. El término “sinergia” se usa para describir un efecto combinado de dos o más agentes activos que es mayor que la suma de los efectos individuales de cada agente activo respectivo. Por lo tanto, cuando el efecto combinado de dos o más agentes da como resultado la “inhibición sinérgica” de una actividad o proceso, se pretende que la inhibición de la actividad o proceso sea mayor que la suma de los efectos inhibitorios de cada agente activo respectivo. El término “efecto terapéutico sinérgico” se refiere a un efecto terapéutico observado con una combinación de dos o más terapias en donde el efecto terapéutico (medido por cualquiera de varios parámetros) es mayor que la suma de los efectos terapéuticos individuales observados con las respectivas terapias individuales.

Uso adicional y kits

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona el uso del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, para controlar la calidad de una vacuna anti-Zika comprobando que el antígeno de dicha vacuna contiene el epítipo específico en la conformación correcta. Los antígenos preferidos comprendidos por dicha vacuna anti-Zika para comprobar incluyen la proteína de envoltura del ZIKV o cualquier otra molécula/complejo que comprenda o consista en (i) dominio III de la proteína E del ZIKV (EDM) como se describió anteriormente o (ii) un epítipo del ZIKV cuaternario como se describió anteriormente.

Además, la presente invención también proporciona el uso del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención en el diagnóstico (*in vitro*) de la infección por el virus del Zika.

Además también se proporciona el uso del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad

de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, para determinar si una muestra de sangre aislada (por ejemplo, sangre completa, suero y/o plasma) está infectada con el virus del Zika.

5 Como se describió anteriormente, los métodos de diagnóstico pueden incluir poner en contacto un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con una muestra. Dichas muestras pueden aislarse de un sujeto, por ejemplo, una muestra de tejido aislada tomada de, por ejemplo, fosas nasales, cavidades sinusales, glándulas salivales, pulmón, hígado, páncreas, riñón, oído, ojo, placenta, tracto alimentario, corazón, ovarios, hipófisis, glándulas
10 suprarrenales, tiroides, cerebro, piel o sangre, preferiblemente suero o plasma. Los métodos de diagnóstico también pueden incluir la detección de un complejo antígeno/anticuerpo, en particular después del contacto de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con una muestra. Tal etapa de detección se realiza típicamente en el banco de pruebas, es decir, sin ningún contacto con el cuerpo humano o animal. Los ejemplos de métodos de detección son
15 bien conocidos por la persona experta en la técnica e incluyen, por ejemplo, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas).

En otro aspecto, la presente invención también proporciona un kit de partes que comprende al menos un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, al menos un ácido nucleico de acuerdo con la presente
20 invención, la pluralidad de ácidos nucleicos según la presente invención, al menos un vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, al menos una célula de acuerdo con la presente invención, y/o al menos una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención. Además, el kit puede comprender medios para la administración del anticuerpo, o un fragmento de unión al
25 antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, la pluralidad de vectores de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, tal como una
30 jeringa o un vaso, un prospecto, y/o un coagente para ser administrado como se describe anteriormente.

EJEMPLOS

Se proporcionan modalidades ejemplares de la presente invención en los siguientes ejemplos. Los siguientes ejemplos se presentan solo a modo de ilustración y para ayudar a un experto
35 en el uso de la invención. Los ejemplos no pretenden de ninguna manera limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Aislamiento de anticuerpos específicos para ZIKV y producción de anticuerpos

monoclonales

Se aislaron células B de memoria IgG⁺ de células mononucleares de sangre periférica crioconservadas (PBMC) de cuatro donantes infectados con ZIKV (ZKA, ZKB, ZKC y ZKD) usando microperlas CD22 (Miltenyi Biotec), seguido del agotamiento de las células portadoras de IgM, IgD e IgA por clasificación celular. Las células B de memoria de los donantes infectados con ZIKV se immortalizaron con EBV (virus de Epstein Barr) y CpG (oligodesoxinucleótido CpG 2006) en múltiples pocillos replicados como se describió anteriormente (Traggiai, E. et al., Nat. Med. 10, 871-875, 2004) y los sobrenadantes de cultivo se analizaron en un cribado primario utilizando en paralelo un ensayo de micro-neutralización basado en 384 pocillos y un ensayo de unión (ELISA) para probar su unión a la proteína ZIKV NS1 o a la proteína ZIKV E. Los resultados del ensayo de unión (unión a la proteína ZIKV E) se muestran en la FIGURA 1.

Se realizaron ensayos de neutralización en células Vero. En una placa de 384 pocillos, se incubó ZIKV H/PF/2013 que resultó en una tasa de infección (m.o.i, multiplicidad de infección, por sus siglas en inglés) de 0.35 con sobrenadantes durante 1 h a 37% (5% CO₂) antes de la adición a células Vero 5'000 pre-sembradas. Estos se incubaron durante 5 días más, después de lo cual se eliminó el sobrenadante y se añadió el reactivo WST-1 (Roche). Se recolectaron y expandieron cultivos positivos. A partir de cultivos positivos, las secuencias VH y VL se recuperaron por RT-PCR. Los anticuerpos se clonaron en vectores de expresión IgG1 e Ig kappa o Ig lambda humanos (amablemente proporcionados por Michel Nussenzweig, Rockefeller University, Nueva York, E.U.A.) Esencialmente como se describe (Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H (2008) Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. J Immunol Methods 329: 112-124). Los anticuerpos monoclonales se produjeron a partir de células B immortalizadas con EBV o mediante transfección transitoria de células 293 Freestyle (Invitrogen). Los sobrenadantes de células B o células transfectadas se recolectaron y las IgG se purificaron por afinidad mediante cromatografía con proteína A o proteína G (GE Healthcare) y se desalaron contra PBS.

La FIGURA 1 proporciona una visión general sobre los anticuerpos neutralizantes ZIKV seleccionados (ref. Tablas 1 y 2 para las secuencias de aminoácidos de sus CDR y regiones variables de cadena pesada/ligera). Las dos últimas columnas de la FIGURA 1 proporcionan las actividades de neutralización (IC₅₀) de ZIKV y DENV1 (si se probaron). Las otras columnas proporcionan actividades de unión (EC₅₀) de los anticuerpos para la proteína ZIKV E (ZIKV E), la proteína DENV1 E (DENV1 E), la proteína DENV2 E (DENV2 E), la proteína DENV3 E (DENV3 E), la proteína DENV4 E (DENV4 E), partícula similar al virus DENV1 (DENV1 VLP), partícula similar al virus DENV2 (DENV2 VLP), partícula similar al virus DENV3 (DENV3 VLP), partícula similar al virus DENV4 (DENV4 VLP) y al dominio EDIII de

Proteína ZIKV E (eneldo ZKA).

Ejemplo 2: Caracterización de anticuerpos ZKA190, ZKA185, ZKA230, ZKA64 y ZKA78

En el Ejemplo 1, se identificó y caracterizó una gran cantidad de anticuerpos neutralizantes de ZIKV por su especificidad a ZIKV, en particular a la proteína ZIKV E y ZIKV EDIII, así como por su reactividad cruzada hacia DENV. Anticuerpos ZKA190 (SEQ ID NOs: 1-18), ZKA185 (SEQ ID NOs: 19-36), ZKA230 (SEQ ID NOs: 37-54), ZKA64 (SEQ ID NOs: 73-90) y ZKA 78 (SEQ ID NOs: 55-72) descritos en el Ejemplo 1, luego se seleccionaron y se probaron adicionalmente contra la proteína ZIKV E ("ZIKV"), ZIKV EDIII ("DIII ZI") y también se probaron contra la proteína E del virus del dengue (DENV, número de serotipo) 1) por ELISA. Para este fin, se usó un ELISA estándar. Brevemente, las placas ELISA se recubrieron con proteína ZIKV E a 1 o 3 µg/mL, se bloquearon con FCS al 10% en PBS, se incubaron con suero o anticuerpos humanos y se lavaron. Los anticuerpos unidos se detectaron mediante incubación con IgG antihumana de cabra conjugada con AP (Southern Biotech). Luego se lavaron las placas, se añadió sustrato (p-NPP, Sigma) y se leyeron las placas a 405 nm. Las afinidades relativas de la unión del anticuerpo monoclonal se determinaron midiendo la concentración de anticuerpo (EC_{50}) requerida para lograr la unión máxima del 50% en la saturación.

Los resultados se muestran en las FIGURAS 3 y 4. Es de destacar que ZKA64 y ZKA190 se unen a ZIKV E y ZIKV EDIII ("DIII ZI") con valores EC_{50} bajos, lo que indica que ZKA64 y ZKA190 se unen al dominio III de la proteína ZIKV E (EDIII). ZKA78 se unió a ZIKV E, pero no a ZIKV EDIII, lo que indica que ZKA78 se une a ZIKV E, pero no dirige la región EDIII. A pesar de su considerable actividad neutralizadora del ZIKV (ref. FIGURA 1), los anticuerpos ZKA185 y ZKA230 no mostraron ninguna unión detectable a ZIKV E y ZIKV EDIII (FIGURA 3). Por consiguiente, ZKA185 y ZKA230 se denominaron anticuerpos "neutralizantes sin unión a E" (NNB). Se supone que esos anticuerpos NNB reconocen los epítomos cuaternarios que se muestran en los viriones infecciosos ZIKV pero no en las proteínas solubles.

Por otra parte, ninguno de ZKA190, ZKA185, ZKA230 y ZKA64 mostró ninguna unión detectable a las proteínas DENV E (FIGURA 1, serotipos DENV1-4 y FIGURAS 3 y 4), lo que indica que ZKA190, ZKA185, ZKA230 y ZKA64 son específicos para ZIKV y no tienen reacción cruzada con el virus del dengue. ZKA78, por el contrario, se supone que se une al ZIKV EDI/II, pero no al ZIKV EDIII (ref. FIGURA 2), unida a las proteínas DENV E (FIGURAS 1 y 3), lo que indica que ZKA78 es un anticuerpo de reacción cruzada que se une tanto a ZIKV como a DENV.

Para confirmar aún más esos resultados, los anticuerpos de unión a la proteína ZIKV E ZKA190, ZKA64 y ZKA78 se probaron adicionalmente contra la proteína E del virus del dengue (DENV, serotipos número 1-4). ZKA64 y ZKA190 no se unieron a la proteína DENV1-4 E, lo que confirma que ZKA64 y ZKA190 son específicos para ZIKV. ZKA78, por el contrario,

se unió a DENV1-4 E, confirmando que ZKA78 es un anticuerpo de reacción cruzada que se une a la proteína E de ZIKV y DENV (ref. FIGURA 1).

Ejemplo 3: Los anticuerpos aislados neutralizan potentemente la infección por ZIKV

Los anticuerpos aislados ZKA190, ZKA185, ZKA230, ZKA64 y ZKA78 fueron probados por su capacidad para neutralizar la infección por ZIKV y DENV1 *in vitro*.

La neutralización de la infección por DENV y ZIKV por anticuerpos se midió usando un ensayo basado en citometría de flujo de micro-neutralización. Se mezclaron diferentes diluciones de anticuerpos con ZIKV (MOI de 0.35) o DENV1 atenuado (todos a MOI de 0.04) durante 1 hora a 37°C y se añadieron a 5000 células Vero/pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos. Después de cuatro días para ZIKV y cinco días para DENV, las células se fijaron con formaldehído al 2%, se permeabilizaron en saponina PBS al 1% FCS al 0.5% y se tiñeron con el mAb de ratón 4G2. Las células se incubaron con una IgG de cabra anti-ratón conjugada con Alexa Fluor488 (Jackson Immuno-Research, 115485164) y se analizaron por citometría de flujo. En otros casos, los datos de neutralización del ZIKV también se determinan midiendo la viabilidad celular usando el reactivo WST-1 (Roche). El título de neutralización (concentración inhibitoria del 50% [IC₅₀]) se expresó como la concentración de anticuerpos que redujo la infección en un 50% en comparación con los pocillos de control solo de célula.

Los resultados se muestran en las FIGURAS 4, 5 y 9. Los mAbs específicos para EDIII ZKA64 y ZKA190 y el mAb NNB ZKA230 fueron altamente potentes en la neutralización de ZIKV (cepa H/PH/2013), con valores de IC₅₀ de 93, 9 y 10 ng/mL, respectivamente (FIGURA 4, superior panel). En contraste, el anticuerpo reactivo cruzado ZKA78 solo neutralizó la infectividad del ZIKV parcialmente y la infecciosidad DENV1 neutralizada cruzada (FIGURA 4, paneles inferiores). Se obtuvieron datos similares midiendo el efecto citopático inducido por ZIKV medido con el reactivo WST-1 (FIGURA 5). En este segundo ensayo, el anticuerpo NNB ZKA185 también se incluyó en el panel de anticuerpos probados y mostró un IC₅₀ similar a los anticuerpos más potentes ZKA190 (específico de EDIII) y ZKA230 (NNB).

Es importante tener en cuenta que los anticuerpos ultrapotentes ZKA64 y ZKA190 además de su capacidad para neutralizar la cepa ZIKV H/PH/2013 (ejemplo actual), también se unen a la proteína E y EDIII derivados de las cepas ZIKV MR766 y SPH2015, respectivamente (FIGURA 1 y FIGURA 2). También se confirmó que ZKA190 y ZKA190-LALA neutralizan efectivamente dos cepas adicionales de ZIKV (MR766 y MRS_OPY_Martinique_PaRi_2015) (FIGURA 9). En conjunto, los resultados indican que los anticuerpos ultrapotentes ZKA64 y ZKA190 reaccionan de forma cruzada con múltiples cepas de ZIKV que pertenecen a diferentes genotipos y orígenes (África Oriental, y Asiática de Uganda, Polinesia francesa, Martinica y Brasil).

Ejemplo 4: La mutación “LALA” inhibe la mejora dependiente de anticuerpos de la infección por ZIKV por anticuerpos séricos

Los anticuerpos neutralizantes también fueron probados por su capacidad para mejorar la infección de ZIKV en las células K562 no permisivas (ensayo de mejora dependiente de anticuerpos, ensayo ADE). ADE se midió mediante un ensayo basado en flujo usando células K562. Los anticuerpos y ZIKV H/PF/2013 (MOI 0.175) se mezclaron durante 1 hora a 37°C y se agregaron a 5000 células K562/pocillo. Después de cuatro días, las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con m4G2. El número de células infectadas se determinó por citometría de flujo.

Los resultados se muestran en la FIGURA 6. Todos los anticuerpos aumentaron la infección por ZIKV en las células K562 no permisivas en un amplio intervalo de concentraciones, incluidas las que neutralizaron por completo la infección por ZIKV en las células Vero (FIGURA 6). Es de destacar que, aunque los anticuerpos ZKA64 y ZKA190 específicos para EDIII neutralizaron por completo las infecciones por ZIKV de células K562 por encima de 1 µg/mL, el anticuerpo NNB ZKA230 falla a hacerlo, un resultado que podría deberse a los diferentes mecanismos de neutralización del libre virus versus virus internalizados por el receptor Fc-gamma. Por el contrario, el ZKA78 de reacción cruzada que solo neutralizó parcialmente la infectividad del ZIKV, mejoró efectivamente la infección por ZIKV de las células K562. Estos resultados muestran que los anticuerpos de reacción cruzada provocados por la infección por ZIKV o DENV pueden mediar la ADE heteróloga.

En vista de ello, se investigó si ADE también podría ser inducida por sueros inmunitarios y si esto podría ser bloqueado por anticuerpos neutralizantes administrados como una “variante LALA”. Para obtener la variante LALA, cada una de las cadenas pesadas fue mutada en los aminoácidos 4 y 5 del dominio CH2 sustituyendo una alanina en lugar de la leucina natural usando mutagénesis dirigida al sitio. Como se describió anteriormente, las variantes LALA (de los anticuerpos humanos IgG1) no se unen a los receptores Fc-gamma y se complementan.

Para investigar el efecto del anticuerpo ZKA64-LALA en ZIKV ADE, se usó un ensayo de inhibición de ADE. Dado que se observa ADE de ZIKV usando plasma inmune al ZIKV o DENV, se mezcló ZIKV (MOI 0.175) con plasma de donantes primarios infectados con ZIKV o DENV durante 30 minutos a 37°C. El anticuerpo ZKA64-LALA se añadió a 50 µg/mL, se mezcló con 5000 células K562/pocillo y se incubó durante tres días. Las células se tiñeron luego con 4G2 y se analizaron por citometría de flujo.

Los resultados se muestran en la FIGURA 7. En un entorno homólogo, cuatro plasma inmune al ZIKV recolectado de pacientes convalecientes y un plasma inmune al DENV mostraron una capacidad similar para mejorar la infección por ZIKV de las células K562 (FIGURA 7, panel superior), y este efecto ADE fue completamente bloqueado por el

anticuerpo ZKA64-LALA específico de EDIII (FIGURA 7, panel inferior). Es de destacar que el efecto ADE del plasma inmune al ZIKV y DENV fue completamente bloqueado por el anticuerpo ZKA64-LALA específico para EDIII. La capacidad de bloqueo de ADE de un solo anticuerpo LALA específico para EDIII podría estar relacionada no solo con su capacidad para

5 competir con los anticuerpos potenciadores del suero, sino también para neutralizar el virus una vez internalizado en los endosomas.

Estos resultados indican que un anticuerpo neutralizante potente, como ZKA190, ZKA230, ZKA185 o ZKA64, desarrollado en la forma “LALA”, tiene un gran potencial para ser utilizado en entornos profilácticos o terapéuticos para prevenir la infección congénita por ZIKV,

10 por ejemplo, en mujeres embarazadas y/o en personas que viven en zonas de alto riesgo. El uso de la forma LALA evita el riesgo de ZIKV ADE y, como se muestra arriba, también podría bloquear la ADE de anticuerpos reactivos cruzados preexistentes, como en el caso de pacientes que ya son inmunes al DENV.

Ejemplo 5: ZKA190 neutraliza el ZIKV más potentemente que el anticuerpo EDE1 mAb C8 de

15 la técnica anterior

Para comparar los anticuerpos neutralizantes aislados con anticuerpos anti-ZIKV altamente neutralizantes de la técnica anterior, se comparó el rendimiento de neutralización de ZKA190 con el del mAb EDE1 C8 altamente neutralizante de la técnica anterior (Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney MC, Medits I, Sharma A, Simon-Loriere E, Sakuntabhai A,

20 Cao-Lormeau VM, Haouz A, England P, Stiasny K, Mongkolsapaya J, Heinz FX, Screaton GR, Rey FA. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. Nature. 4 agosto 2016; 536(7614):48-53). La neutralización de ambos anticuerpos se probó contra un panel de cuatro cepas distintas de ZIKV (H/PF/2013; MR766, MRS-OPY y PV10552).

Brevemente, la neutralización de la infección por ZIKV por mAbs se midió usando un

25 ensayo basado en citometría de flujo de micro-neutralización. Se mezclaron diferentes diluciones de mAbs con ZIKV (MOI de 0.35) durante 1 hora a 37°C y se añadieron a 5000 células Vero/pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos. Después de cuatro días para ZIKV, las células se fijaron con formaldehído al 2%, se permeabilizaron en PBS que contenía suero de ternera fetal al 1% (Hyclone) y saponina al 0.5%, y se tiñeron con mAb 4G2 de ratón.

30 Las células se incubaron con IgG anti-ratón de cabra conjugado a Alexa Fluor488 (Jackson Immuno-Research, 115485164) y se analizaron por citometría de flujo. El título de neutralización (concentración inhibitoria del 50% [IC50]) se expresa como la concentración de anticuerpos que redujo la infección en un 50% en comparación con los pocillos de control de solo virus.

Los resultados se muestran en la FIGURA 10. ZKA190 mAb neutraliza potentemente las cepas africanas, asiáticas y americanas con un IC50 que varía de 0.6 a 8 ng/mL. En comparación, el anticuerpo C8 de la técnica anterior era aproximadamente 24 veces menos

35

potente.

Ejemplo 6: Caracterización adicional del anticuerpo ZKA190

La potencia del anticuerpo ZKA190 se investigó adicionalmente *in vitro* e *in vivo*. Para este fin, el mAb se sintetizó en formato IgG1 de tipo natural (tn) y en un formato IgCI Fc-LALA.

5 Brevemente, las secuencias VH y VL se clonaron en vectores de expresión de Igγ1, Igκ e Igλ humanos (amablemente proporcionados por Michel Nussenzweig, Rockefeller University, Nueva York, NY, E.U.A.), esencialmente como se describe (Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H: Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. J Immunol Methods
10 2008, 329: 112-124). Los mAbs recombinantes se produjeron por transfección transitoria de células EXPI293 (Invitrogen), se purificaron por cromatografía de proteína A (GE Healthcare) y se desalaron contra PBS. Para obtener la variante LALA, cada una de las cadenas pesadas fue mutada en los aminoácidos 4 y 5 del dominio CH2 sustituyendo una alanina en lugar de la leucina natural usando mutagénesis dirigida al sitio. Como se describió anteriormente, las
15 variantes LALA (de los anticuerpos IgG1 humanos) no se unen a los receptores Fc-gamma y se complementan.

Como se muestra en la FIGURA 10A y se describe en el Ejemplo 5, ZKA190 se probó contra un panel de cuatro cepas de ZIKV. El mAb ZKA190 neutralizó potentemente las cepas africanas, asiáticas y americanas con una IC50 que varía de 0.004 a 0.05 nM (FIGURA 10A;
20 0.6 a 8 ng/mL).

Dado que se ha demostrado que ZIKV infecta las células progenitoras neurales humanas (hNPC), lo que aumenta la toxicidad celular, la desregulación del ciclo celular y el crecimiento celular reducido, se probaron ZKA190 y ZKA190-LALA en hNPC. Con este fin, los fibroblastos masculinos adultos obtenidos del Movimiento de Trastornos del Biobanco (Unidad
25 de Neurogenética del Instituto Neurológico 'Carlo Besta', Milán) se reprogramaron utilizando el kit CytoTune-iPS 2.0 Sendai (Life Technologies). Las hiPSC se mantuvieron en condiciones libres de alimentación en mTeSRI (Stem Cell Technologies). Para generar cuerpos embrioides (EBs), se colocaron placas hiPSC disociadas en placas de baja adhesión en mTeSRI suplementado con N2 (0.5x) (ThermoFisher Scientific), Noggin humano (0.5 mg/mL, Sistema
30 R&D), SB431542 (5 μM, Sigma), Y27632 (10 μM, Miltenyi Biotec) y penicilina/estreptomicina (1%, Sigma) (como se describe en Marchetto MCN, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR: A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. Cell 2010, 143: 527-539). Para obtener rosetas, los EBs se colocaron en placas después de 10 días en placas recubiertas con matrigel (1:100, factor de crecimiento matrigel reducido, Corning) en DMEM/F12 (Sigma) con
35 N2 (1:100), aminoácidos no esenciales (1%, ThermoFisher Scientific) y penicilina/estreptomicina. Después de 10 días, las células se pasaron con Accutase (Sigma) y

se sembraron en matraces recubiertos con matrigel en medio NPC que contiene DMEM/F12, N2 (0.25%), B27 (0.5%, ThermoFisher Scientific), penicilina/estreptomicina y FGF2 (20 ng/mL, ThermoFisher Scientific). Las hNPC (3x10⁴) se colocaron en placas en cubreobjetos en placas de 24 pocillos 3 días antes de la infección con la cepa PRVABC59. La solución madre de virus se incubó con los mAbs 1 h antes de la adición a hNPC para obtener un MOI de 0.5. Después de 4 h de adsorción de virus, se eliminó el sobrenadante de cultivo y se volvió a agregar medio nuevo que contenía los mAb. El sobrenadante se recolectó 96 h después de la infección para medir los títulos de virus mediante un ensayo de placa en células Vero. Las células se fijaron en solución de paraformaldehído al 4% (PFA, Sigma) en solución salina amortiguada con fosfato (PBS, Euroclone) durante 30 minutos para inmunofluorescencia indirecta. Las células fijadas se permeabilizaron durante 30 minutos (min) en solución de bloqueo, que contenía Triton X-100 al 0.2% (Sigma) y suero de burro al 10% (Sigma), y se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo. Se utilizó el siguiente anticuerpo para la detección: anti-envoltura (1:200, Millipore, MAB10216). Luego, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 h con anticuerpos secundarios Hoechst y Alexa Fluor-488 anti-ratón (1:1,000 en solución de bloqueo, ThermoFisher Scientific). Después del lavado con PBS, las células se lavaron nuevamente y se montaron. Los resultados se muestran en la FIGURA 11A. Ambos, ZKA190 y ZKA190-LALA, abolieron por completo la infección y la replicación de ZIKV en hNPC.

A continuación, se probó la capacidad de ZKA190 y ZKA190-LALA para causar ADE en la línea celular K562 como se describe en el Ejemplo 4. Brevemente, ADE se midió mediante un ensayo basado en flujo usando células K562. Brevemente, para ZKA190, ZKA190 y ZIKV H/PF/2013 (MOI 0.175) se mezclaron durante 1 hora a 37°C y se añadieron a 5000 células K562/pocillo. Después de cuatro días, las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con mAb m4G2. El número de células infectadas se determinó por citometría de flujo. Para ZKA190-LALA, ZIKV (MOI 0.175) se mezcló con plasma de donantes primarios infectados con ZIKV durante 30 minutos a 37°C. Se añadió ZKA190-LALA a 50 µg/mL, se mezcló con 5000 células K562/pocillo y se incubó durante tres días. Las células se tiñeron luego con 4G2 y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se muestran en la FIGURA 11B. ZKA190 admite ADE desde 0.0001 a 1 nM; como se esperaba, ZKA190-LALA no mostró ninguna actividad ADE. También se probó la capacidad de ZKA190-LALA para inhibir ADE inducida por plasma de cuatro donantes inmunes al ZIKV en células K562. Los resultados se muestran en la FIGURA 11C. Se descubrió que ZKA190-LALA inhibía completamente ADE inducida por los anticuerpos plasmáticos (FIGURA 11C).

Los anticuerpos anti-prM forman parte de los anticuerpos predominantes provocados durante la respuesta inmunitaria humana contra flavivirus y se ha demostrado que aumentan la infección del virus *in vitro* (Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirisakul, N., Fitton, P.,

Vasanawathana, S., Limpitikul, W., Puttikhunt, C, Edwards, C, Duangchinda, T., Supasa, S., et al. (2010). Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* 328, 745-748). K562 cells were pre-incubated with serial dilutions of pr cross-reactive antibody DV62 (Beltramello, M., Williams, KL, Simmons, CP., Macagno, A., Simonelli, L., Quyen, NTH, Sukupolvi-Petty, S., Navarro-Sanchez, E., Young, PR, de Silva, AM, et al. (2010). La respuesta inmunitaria humana al virus del dengue está dominada por anticuerpos altamente reactivos cruzados dotados de actividad neutralizante y potenciadora. *Cell Host Microbe* 8, 271-283) derivado de un donante inmune a DENV. Los resultados se muestran en la FIGURA 11D. El DV62 reaccionó de forma cruzada con la proteína prM de ZIKV y causó ADE en un amplio intervalo de concentraciones (FIGURA 11D). ZKA190-LALA puede bloquear completamente la ADE inducida por mAb DV62 anti-prM de partículas de ZIKV inmaduras o parcialmente inmaduras (FIGURA 11D).

Finalmente, se probó la capacidad de diferentes concentraciones de ZKA190, ZKA190-LALA y ZKA190 Fab para causar o bloquear ADE de ZIKV en presencia de concentraciones elevadas de plasma humano anti-DENV2 o DV62. Los resultados se muestran en la FIGURA 11E. ZKA190 a bajas concentraciones aumentó la ADE mediada por DV62 prM de la infección por ZIKV, consistente con su capacidad para promover la entrada de viriones tanto inmaduros como maduros, mientras que a concentraciones superiores a 1.3 nM (es decir, 200 ng/mL) ZKA190 bloqueó ADE inducida tanto por plasma DENV como por mAb DV62. ZKA190-LALA, así como su fragmento Fab, redujeron la ADE a concentraciones superiores a 0.06 nM, lo que indica que ambos inhibieron la infección por virus en una etapa posterior a la unión, como la fusión.

Ejemplo 7: ZKA190 se une a una región conservada y altamente accesible de EDIII

Para determinar el epítipo ZKA190 a nivel de residuo, se usó espectroscopía de RMN en solución como se describe en Bardelli, M., Livoti, E., Simonelli, L., Pedotti, M., Moraes, A., Valente, A.P., and Varani, L. (2015). Epitope mapping by solution NMR spectroscopy. *J. Mol. Recognit.* 28, 393-400; Simonelli, L., Beltramello, M., Yudina, Z., Macagno, A., Calzolari, L., and Varani, L. (2010). Rapid structural characterization of human antibody-antigen complexes through experimentally validated computational docking. *J Mol Biol* 396, 1491-1507; y Simonelli, L., Pedotti, M., Beltramello, M., Livoti, E., Calzolari, L., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Varani, L. (2013). Rational Engineering of a Human Anti-Dengue Antibody through Experimentally Validated Computational Docking. *PLoS ONE* 8, e55561.

Brevemente, se registraron los espectros en un espectrómetro de RMN de 700 MHz Bruker Avance a 300 K. Para asignaciones de resonancias de la columna se utilizaron experimentos de triple resonancia estándar (HNCO, HN(CA)CO, HN(CO)CACB, HNCACB, mientras que las cadenas laterales se anotaron usando experimentos HCCH-TOCSY y HBHA(CO)NH. Todos los experimentos de RMN se procesaron utilizando Topspin 2.1 (Bruker

Biospin) y se analizaron con CARA. Los picos cruzados de NOESY se asignaron automáticamente utilizando la macro “noeassign” de CYANA basada en los cambios químicos asignados manualmente. Las restricciones de distancia superior utilizadas para los cálculos de estructura en CYANA usando el protocolo de recocido simulado estándar se derivaron de espectros de NOESY resueltos con ^{15}N y ^{13}C 70 ms. Las dinámicas de la columna del ZIKV EDIII se obtuvieron a partir de mediciones de relajación ^{15}N registradas en espectrómetros de 600 y 700 MHz. Se utilizaron versiones de CPMG (R2) detectadas por protones, recuperación de inversión (R1) y NOE de estado estable $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$. Los ajustes de retraso para la serie T2 estaban en el intervalo de 0 a 0.25 segundos y para la serie T1 entre 0.02 a 2 segundos. El experimento $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE utilizó un retraso de relajación de 5 s. Las tasas de relajación R1 y R2 se derivaron de los ajustes de mínimos cuadrados de las funciones exponenciales correspondientes a los datos medidos utilizando secuencias de comandos desarrollados domésticos. Los datos de relajación se analizaron en un enfoque sin modelo utilizando el paquete de software DYNAMICS. El programa ROTDIF se utilizó para calcular el tiempo de correlación global a partir de los datos de relajación (8.5 ns). El mapeo del epítipo de RMN se realizó como se describió previamente (Bardelli et al., 2015; Simonelli et al., 2010; 2013). Brevemente, la superposición de espectros $^{15}\text{NHSQC}$ de EDIII marcado libre o unido a ZKA190 Fab permitió la identificación de residuos de EDIII cuya señal de RMN cambió tras la formación del complejo, lo que indica que se vieron afectados por la unión de ZKA190. Los cambios se identificaron mediante inspección manual y por la Perturbación de desplazamiento químico (CSP), $\text{CSP} = ((\Delta\delta_{\text{H}})^2 + (\Delta\delta_{\text{N}}/10)^2)^{1/2}$. Las muestras de RMN fueron típicamente 800 μM de EDIII marcado con $[^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}]$ en fosfato de sodio 20 mM, NaCl 50 mM, pH 6.0. Se utilizaron muestras ^2H , ^{15}N EDIII perdeuteradas (nominalmente 70%) para el mapeo de epítipos de RMN con una relación EDIII:ZKA190 Fab de 1:1.1; la concentración de EDIII fue típicamente de 0.4 mM.

Dado que la señal de RMN depende en gran medida del entorno químico local, los cambios en la formación compleja identifican los residuos de antígeno que se ven afectados por la unión del anticuerpo, ya sea directamente o mediante efectos alostéricos. Al comparar los espectros de RMN de EDIII libre y unido (FIGURA 12A), los residuos afectados por ZKA190 se asignaron al LR de EDIII, en particular a los bucles BC, DE y FG, así como a parte del EDI-EDIII bisagra (FIGURA 13A). Estos residuos son casi idénticos entre las 217 cepas conocidas de ZIKV, con la excepción de las sustituciones en V341I y E393D en el aislado de Uganda 1947 (FIGURA 12D). Estas mutaciones también están presentes en la cepa MR766 que fue neutralizada eficientemente por ZKA190 (FIGURA 10A). El análisis del epítipo ZKA190 en la estructura ZIKV no complejada mostró que el epítipo es altamente accesible, excepto por el bucle FG en el vértice de 5 pliegues (FIGURA 13B y 12C, molécula A).

El acoplamiento computacional seguido de la simulación de dinámica molecular,

guiada y validada por la información del epítipo derivado de RMN, así como la mutagénesis EDIII, mostró que ZKA190 se une a través de una interfaz caracterizada por la complementariedad de forma y carga (FIGURA 13B y 12E). El acoplamiento indica que no hay contactos directos entre ZKA190 y el bucle FG en EDIII, lo que sugiere que los cambios en sus señales de RMN tras la unión de anticuerpos derivan de efectos alostéricos. Esta noción está respaldada por el hecho de que las mutaciones de los residuos del bucle FG en EDIII recombinante, pero no en otras regiones del epítipo, no afectaron la afinidad de unión de ZKA190 por EDIII (FIGURA 13B y 14).

Ejemplo 8: Mecanismos de neutralización de ZKA190

La capacidad de ZKA190 para neutralizar eficazmente el virus puede implicar la inhibición de la unión celular o la fusión de la membrana. Otro mecanismo podría implicar la inactivación del virus a través de la reticulación de partículas virales.

ZKA190 Fab puede neutralizar ZIKV, aunque menos eficientemente que la IgG correspondiente. Al unirse al enlazador EDI-EDIII, ZKA190 (Fab e IgG) podría inhibir la rotación de ~70 grados de DIII requerida para la fusión viral a la membrana celular del hospedero (Bressanelli, S., Stiasny, K., Al lison, S.L., Stura, E.A., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F.X., and Rey, F.A. (2004). Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *Embo J* 23, 728-738; Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., and Harrison, S.C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427, 313—319). Alternativamente, ZKA190 podría evitar la unión de ZIKV a las células objetivo.

La capacidad de ZKA190 para inhibir la fusión de membranas está respaldada por análisis de microscopía confocal. Con este fin, las células Vero se colocaron en placas a 7,500 células/pocillo en cubreobjetos de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos y se incubaron durante la noche. Las células se infectaron con ZIKV H/PF/2013 (MOI de 100) en presencia o ausencia de concentraciones neutralizantes de mAbs conjugados con Alexa-488 (0.7 μ M) a 37°C durante 3 h, se lavaron con PBS y se fijaron con 2% de paraformaldehído en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. El endosoma acidificado se identificó con LysoTracker rojo (Invitrogen) agregando el colorante (50 nM) a las células durante los últimos 30 minutos de la incubación antes de la fijación. La fijación fue seguida por lavados extensos en PBS y glicina 50 mM y finalmente los cubreobjetos se prepararon para el análisis por microscopía usando medio de montaje Vectashield para fluorescencia con DAPI (Vector Laboratories). Las muestras se analizaron por microscopía confocal utilizando un microscopio Leica TCS SP5 con un objetivo 63x/1.4 N.A. El análisis y procesamiento de imágenes se realizó con el software FIJI.

Los resultados se muestran en la FIGURA 15. El análisis de microscopía confocal muestra que ZKA190 (Fab o IgG) puede ingresar a células Vero solo cuando forma un

complejo con ZIKV, a concentraciones neutralizantes que exceden la IC₅₀ en 10,000 veces (FIGURA 15).

Ejemplo 9: Caracterización *in vivo* del mAb ZKA190 específico de EDIII

Para evaluar sus propiedades profilácticas y terapéuticas, se probaron ZKA190 y ZKA190-LALA en ratones A129 desafiados con una dosis letal de la cepa ZIKV MP1751 (linaje africano). Para probar sus potencias profilácticas, se administraron ZKA190 y ZKA190-LALA un día antes de la exposición al virus.

A ratones hembra A129 (receptor IFN-alfa/beta -/-) y ratones 129Sv/Ev de tipo silvestre de 5-8 semanas se les administró mAbs (ZKA190, ZKA190-LALA y el anticuerpo de control MPE8 (Corti, D., et al. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature* 501, 439-443 (2013)) diluido en PBS a diferentes dosis por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 500 µl. Los MAb se administraron ya sea 1 día antes o 1, 2, 3 o 4 días después de la exposición al virus. Los animales fueron desafiados por vía subcutánea con 102 pfu de ZIKV (cepa MP1751) y seguidos durante 14 días. Los pesos y las temperaturas se vigilaron diariamente y las observaciones clínicas se registraron al menos dos veces por día. El Día 5 después del desafío, se recolectaron 50 µl de sangre de cada animal en un tubo de protección de ARN (Qiagen, Reino Unido) y se congelaron a -80°C. Al final del estudio (14 días después del desafío) o cuando los animales cumplieron con los criterios de valoración humanos, se realizaron necropsias y se recolectaron sangre y secciones de cerebro, bazo, hígado, riñón y ovario para análisis virológicos.

Las muestras de tejido de ratones A129 se pesaron y se homogeneizaron en PBS usando perlas de cerámica y un homogeneizador automático (Precellys, Reino Unido) usando seis ciclos de 5 segundos de 6500 rpm con un espacio de 30 segundos. Se transfirieron 200 µl de homogeneizado de tejido o solución de sangre a 600 µL de solución amortiguadora RLT (Qiagen, Reino Unido) para la extracción de ARN utilizando el kit de extracción RNeasy Mini (Qiagen, Reino Unido); las muestras se pasaron a través de un QIAshredder (Qiagen, Reino Unido) como paso inicial. Se utilizó un ensayo de RT-PCR en tiempo real específico de ZIKV para la detección de ARN viral de animales objetivo. Las secuencias de cebador y sonda se adoptaron de Quick et al., 2017 (Quick, J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, Oliveira G, Robles-Sikisaka R, Rogers TF, Beutler NA, et al.: Multiplex PCR method for MinION and illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc* 2017, 12:1261-1276) con optimización doméstica y validación realizada para proporcionar condiciones óptimas de mezcla maestra y ciclización. La RT-PCR en tiempo real se realizó usando el kit Superscript III Platinum One-step qRT-PCR (Life Technologies, Reino Unido). La mezcla maestra final (15 µl) estaba compuesta por 10 µl de 2x Mezcla de Reacción, 1.2 µl de agua grado PCR, 0.2 µl de MgSO₄ 50 mM, 1 µl de cada cebador (Z1KV 1086 y ZIKV 1162c, ambos a 18 µM de concentración de trabajo), 0.8 µl de

sonda (ZIKV 1107-FAM a 25 μ M de concentración de trabajo) y 0.8 μ l de mezcla enzimática SSIII. Se agregaron cinco μ l de ARN plantilla a la mezcla maestra, produciendo un volumen de reacción final de 20 μ l. Las condiciones de ciclado utilizadas fueron 50°C durante 10 minutos, 95°C durante 2 minutos, seguidas de 45 ciclos de 95°C durante 10 segundos y 60°C durante 40 segundos, más una etapa de enfriamiento final de 40°C durante 30 segundos. El análisis de cuantificación usando fluorescencia se realizó al final de cada paso de 60°C. Las reacciones se ejecutaron y analizaron en la plataforma 7500 Fast (Life Technologies, Reino Unido) utilizando la versión 2.0.6 del software 7500. La cuantificación de la carga viral en las muestras se realizó utilizando una serie de diluciones de oligonucleótidos de ARN cuantificados (Tecnologías de ADN integradas). El oligonucleótido comprendía las 77 bases de ARN de ZIKV objetivo del ensayo, basado en el acceso de GenBank AY632535.2 y se sintetizó a una escala de 250 nmol con purificación por HPLC.

Los resultados se muestran en las FIGURAS 16A-16B, 17A-17D y 18A-18C. Se demostró que ZKA190 y ZKA190-LALA protegen a los ratones de la mortalidad y la morbilidad a concentraciones de 5, 1 o 0.2 mg/kg (FIGURA 16A-16B). ZKA190-LALA, y en menor medida ZKA190, retrasaron la morbilidad y la mortalidad en comparación con el grupo control a 0.04 mg/kg. Los títulos virales en sangre y órganos se redujeron significativamente en comparación con los animales tratados con anticuerpos de control, incluso en presencia de niveles de anticuerpos en suero inferiores a 1 μ g/mL (FIGURA 17A-17D).

Para evaluar el potencial terapéutico de ZKA190, se administra ZKA190 y ZKA190-LALA en diferentes puntos temporales después de la infección por ZIKV. Con una dosis de 15 mg/kg, se lograron tasas de supervivencia del 80% al 100%, y la morbilidad se redujo considerablemente incluso cuando el tratamiento se administró cuatro días después de la infección (FIGURA 16E-16G). El tratamiento con ZKA190 y ZKA190-LALA en todos los puntos temporales posteriores a la infección resultó en títulos virales significativamente reducidos, en comparación con los animales tratados con anticuerpos de control, con una clara tendencia a una mayor reducción con el tratamiento anterior (FIGURA 18A-16C). Es de destacar que ZKA190-LALA mostró una actividad antiviral significativamente reducida en la muestra de sangre del Día 5 en comparación con ZKA190 cuando se administraron mAbs cuatro días después de la infección, un resultado que podría estar relacionado con la capacidad deteriorada de la variante LALA para facilitar la rápida aclaramiento de viriones recubiertos.

De los 16 ratones tratados, se aisló un mutante de escape *in vivo* (mutante resistente a anticuerpos monoclonales 1, MARM1), que contiene una sustitución de aminoácidos en DIII (T335R, en el centro del epítipo), mientras que los virus de los otros ratones tratados no contenían ninguna mutación E. La introducción de la mutación T335R en el DIII recombinante mostró que derogaba la unión de ZKA190, según lo determinado por SPR (FIGURA 14; ref. Ejemplo 7 para métodos experimentales).

Ejemplo 10: Selección *in vitro* de mutantes de escape ZIKV

El uso de agentes terapéuticos de anticuerpos puede dar como resultado la selección de mutantes de escape. Para evaluar la capacidad de ZKA190 para seleccionar mutantes resistentes (MARM) *in vitro*, se pasó ZIKV (H/PF/2013) en presencia de concentraciones subneutralizantes de ZKA190.

Brevemente, se incubaron dos mil TCID₅₀ de H/PF/2013 ZIKV en 500 µl con 250 µl que contenían concentraciones variables de mAb (8 concentraciones diferentes, comenzando con una concentración final de 200 µg/mL y realizando diluciones en serie 1:4). La mezcla se incubó durante 45 minutos a 37°C, seguido de la adición de 250 µl de una suspensión de células de Vera (3.2 x10⁶ células) y una incubación en una placa de 24 pocillos durante tres o cuatro días a 37°C para permitir que ocurra la propagación del virus. Después de cada paso de selección, se seleccionaron 500 µl de sobrenadantes de tres condiciones: la concentración más baja de mAb a la que se observó la protección completa de la monocapa, una concentración a la que se observó un efecto parcial de CPE en la monocapa celular y una concentración a la que el 100% de la monocapa celular fue destruido por el ZIKV CPE. El tubo se centrifugó durante 5 minutos a 1000 x g, se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C. La mitad del volumen se mezcló nuevamente con concentraciones variables de mAb para repetir el proceso de selección y propagación. El sobrenadante restante se usó para ensayos de micro-neutralización y secuenciación posterior del virus.

Para identificar las mutaciones de escape del virus MARM seleccionado, se realizó una extracción de ARN genómico seguido de una PCR de un solo paso para amplificar y secuenciar el amplicón de la proteína ZIKV E. El sobrenadante celular (140 µl) de la selección MARMs se utilizó para la extracción de ARN con el mini kit QIAamp Viral RNA (Qiagen). La síntesis de ADNc y la amplificación por PCR se realizaron juntas usando la RT-PCR de un paso Superscript III con Platinum Taq (Invitrogen). Para una reacción, se mezclaron 25 µl de mezcla de reacción, 8 µl de agua estéril, 2 µM de cada cebador, 1 µl de salida de ARNasa (Life Technologies), 2 µl Superscript III RT/Platinum TaqMix y 12 µl de ARN dando un volumen de reacción final de 50 µl. Para la parte N-terminal de la proteína E, el par de cebadores Zika-E-F15'- TGCAAACGCCGTCGCAAACCTGCTTG-3'(SEQ ID NO: 266) y ZIKV-E-R15'- CGTGCCAAGGTAATGGAATGTCGTG-3' (SEQ ID NO: 267) y para la parte C-terminal, el par de cebadores ZIKV-Ef1530 5'-AGCCTAGGACTTGATTGTGAACCGA-3' (SEQ ID NO: 268) y ZIKV-E-R2769 5'-TTACAGATCCCACAACGACCGTCAG-3' (SEQ ID NO: 269) se usaron. Las condiciones de ciclización fueron 54°C durante 40 minutos, 94°C durante 2 minutos seguidos de 45 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 50°C durante 45 segundos y 68°C durante 1.5 minutos con un paso de alargamiento final a 68°C durante 5 minutos y una etapa de enfriamiento final a 4°C. Los productos de PCR se analizaron y extrajeron de un gel de agarosa al 1.5% y se purificaron adicionalmente con el ADN de GFX PCR y el kit de

purificación de banda de gel (GE Healthcare). Para la reacción de secuenciación, se mezclaron 8 µl de producto de PCR purificado con un cebador de 2 µM en un volumen final de 10 µl y se enviaron para la secuenciación (Microsynth). Los productos del terminal N de la proteína E se secuenciaron con ZIKV-E-F2 5'-ACTTGGTCATGATACTGCTGATTGC-3' (SEQ ID NO: 270) y ZIKV-E-R2 5'-TCGGTTCACAATCAAGTCCTAGGCT-3' (SEQ ID NO: 271), productos de PCR C-terminal con ZIKV-E-f2058 5'-GCTAACCCCGTAATCACTGAAAGCA-3' (SEQ ID NO: 272) y ZIKV-E-r2248 5'-AAGACTGCCATTCTCTTGGCACCTC-3' (SEQ ID NO: 273). Las secuencias se ensamblaron y analizaron utilizando el software CLC Main Workbench (CLC Bio, versión 5).

El mutante resistente MARM2 se aisló después de tres rondas de selección, y su proteína E mostró una mutación E370K en DIII. La mutación abolió la neutralización por ZKA190, aunque el anticuerpo puede unirse al DIII mutado (FIGURA 14). Las mutaciones en los MARMS *in vivo* (T335R) e *in vitro* (E370K) se encuentran en los bucles BC y DE de DIII, respectivamente, y son consistentes con el epítipo identificado por RMN.

Ejemplo 11: Desarrollo de anticuerpos biespecíficos según la presente invención

Los mutantes de escape viral pueden dificultar en gran medida la eficacia de los anticuerpos terapéuticos. Para superar este problema, los inventores actuales plantearon la hipótesis de que la posibilidad de escape de virus se reduciría en gran medida al combinar dos anticuerpos altamente neutralizantes. A la vista de ello, se generó una serie de anticuerpos biespecíficos que combinan ZKA190 con otros mAbs potentemente neutralizantes dirigidos hacia sitios distintos en la proteína E. De este modo, se centró en dos mAbs, ZKA185 y ZKA230, que son altamente neutralizantes y no compiten con ZKA190.

En primer lugar, se analizó su capacidad para neutralizar de forma cruzada cuatro cepas de ZIKV como se describió anteriormente. ZKA185 y, en menor medida, ZKA230, neutralizaron potencialmente cepas africanas, asiáticas y americanas con un IC₅₀ que oscilaba entre 0.02 y 0.62 nM (FIGURA 19A). ZKA185 se une con alta afinidad a la proteína E recombinante de ZIKV E y a las partículas similares al virus del Zika (VLP) pero no al DIII aislado (FIGURA 19B). Por el contrario, ZKA230 se unió a VLP de ZIKV, pero no a E o DIII recombinante, lo que sugiere que reconoce un epítipo cuaternario que se muestra solo en la superficie viral (FIGURA 19B). Se demostró que ZKA185 IgG y Fab se unen a antígenos E y VLP con alta afinidad similar por ELISA.

Para identificar los epítopos ZKA185 y ZKA230 y también su propensión a generar mutantes de escape, los MARM contra ZKA185 (MARM3) y ZKA230 (MARM4) se aislaron al hacer pasar virus en presencia de concentraciones de anticuerpos subneutralizantes como se describió anteriormente. MARM3 contenía sustituciones en K84E y D67H, que están ubicadas en DII (FIGURA 19D). MARM4 mostró una mezcla de diferentes sustituciones de aminoácidos en la posición 84 (de K a G, E o R), confirmada en múltiples experimentos de secuenciación.

Finalmente, los MARM 1 a 4 se probaron contra ZKA190, ZKA185 y ZKA230. ZKA190 neutralizó los MARM ZKA185 y ZKA230, así como el virus precursor (FIGURA 19C). ZKA185 neutralizó ambos MARMs ZKA190 y ZKA230. ZKA230 neutralizó solo ZKA190 MARM2 y no neutralizó ni ZKA190 MARM1 ni ZKA185 MARM3.

5 Para obtener información sobre el desarrollo de MARMs capaces de escapar de la presión de múltiples anticuerpos, ZKA190 MARM2 (E370K) se pasaron en serie en presencia de ZKA185 o ZKA230. De este modo, se descubrió que surgieron dobles MARM después de 3 a 4 pasajes. ZKA230 introdujo una mutación K84E adicional mientras que ZKA185, seleccionada para una mutación D76G. Estos hallazgos indican que el ZIKV puede escapar
10 de la neutralización mediante múltiples anticuerpos dirigidos a sitios distintos cuando la selección se realiza de forma gradual, y confirma una alta plasticidad de la proteína E del ZIKV. En conclusión, ZKA185 se seleccionó para usarse junto con ZKA190 para el desarrollo de un anticuerpo biespecífico, ya que neutraliza cruzadamente las cepas de ZIKV, se une a un sitio alternativo y no compite con ZKA190. El anticuerpo biespecífico se produjo en un formato
15 simétrico tetravalente llamado Fabs en tándem Ig (FIT-Ig). Los FIT-Igs se describen en detalle, por ejemplo, en el documento WO 2015/103072 A1 y en Gong S, Ren F, Wu D, Wu X, Wu C: Fabs-in-tandem immunoglobulin is a novel and versatile bispecific design for engaging multiple therapeutic targets. MABs 2017.

FIT-Ig puede producirse usando tres polipéptidos. El polipéptido 1 generalmente
20 comprende la cadena ligera del Fab externo fusionado, preferiblemente sin conectores, a la región N-terminal de la cadena pesada Fab interna. El polipéptido 2 generalmente comprende las regiones variables de cadena pesada y CH1 del Fab externo, y el polipéptido 3 generalmente comprende la cadena ligera del Fab interno. Por consiguiente, un anticuerpo del formato FIT-Ig generalmente comprende un "Fab interno" y un "Fab externo". Se generaron
25 dos tipos de FIT-Igs con ZKA190 Fab en la posición externa o interna. Brevemente, los tres genes que codifican para FIT-Ig fueron optimizados por codones, sintetizados por Genscript y clonados de la siguiente manera: i) el VL del Fab externo, seguido de la región constante completa (lambda o kappa), se fusiona con el VH del interno y clonado en el vector de expresión de Igy1 (modificado para codificar la mutación LALA). El polipéptido resultante 1
30 está formado por VL y CL del Fab externo, VH del Fab interno fusionado a los dominios IgG1 CH1-bisagra-CH2- CH3; ii) el gen VH del Fab externo (que codifica el polipéptido 2 formado por VH y CH1 del Fab externo) se clonó en el vector de expresión Fab (vector de expresión de Igy1 en donde se introduce un codón de detención después del codón que codifica la cisteína CH1 residuo 220); iii) el gen VL del Fab interno se clona en los vectores de expresión Igk o Igλ
35 (que codifica el polipéptido 3 formado por VL y CL del Fab interno). Los mAbs FIT-Ig recombinantes se produjeron por transfección transitoria de células EXPI293 (Invitrogen) usando una relación molar de 1:3:3 de las tres construcciones descritas anteriormente (como

se describe en el documento WO 2015/103072 A1), purificadas por cromatografía de proteína A (GE Healthcare) y desalado contra PBS. Las proteínas fueron analizadas por SDS-PAGE en condiciones reducidas y no reducidas y sus concentraciones determinadas por BCA (Pierce, Rockford, IL). En condiciones no reducidas, FIT-Ig migró como una banda única principal de aproximadamente 250 KDa. En condiciones reductoras, cada una de las proteínas FIT-Ig produjo dos bandas, una banda de MW más alta es el polipéptido 1 de aproximadamente 75 KDa, y una banda de MW más baja corresponde a los polipéptidos 2 y 3 traslapados a aproximadamente 25 KDa. Para estudiar más a fondo las propiedades físicas de FIT-Ig en solución, se usó la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para analizar cada proteína. Se aplicó FIT-Ig purificado, en PBS, en un Superdex 200 Increase 5/150 GL. Todas las proteínas se determinaron usando detección UV a 280 nm y 214 nm. Las proteínas FIT-Ig exhibieron un pico principal único, lo que demuestra la homogeneidad física como proteínas monoméricas.

Ejemplo 12: Caracterización *in vitro* de un anticuerpo según la presente invención.

(FIT-1)

El anticuerpo biespecífico FIT-Ig (designado aquí FIT-1) con ZKA190 en el exterior y ZKA185 en las posiciones Fab internas (FIGURA 19E) se seleccionó y caracterizó adicionalmente. ELISA mostró que FIT-1 se unía a DIII, E y VLP (FIGURA 19F). FIT-1 retuvo una alta potencia neutralizante contra las cepas de ZIKV, con valores de IC₅₀ muy similares a los de los anticuerpos precursores ZKA190 y ZKA185 (FIGURA 19G). FIT-1 se produjo usando el anticuerpo de columna IgG1 en el formato LALA, eliminando así cualquier posibilidad de causar ADE. Varias líneas de evidencia sugieren que las porciones ZKA190 y ZKA185 en el formato FIT-1 están activos. En primer lugar, FIT-1 se une a la proteína E con mayor afinidad que los anticuerpos precursores ZKA190 y ZKA185 (valores KD: ZKA185 1.8 nM, ZKA190 9.3 nM y FIT-1 KD <1 pM debido a una tasa de disociación más lenta, presumiblemente a través de los efectos de avidéz). En segundo lugar, FIT-1 neutralizó efectivamente todos los MARM ZKA190, ZKA185 y ZKA230 (FIGURA 19H) en contraste con los mAbs individuales. La actividad neutralizante del fragmento Fab de FIT-1 (cada uno de los cuales comprende un ZKA190 y un ZKA185) se redujo solo aproximadamente 6 veces (FIGURA 19I, panel derecho).

A continuación, se probó la capacidad de FIT-1 para seleccionar MARM (como se describió anteriormente). Sin embargo, a pesar de las ocho rondas de pasajes en serie, no se pudieron aislar MARM. Por el contrario, los MARM aparecieron después de 3 a 4 pases cuando se usaron mAbs individuales. Estos resultados sugieren que el uso de FIT-1 como terapéutico es más seguro, ya que es menos probable que ocurran mutaciones simultáneas en DIII y DII.

Los estudios de microscopía confocal con células Vero también mostraron que FIT-1, como ZKA190, probablemente inhibe la infección del virus en un paso posterior a la unión,

probable fusión (FIGURA 19J).

Finalmente, FIT-1, así como su fragmento Fab, bloquearon la ADE del plasma humano anti-DENV2 o DV62 a concentraciones superiores a 0.1 nM y 10 nM, respectivamente (FIGURA 19K), lo que demuestra que FIT-1 no causó ADE y podía bloquear ADE de células monocíticas por neutralización deficiente de anticuerpos de reacción cruzada.

Ejemplo 13: Potencial terapéutico *in vivo* de FIT-1

Para evaluar el potencial terapéutico de FIT-1, se administraron tres dosis diferentes (15, 5 y 1 mg/kg) en tres puntos de tiempo diferentes a ratones A129 hembra después de la infección por ZIKV. Brevemente, se asignaron ratones A129 hembras a 10 grupos distintos (control y tres dosis diferentes con tres puntos de tiempo de administración diferentes para cada dosis). Todos los animales fueron desafiados por vía subcutánea con 102 pfu ZIKV (cepa MP1751) y seguidos durante 14 días. Los ratones de los nueve grupos de tratamiento se administraron con anticuerpo biespecífico FIT-1 diluido en PBS a 15, 5 o 1 mg/kg por vía intraperitoneal (ip) en un volumen de 500 µl el Día 1, el Día 2 o el Día 3 después del desafío con el virus ZIKV. Los pesos y temperaturas de todos los animales se vigilaron diariamente y las observaciones clínicas se registraron al menos dos veces por día. El Día 5 después de la exposición, se recolectaron 50 µl de sangre de cada animal en un tubo de protección de ARN (Qiagen, Reino Unido) y se congelaron a -80°C. Al final del estudio (14 días después del desafío) o cuando los animales cumplieron con los puntos finales humanos, se realizaron necropsias y se recolectaron sangre y secciones de cerebro y ovario para análisis virológicos.

Los resultados se muestran en las FIGURAS 20A-20E. Los datos muestran que a una dosis de 15 mg/kg, las tasas de supervivencia fueron del 100% sin signos de morbilidad, incluso cuando el tratamiento se administró tres días después de la infección (FIGURA 20A); los títulos virales fueron anulados y no se detectaron mutantes de escape, lo que indica una alta eficacia *in vivo*. La administración de 5 mg/kg dio como resultado tasas de supervivencia del 70-100%, tampoco se detectaron mutantes de escape el Día 5 después de la infección. La dosis más baja probada (es decir, 1 mg/kg) protegida cuando se administra el Día 1 o 2, pero no el Día 3, después de la infección.

Ejemplo 14: Efecto de FIT-1 sobre la enfermedad en un modelo de infección congénita en ratones AG129

El efecto del tratamiento de madres infectadas con FIT-1 en las crías nacidas de las madres infectadas y tratadas se evaluó en un modelo de ratón de infección congénita con ZIKV, lo que resulta en descendencia viva después de la exposición congénita con ZIKV. En este modelo, se usan ratones AG129, deficientes en receptores de IFN, lo que da como resultado la replicación viral en la placenta, la transmisión del virus al feto y posibles implicaciones a largo plazo, como la restricción del crecimiento intrauterino y los déficits auditivos.

Se probó el efecto del tratamiento con FIT-1 sobre diversos parámetros en el contexto

de infección intrauterina. Con este fin, los ratones se infectaron con ZIKV 7 días después del coito (dpc) y se trataron con FIT-11 o 3 días después de la exposición al virus (ref. Ejemplo 13). Se evaluaron varios resultados de la enfermedad, como el título del virus en el feto y la placenta y la restricción del crecimiento intrauterino, para determinar el efecto del tratamiento con FIT-1.

Materiales y métodos:

Animales: se usaron 42 ratones hembra AG129. Grupos de animales fueron asignados aleatoriamente a grupos experimentales y marcados individualmente con etiquetas de oreja. El tratamiento hormonal se usó para inducir el estro en los sujetos femeninos. Las hembras se colocaron individualmente con los machos y se examinaron en busca de un tapón vaginal 0,5 días después del coito (dpc).

Virus: se utilizó el virus Malasia (P6-740). Se administró una dosis de desafío adecuada por vía s.c. inyección en un volumen de 0.1 mL.

Agente de prueba: FIT-1 se administró a una dosis de 45 mg/kg. El anticuerpo de control no específico MPE8-LALA Ctr IgG1 se usó como un tratamiento con placebo de control de isotipo.

Cuantificación del virus: El título del virus de varios tejidos se cuantificó usando un ensayo cuantitativo de RT-PCR. El ARN total se extrajo de muestras de tejido usando TRIzol (ThermoFisher Scientific, Cat # 15596018). Se usó un volumen de 2 µl de la preparación de ARN para la amplificación. Se usaron diluciones en serie de ARN sintético que abarca la región de amplificación para hacer un control positivo; el ARN de ZIKV sintético no diluido tenía $10^{8.0}$ copias/µl. Las muestras se sometieron a 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C después de un ciclo único inicial de 30 minutos a 50°C y 10 minutos a 95°C. Las muestras de cantidad desconocida se cuantificaron por extrapolación de valores de C(t) usando una curva generada a partir de diluciones en serie de ARN sintético de ZIKV.

Diseño del experimento: Las madres se expusieron 7 días después del coito (dpc) y se trataron con FIT-124 o 72 horas después de la exposición al virus. Se necropsiaron 2 madres por grupo 11 días después de la exposición al virus. La placenta, los tejidos fetales, el tejido cerebral y el tejido del bazo se recolectaron para la determinación del título del virus mediante QRT-PCR. 2 hembras por grupo fueron seguidas a través del parto. El diámetro occipito-frontal (OF) de la cabeza y la longitud de la grupa de la corona (CRL) de las crías se registró con un calibrador digital y la restricción del crecimiento intrauterino se determinó determinando el tamaño de la cría mediante la fórmula: CRL X OF. Los pesos de los cachorros y las presas se midieron en varios momentos.

Análisis estadístico: los datos de supervivencia se analizaron utilizando el análisis de supervivencia de intervalo logarítmico de Wilcoxon (Prism 5, GraphPad Software, Inc).

Resultados y discusión:

El tratamiento con FIT-1 se evaluó en un modelo de ratón de infección congénita y enfermedad asociada con la infección por ZIKV. El tratamiento con FIT-1 fue protector para los sujetos femeninos embarazadas con la gran mayoría de los sujetos femeninos tratadas protegidas de la mortalidad, independientemente de cuándo se administró el tratamiento (FIGURA 21). Los sujetos femeninos tratadas con un anticuerpo de control negativo no específico tenían una tasa de mortalidad similar a la observada en estudios previos.

Una tendencia hacia mediciones mejoradas en el tamaño promedio de las crías. El tamaño promedio de las crías de las presas tratadas con FIT-1 fue mayor que las tratadas con el control MPE8 y fueron similares a los animales infectados con simulación (FIGURA 22). Esta diferencia fue menos pronunciada con respecto al peso fetal, donde todos los grupos tuvieron promedios similares (FIGURA 23). Hubo una tendencia hacia un mayor peso de la placenta en las presas tratadas con FIT-1 (FIGURA 24).

El título del virus de varios tejidos se muestra en las FIGURAS 25A-25D. Se observó una reducción significativa en el ARN viral en el feto y la placenta de las madres tratadas con FIT-1 (FIGURA 25A y 25B, respectivamente). La reducción fue especialmente evidente en los tejidos placentarios con una reducción aproximada de 5 log₁₀ en los niveles de ARN de ZIKV. El bazo y el cerebro maternos también habían reducido significativamente el ARN viral en animales tratados con FIT-1 en comparación con MPE8, con varias reducciones log₁₀ en los niveles (FIGURA 25C y 25D, respectivamente).

Conclusiones:

En general, estos datos respaldan el papel protector de FIT-1 en la prevención o el tratamiento de enfermedades en fetos expuestos congénitamente al ZIKV. Se observó una tendencia hacia la mejora en los parámetros de tamaño fetal y placentario, con una reducción altamente significativa en el título del virus en varios tejidos maternos y fetales.

Ejemplo 15: Efecto de FIT-1 sobre la enfermedad en un modelo de infección testicular en ratones AG129

La transmisión sexual y la infección persistente del tracto reproductivo masculino se han documentado en hombres infectados con ZIKV (D'Ortenzio E, Matheron S, Yazdanpanah Y, et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. N Engl J Med 2016; 374: 2195-8). En la cepa de ratón AG129, la enfermedad grave generalmente se observa alrededor de 2 semanas después de la exposición al virus, incluida la replicación significativa del virus en los testículos de ratones (Julander JC, Siddharthan V, Evans J, et al. Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model. Antiviral Res 2016; 137: 14-22). Los sitios clave de replicación del virus en el tracto reproductivo de ratones machos AG129 incluyen el epidídimo y el testículo, así como varias glándulas sexuales accesorias.

En el presente estudio, el efecto de FIT-1 en ratones machos infectados con ZIKV se evalúa en el modelo de infección testicular. Con este fin, los ratones AG129 machos se infectaron con ZIKV y se evaluó la patología en el tracto reproductor masculino después de la infección por ZIKV y el tratamiento con FIT-1.

5 Materiales y métodos:

Animales: se usaron ratones machos AG129. Grupos de animales fueron asignados aleatoriamente a grupos experimentales y marcados individualmente con etiquetas de oreja.

Virus: virus Zika (cepa puertorriqueña, PRVABC-59). Se administró una dosis de desafío de 10^2 CCID₅₀ a través de inyección s.c. en el pliegue inguinal en un volumen de 0.1 mL. Esta dosis de desafío es típicamente letal en ratones AG129 no tratados con mortalidad que ocurre alrededor de 2 semanas después del desafío.

Agente de prueba: FIT-1 se administró a una dosis de 15 mg/kg. El anticuerpo de control no específico MPE8-LALA Ctr IgG1 se usó como un tratamiento con placebo de control de isotipo.

Histopatología. Los tejidos se recolectaron e incubaron durante 24 horas en formalina amortiguada neutra. Después de la fijación apropiada, todos los tejidos recolectados se recortaron y se mantuvieron en etanol al 70% hasta que se realizó el procesamiento de rutina, la inclusión en parafina y el seccionamiento. Todos los tejidos fueron analizados a ciegas de forma independiente por un residente de patología anatómica veterinaria y un patólogo anatómico veterinario certificado. Se desarrolló un sistema de puntuación para calificar la gravedad de la inflamación en el tracto reproductivo.

Diseño del experimento: Los ratones se infectaron con ZIKV y se vigilaron durante 28 días después del desafío con virus para la supervivencia y el cambio de peso. El tratamiento con 15 mg/kg de FIT-1 se realizó 24 o 72 h después de la exposición al virus. Se administró un único tratamiento i.p. en un volumen de 0.1 mL. Se administró un control de isotipo combinado Ab, MPE8-LALA Crt IgG1, como se describió anteriormente con tratamiento que tuvo lugar 24 h después de la exposición al virus. Se incluyó un grupo de ratones tratados con FIT-1 infectados de forma simulada como controles de toxicidad y se incluyó un grupo de controles normales. Se tomaron pesos individuales en 0, y cada dos días de 7-21 dpi. Los ratones se observaron diariamente para detectar signos de enfermedad, como conjuntivitis, encorvados y debilidad o parálisis de las extremidades, y se registró la aparición inicial de signos de enfermedad. Se realizó una autopsia de una cohorte de 3 animales a 6 dpi y se recolectaron muestras de tejido para análisis histopatológico.

Análisis estadístico: Los datos de supervivencia se analizaron utilizando el análisis de supervivencia de intervalo logarítmico de Wilcoxon (Prism 5, GraphPad Software, Inc).

Resultados y discusión:

El virus del Zika (ZIKV) puede persistir en los tejidos reproductivos masculinos durante

períodos prolongados de hasta seis meses, lo que representa un objetivo claro para el tratamiento antiviral. Para determinar la eficacia de un Ab anti-ZIKV biespecífico en la prevención o reducción de la patología del tracto reproductivo masculino, se trataron grupos de ratones 24 o 72 h después de la exposición al virus con un aislado puertorriqueño de ZIKV.

- 5 La supervivencia, el cambio de peso y la histopatología se usaron para determinar la eficacia del tratamiento con mAb. Se usó un mAb de control de isotipo, MPE8-LALA Ctr IgG1, como tratamiento con placebo.

Se observó una mejora significativa ($P < 0.05$) en la supervivencia en comparación con el tratamiento con mAb placebo (FIGURA 26). Se observó una supervivencia completa en
10 ratones tratados 24 h después del desafío con FIT-1, mientras que los ratones tratados a las 72 h posteriores a la inoculación del virus dieron como resultado un animal que sucumbió a la infección por el virus. Este único animal fue sacrificado 24 días después de la exposición al virus, que fue mucho más tarde que los animales tratados con placebo (FIGURA 26). Dado que la infección de ratones AG129 con ZIKV produce letalidad, que es mucho más grave que
15 una infección natural típica con este virus, los altos niveles de protección que se observan con FIT-1 son muy prometedores.

El cambio de peso promedio de los ratones tratados con FIT-1 fue similar al de los controles de tratamiento infectados con simulación, mientras que el peso promedio de los ratones tratados con MPE8 disminuyó rápidamente después de 7 dpi, lo que demuestra aún
20 más la potente protección de los ratones contra la enfermedad (FIGURA 27).

Dado que el objetivo principal de este estudio era evaluar los efectos del tratamiento en el tracto reproductivo masculino, y en estudios previos los testículos y los epidídimos fueron los más severamente afectados después de la infección, se prestó especial atención a la histopatología de estos tejidos. No se observó enfermedad en el testículo o el epidídimo de
25 ratones tratados con FIT-1, aparte de un solo animal en el grupo de tratamiento de 24 h (FIGURAS 28A-28B), lo que demuestra aún más la eficacia del tratamiento con FIT-1. FIT-1 también protegió a los ratones de la enfermedad cuando se inició el tratamiento 72 h después de la exposición al virus y ninguno de los ratones tratados en este momento tenía enfermedad observable en el testículo o el epidídimo (FIGURAS 28A-28B). La mayoría de los ratones en el
30 grupo de tratamiento con placebo tenían inflamación en el testículo (2/3) y el epidídimo (3/3) (FIGURAS 28A-28B), aunque la gravedad de la enfermedad en este estudio fue bastante leve.

Conclusiones:

El tratamiento con FIT-1 fue efectivo para reducir todos los parámetros evaluados de la enfermedad. El tratamiento terapéutico hasta 72 h después de la exposición al virus fue
35 altamente eficaz.

Ejemplo 16: eficacia profiláctica y terapéutica de FIT-1 en macacos rhesus desafiados con ZIKV

Este estudio evaluó la eficacia profiláctica y terapéutica de un anticuerpo biespecífico dirigido contra el virus Zika (ZIKV) en macacos rhesus indios (IRM) desafiados con la cepa ZIKV PRVABC59.

- 5 Dieciséis (16) MRI se asignaron al azar en tres grupos de tratamiento. Un grupo recibió FIT-1 un día antes del desafío (5 mg/kg) y un segundo recibió el tratamiento un día después del desafío (15 mg/kg). Un tercer grupo fue tratado con un control de isotipo (FIT-3, 5 mg/kg) un día antes del desafío. En el Día 0, todos los IRM fueron desafiados con 1×10^5 PFU de la cepa PRVABC59 de ZIKV administrada por inyección subcutánea (SC). Se recolectaron sueros, orina y saliva en puntos
- 10 de tiempo predeterminados y se analizaron para determinar la carga de ZIKV medida por RT-PCR cuantitativa.

Métodos:

- Antes del día de estudio 0, dieciséis (16) IRM se aleatorizaron en grupos respectivos según el género/peso usando el software Provantis. En los días -1 o 1, los animales recibieron
- 15 ya sea FIT-1 o FIT-3 de control de isotipo administrado por vía intravenosa a la dosis indicada en la Tabla 4 a continuación. El Día 0, todos los macacos fueron anestesiados y sometidos a prueba con 0.5 mL de cepa de ZIKV de tipo natural PRVABC59 con una dosis de desafío objetivo de 1.0×10^5 PFU por animal mediante inyección subcutánea. Se recolectaron muestras de sangre, orina y saliva en puntos de tiempo predeterminados como se indica en la Tabla 5
- 20 para una evaluación de la carga viral por RT-qPCR.

Tabla 4: Agrupaciones de animales

Grupo	Tratamiento	Día de Tratamiento	Ruta, Dosificación	Desafío ¹
1 (3M/3F)	FIT-1	Día -1	i.v., 5 mg/kg	PRVABC59 (1×10^5 PFU)
2 (3M/3F)	FIT-1	Día +1	i.v., 15 mg/kg	PRVABC59 (1×10^5 PFU)
3 (2M/2F)	FIT-3	Día -1	i.v., 5 mg/kg	PRVABC59 (1×10^5 PFU)

- 30 ¹Subcutáneamente desafiado en el Día 0 con 0.5 mL de tipo natural Z1K.V.

Tabla 5: Actividades clave

Día del estudio:	-1	0	1	5	10	15	20	25	30
Tratamiento	✓		✓						
Desafío con ZIKV (s.c.)		✓							
Observaciones diarias		Todos los animales se observaron dos veces al día							
Peso corporal		Diariamente				✓	✓	✓	✓

	Temperatura corporal		Diariamente			✓	✓	✓	✓
	Recolecciones sanguíneas ¹		Diariamente			✓	✓	✓	✓
	Recolecciones de orina/saliva		✓		✓	✓	✓	✓	✓
	Carga viral: RT-qPCR		Diariamente			✓	✓	✓	✓
5	Volumen sanguíneo (mL)		2			2	2	2	20
	Eutanásia								✓

¹El Día 0 y 1 se recolectó sangre antes del desafío y el tratamiento.

En los días de estudio -1 (Grupos 1 y 3) y 1 (Grupo 2) se administraron a los animales anestesiados con FIT-1 (concentración de solución madre: 3.67 mg/mL) o FIT-3 (concentración de solución madre: 3.79 mg/mL) mediante inyección intravenosa en las venas safenas o cefálicas correctas.

La cepa ZIKV PRVABC59; Humano/2015/Puerto Rico (American Isolate) fue el material de desafío utilizado en este estudio. La preparación del inóculo del virus se realizó en un gabinete de seguridad biológica de clase II en condiciones BSL-2. La solución madre de virus se descongeló en un baño de agua a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, se agitó en vórtex y se diluyó con VP-SFM para producir un inóculo de la concentración apropiada de 2×10^5 PFU/mL. Cada jeringa se llenó con 0.5 mL de inóculo de virus y se mantuvo en hielo hasta que se transfirió a la instalación animal para la dosificación. En el día de estudio 0, todos los animales fueron anestesiados, se cortó el sitio de inyección, se limpió con alcohol y se marcó con un marcador indeleble. Los animales se inocularon SC en la superficie anterior del antebrazo izquierdo con 0.5 mL del aislado ZIKV y la dosis indicada en la Tabla 4.

Todos los macacos se observaron dos veces al día durante los períodos de cuarentena y estudio en busca de signos de morbilidad y mortalidad. Se observaron animales dos veces al día (a intervalos no menores de 8 horas) para la respuesta y los signos clínicos que incluyen erupción cutánea, eritema, conjuntivitis, secreción ocular e hinchazón. Para todos los animales, se recolectó sangre en los puntos de tiempo indicados en la Tabla 5 para las pruebas *in vitro* mediante carga viral RT-qPCR. Durante el sangrado terminal el Día 30, se recolectó un volumen que no excedía de 20 mL por animal. Para todos los animales, la orina se recolectó en los puntos de tiempo indicados en la Tabla 5 para la prueba *in vitro* a través de RT-qPCR para controlar la eliminación del virus. Los animales fueron alojados individualmente durante los períodos de recolección de orina del estudio. La orina se recolectó directamente de los recipientes de la jaula, se colocó en hielo húmedo después de la recolección, se separó en alícuotas y se almacenó a -70°C o menos hasta que esté listo para la prueba de ensayo. Se recolectó saliva (baba) de animales anestesiados directamente en tubos (hasta aproximadamente 0.5 mL). Las muestras se mantuvieron en hielo húmedo después de la recolección y se almacenaron a -70°C o menos hasta que estén listas para la prueba de

ensayo.

Las cargas virales se midieron usando un método RT-qPCR para la detección de genomas de ZIKV en las muestras de suero, orina y saliva recolectadas en los puntos de tiempo indicados en la Tabla 5. Las muestras recuperadas de animales inoculados con virus se analizaron usando cebadores y sondas diseñados para la detección de la cepa ZIKV PRVABC59. Se ha publicado una descripción de los métodos de PCR, incluidas las secuencias de cebadores y de sonda (Goebel et. al., 2016, A Sensitive virus yield assay for evaluation of antivirals against Zika virus. J. Virol. Methods). El ARN viral se aisló de fluidos biológicos usando el mini kit QIAmp Viral RNA (Qiagen, 52906). El ARN viral se eluyó con H₂O estéril libre de RNasa y DNasa y se almacenó a -70°C o menos. Se determinó que el límite inferior de cuantificación (LLOQ) de este ensayo era de 10 copias por reacción.

Una alícuota del inóculo del virus de desafío se tituló de nuevo mediante un ensayo de placa estándar en células Vero para confirmar la dosis administrada real. Se usaron diluciones en serie de diez veces del inóculo de desafío para infectar monocapas confluentes de células Vero en placas de 6 pocillos que se colocaron en placas el día anterior. Las placas se incubaron a 37°C y CO₂ al 5% durante 1 hora antes de la adición de medios de recubrimiento que contenían agarosa al 0.5%. Las placas se incubaron durante 3 días hasta que se formaron placas discernibles, después de lo cual se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y se contaron.

20 Resultados:

Los macacos fueron vigilados dos veces al día para detectar signos de mortalidad y morbilidad durante la duración del estudio. Todos los animales sobrevivieron a la terminación programada. El peso corporal y la temperatura de todos los animales se midieron en los puntos de tiempo indicados en la Tabla 5. No hubo una pérdida significativa de peso corporal durante el curso del estudio. Todos los animales mantuvieron un intervalo normal de temperaturas corporales durante todo el estudio. Las observaciones clínicas se limitaron a un leve enrojecimiento en el sitio de desafío en algunos animales.

Las cargas virales se midieron usando un método RT-qPCR para la detección de genomas de ZIKV en muestras de suero, orina y saliva recolectadas en los puntos de tiempo indicados en la Tabla 5. La carga viral en el suero se presenta en la FIGURA 29.

Los animales en el Grupo 3, tratados con el control de isotipo, tenían una carga viral detectable en el suero el día siguiente al desafío. La carga viral en tres de los cuatro animales alcanzó su punto máximo por encima de 1×10^5 copias del genoma/mL (GC/mL) ya sea en el Día 2 o 3. La carga viral sérica promedio alcanzó su punto máximo en este grupo el Día 3 a 1.15×10^5 GC/mL. Las cargas virales disminuyeron por debajo del LLOQ del ensayo (860 GC/mL) para el Día 4 en un animal y para el Día 5 en los tres restantes.

Los animales del Grupo 2, tratados con 15 mg/kg de F1T-1 el día después del desafío,

tenían una carga viral promedio de 3.99×10^3 GC/mL antes del tratamiento. En el Día 2, la carga viral sérica promedio disminuyó a solo 96.5 GC/mL. Si bien se detectaron esporádicamente bajos niveles de ARN viral después del Día 1, en ningún momento después del tratamiento se detectaron cargas virales en animales del Grupo 2 en el LLOQ del ensayo RT-qPCR o superior.

El pretratamiento con 5 mg/kg de FIT-1 disminuyó la carga viral sérica promedio del Día 1 en más de 50 veces en comparación con el Grupo 3. En ningún momento después del desafío se detectaron cargas virales iguales o superiores al LLOQ del ensayo, y para el Día 2 no se detectó ARN viral en el suero de ninguno de los animales del Grupo 1.

Solo se detectaron niveles bajos y esporádicos de ARN de ZIKV en la orina o la saliva de cualquiera de los animales. En ningún momento se detectaron cargas virales iguales o superiores al LLOQ del ensayo en orina o saliva de ningún animal.

Una alícuota del inóculo del virus de desafío se tituló de nuevo mediante un ensayo de placa estándar en células Vero para confirmar la dosis administrada real. El ensayo en placa produjo un título de 1.7×10^5 PFU/mL.

Resumen y conclusiones:

Este estudio evaluó la eficacia profiláctica y terapéutica de FIT-1 en IRMs desafiados con ZIKV. No hubo mortalidad durante el transcurso del estudio y las observaciones clínicas se limitaron a un enrojecimiento leve en el sitio de desafío en algunos animales. La carga viral detectada por RT-qPCR en suero recolectado después de la exposición fue el punto final primario del estudio. El ARN viral se detectó fácilmente en el suero de todos los animales tratados con el control de isotipo, con cargas virales que alcanzaron su punto máximo en los días 2 o 3 y se mantuvieron a niveles superiores al LLOQ de 860 GC/mL hasta los días 4 o 5. La carga máxima promedio fue de 1.15×10^5 GC/mL en el Día 3. Por el contrario, el tratamiento profiláctico con 5 mg/kg de FIT-1 redujo efectivamente las cargas virales máximas y el tiempo para la eliminación viral en los IRMs desafiados por ZIKV. Se detectaron niveles bajos de ARN viral en los seis animales de este grupo el Día 1, pero para el Día 2, no se detectó ARN viral en ningún animal. En ningún momento se detectó ARN de ZIKV por encima del LLOQ de 860 GC/mL en el suero de cualquier animal de este grupo. Del mismo modo, el tratamiento terapéutico con 15 mg/kg de FIT-1 al día siguiente del desafío redujo tanto las cargas virales máximas como el tiempo de eliminación viral del suero en comparación con los animales tratados con el control de isotipo. Los macacos del Grupo 2 tuvieron una carga viral máxima promedio de 3.99×10^3 GC/mL en el Día 1, pero después del tratamiento en el Día 1, las cargas virales promedio en el suero de este grupo disminuyeron a solo 96.5 GC/mL en el Día 2. Ningún animal en este grupo tuvo cargas virales por encima del LLOQ de 860 GC/mL durante el resto del período de observación.

Tablas de secuencias y números de identificación SEQ

	ZKA190	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
5	CDRH1	1	GFTFSKYG
	CDRH2	2	ISYEGSNK
	CDRH3	3	AKSGTQYYDDTTGYEYRGLEYFGY
	CDRL1	4	QSVSSSY
10	CDRL2	5	DAS
	CDRL2 largo	6	LIYDASSRA
	CDRL3	7	QQYGRSRWT
15	VH	8	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSKYGMHWVRQAPGKGLE WVAV ISYEGSNK YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYC AKSGTQYYDDTTGYEYRGLEYFGY WGQGTLVTVSS
20	VL	9	EIVLTQSPGTL LSLSPGERATLSCRAS QSVSSSY LAWYQQKRGQAPR LLIY DASSR ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQY GRSRWT FGQGTKVEIK

	ZKA190	SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
	CDRH1	10	ggattcaccttcagtaa atattggc
25	CDRH2	11	atatcatatgaggg aagtaataaa
	CDRH3	12	gcgaaatcggggaccca atactatgatactactggttatg agtataggggtttgga atactttggctac
	CDRL1	13	cagagtgttagtag cagttac
	CDRL2	14	gatgcatcc
30	CDRL2 largo	15	ctcatctat gatgcatcc agcaggggcc

5

10

15

CDRL3	16	cagcagtatggttaggtcaaggtggaca
VH	17	caggtgcagctggtggagctctgggggagggcgtggtccagc ctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctct ggatt caccttcagtaaatatggc atgcaactgggtccgccaggt ccaggcaaggggctggagtggtggcagtt atatcatatg agggaagtaataaat attatgcagactccgtgaagggccg attcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat ctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggcagtg attactgt gcgaaatcggggacccaatactatgatactac tggttatgagtataggggtttggaatactttggctactg ggccagggaaccctgggtcaccgtctcctcag
VL	18	gaaattgtgttgacgcagctctccaggcaccctgtctttgt ctccaggggaaagagccaccctctcctgcaggggccagt ca gagtggttagtagcagttact tagcctggtagcagagaaa cgtggccaggctccaggctcctcatctat gatgcatcca gcaggggccactggcatcccagacaggttcagtggcagtg gtctgggacagacttcactctcaccatcagcagactggag cctgaagattttgcagtgattactgt cagcagtatggta ggtcaaggtggaca ttcggccaagggaaggtggaaat caaac

20

25

30

ZKA185	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
CDRH1	19	GYSFTSYW
CDRH2	20	FDPDSQT
CDRH3	21	ARRYCSSSSCYVDN
CDRL1	22	ALPNKF
CDRL2	23	EDN
CDRL2 largo	24	VIY EDN KRP
CDRL3	25	YSTDSSSNPLGV
VH	26	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSG GYSFTSYW ITWVRQMPGKGLE WMAK FDPDSQT NYSPSFQGHVTISVDKSI STAYLQWSS LKASDTA MYYC ARRYCSSSSCYVDN WGQGTLV TIFS

35

VL	27	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGD ALPNKF AYWYRQKSGQAPVLV IY EDN KRPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYHC YSTDS SSNPLGV FGGGTKLTVL
----	----	---

5	ZKA185	SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
	CDRH1	28	ggatata gtttttaccagttactgg
	CDRH2	29	tttgatcctagtgactctcaaacc
10	CDRH3	30	gcgagaagatattgtagtagtagtagttgttatgtggacaa t
	CDRL1	31	gcattgccaaataaaattt
	CDRL2	32	gaggacaac
	CDRL2 largo	33	gtcatctat gaggacaac aaacgaccc
15	CDRL3	34	tactcaacagacagcagttcta atcccctgggagta
20	VH	35	gaagtgcagctgggtgcagtcgagcagaggtgaaaaagcc cggggagtctctgaggatctcctgtaaggggtct ggatata gtttttaccagttactgg atcacctgggtgcgccagatgcc gggaaaggcctggagtggatggcgaagt tttgatcctagtga ctctcaaacc aactacagccgctccttccaaggccacgtca ccatctcagttgacaagtcacatcagcactgcctacttgag tggagcagcctgaaggcctcggacaccgccatgtattactg t gcgagaagatattgtagtagtagtagttgttatgtggaca attggggccaggga accctggtcaccatcttctcag
25	VL	36	tcctatgagctgacacagccaccctcggtgtcagtggtccc aggacaaacggccaggatcacctgctctggagat gcattgc caaataaaattt gcttattggtaccggcagaagtcaggccag gcccctgttctgggtcatctat gaggacaac aaacgacccctc cgggatccctgagagattctctggctccagctcagggacaa tggccaccttgactatcagtgggggccagggtggaggatgaa gctgactaccactgt tactcaacagacagcagttcta atcc cctgggagta ttcggcggaggga ccaagctgaccgtcctag
30			

ZKA230	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
--------	------------------	--------------------------

5	CDRH1	37	GGSISSDY
	CDRH2	38	IYYSGST
	CDRH3	39	ARRRKYDSLWGSFAFDI
	CDRL1	40	SSNIGGNY
	CDRL2	41	IND
10	CDRL2	42	LIC IND HRP
	largo		
	CDRL3	43	ATWDDSLGGLV
	VH	44	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSG GGSISSDY WSWIRQPPGKGLE WIGY IYYSGST NYNPSLKSRTISVDTSKNHFSCLKNSVTAAADTAV YYC ARRRKYDSLWGSFAFDI WGQGTMTVSS
15	VL	45	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSS SSNIGGNY VYWYQQLPGTAPK LLIC IND HRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC ATW DDSLGGLV FGGGTKLTVL

20	ZKA230	SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
	CDRH1	46	ggtggctccatcagtagtgactac
	CDRH2	47	atctattacagtgggagcacc
	CDRH3	48	gcgaggaggaggaagtatgattccctttgggggagttttgc ttttgatatac
25	CDRL1	49	agctccaacatcggaggtaattat
	CDRL2	50	attaatgat
	CDRL2 largo	51	ctcatctgt attaatgat cacggccc
	CDRL3	52	gcaacatgggatgacagcctgggtggccttgta

30

35

5	VH	53	caggtgcagctgcaggagtcgggcccaggcctggtgaagcc ttcggagaccctgtccctcacctgcgcagtcctct ggtggct ccatcagtagtgactact ggagctggatccggcagcccca gggaagggactggagtggattgggtat atctattacagtgg gagcacca actacaacccctccctcaagagtcgagtcacca tatcagtagacacgtccaagaaccacttctccctgaagctg aactctgtgaccgctgcggacacggccggtgtattactgt gc gaggaggaggaagtatgattccctttgggggagttttgctt ttgatata ctggggccaagggacaatggtcaccgctctctca g
10	VL	54	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccc cgggcagaggggtcaccatctcttgttctggaag cagctcca acatcggaggtaattat gtatactggtagcagctcca ggaacggcccccactcctcatctgt attaatgat caccg gccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctg gcacctcagcctccctggccatcagtgggctccagtcagag gatgaggctgattattactgt gcaacatgggatgacagcct gggtggccttgtat tcggcggagggaaccaagctgaccgtcc tag
15			

20	ZKA78	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	55	GFTFSNYA
	CDRH2	56	IGRNGDSI
	CDRH3	57	VKDLAIPESYRIEADY
25	CDRL1	58	QSVLYRSNNKNY
	CDRL2	59	WAS
	CDRL2 largo	60	LIYWASTRE
	CDRL3	61	QQYYSSPRT
30	VH	62	EVQLAESGGGLVQPGGSLTSCSGS GFTFSNYA MVWARQAPGKGLE YVSG IGRNGDSI YYTDSVKGRFTISRDNKSMVYLQMSSLRTEDTA VYYC VKDLAIPESYRIEADY WGQGTLVIVSA
35	VL	63	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSVLYRSNNKNY LSWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISPLQAEDVAVY YC QQYYSSPRT FGQGTKVEIK

	ZKA78	SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
	CDRH1	64	ggcttcacttttagtaactatgca
	CDRH2	65	atcggggcgcaacggggactctatc
5	CDRH3	66	gtgaaagatctggccatccccgagtcctacagaattgaagctgattat
	CDRL1	67	cagtcctgtgctgtaccgctctaacaacaagaattac
	CDRL2	68	tgggcttca
10	CDRL2 largo	69	ctgatctatt tgggcttca acccgggaa
	CDRL3	70	cagcagttactattctagtcctcgaact
15	VH	71	gaggtgcagctggcagaatcaggcgggggactgggtccagc ctggcggcagcctgacactgtcttgagtgatcaggtt cacttttagtaactatgca atgggtgtgggcaaggcaggct cctgggaagggactggagtatgtctctggc atcggggcgca acggggactctatct actatactgatagtgtgaaggccg gttcaccatcagcagagacaatagcaaatccatgggtgtac ctgcagatgagctccctgcgaaccgaagacacagcagtg actattgc gtgaaagatctggccatccccgagtcctacag aattgaagctgattatt ggggacagggcaccctgggtcatc gtgagcgccg
20	VL	72	gacatcgtgatgacacagtctccagatagtctggcagtc gtctgggggagagggccactattaactgcaagagctcc ca gtccgtgctgtaccgctctaacaacaagaattac ctgtct tggtatcagcagaagcccggacagccccctaaactgctga tctatt tgggcttca acccgggaaagcggcgtcccagacag attctcaggcagcgggtccggaacagacttcaccctgaca attagccccctgcaggcagaggacgtggctgtctactatt gt cagcagttactattctagtcctcgaact ttcggccaggg gaccaagggtggaaatcaaac

30	ZKA64	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	73	GYTFTGYH
	CDRH2	74	INPNSGGT

5	CDRH3	75	ARMSSSIWGF DH
	CDRL1	76	QSVLIN
	CDRL2	77	GAS
	CDRL2	78	LIY GASSRA
	CDRL3	79	QQYNDWPPIT
10	VH	80	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGYH IDWVRQARGQGLE WMGR INPNSGGT NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMQLSRLRSDDSA VYYC ARMSSSIWGF DH WGQGLVTVSS
	VL	81	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS QSVLIN LAWYQQKPGQAPRL LIY GASSRATG IPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QQYN DWPPIT FGQGRLEIK

15	ZKA64	SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
20	CDRH1	82	ggctacaccttcacaggggtatcac
	CDRH2	83	attaaccctaattctggcgggacc
	CDRH3	84	gctcggatgagctcctctat tttggggcttcgatcat
	CDRL1	85	cagtctgtgctgattaac
	CDRL2	86	ggagcatcc
25	CDRL2	87	ctgatctat ggagcatcc tcagggt
	CDRL3	88	cagcagtacaatgattggccccctatcaca
	VH	89	caggtgcagctggtccagagcggagcagaggtgaagaaacc cggcgccctcagtgagggtcagctgcaaagcttc cggtaca ccttcacaggggtatcac atcgactgggtgaggcaggcaaga ggacagggactggaatggatgggacgg attaaccctaattc tggcgggacca aactacgcccagaagtttcaggggccgagtga ctatgaccagagacaccagcatctccacagcttatatgcag ctgtcccggctgagatctgacgatagtgccgtctactattg t gctcggatgagctcctctat tttggggcttcgatcattggg ggcaggggaactggtgactgtcagttcag

5	VL	90	gagatcgtgatgactcagtcctccagccaccctgtcagtcag cccaggagaacgggcaaccctgtcttgcagagcctccc agt ctgtgctgattaac ctggcttggtagcagcagaagccaggc caggcaccgccgactgctgatctat ggagcatcc ccagggc taccggcattcctgcacgcttcagtgatcaggaagcggaa cagagtttaccctgacaatctctagtctgcagtcgaagac ttcgtgtctactattgt cagcagtacaatgattggccccc tatcacatt tgccagggggactagactggagatcaagc
---	----	----	--

	Regiones constantes	SEQ ID NO.	Secuencia
10			ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYCKKVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
15	IgG1 CH1-CH2- CH3 aa	91	
20	IgG1 CH1-CH2- CH3 LALA aa	92	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYCKKVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
25	IgG CK aa	93	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
25	IgG CL aa	94	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
30			gcgtcgaccaagggcccatcggtctccccctggcaccctcctcaagagcac ctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtaaggactactccccgaac ctgtgacggctcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacctcc cggctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtagccgtgc cctccagcagctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccc agcaacaccaaggtggacaagagagtgagcccaaatctgtgacaaaactca cacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttctct ctccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctccggacccctgaggtca catgcgtggtggtggacgtgagccacgaAgaCctgaggtcaagttaactgg tacgtggacggcgtggagggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagc agtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggact
35	IgG1 CH1-CH2- CH3 nucl	95	

5		ggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctccaacaaagccctcccagc ccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccac aggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcag cctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggga gagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctgga ctccgacggctccttctctatagcaagctaccgtggacaagagcaggtg gcagcaggggaaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacca ctacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa
10		gcgtcgaccaagggcccacgtcttccccctggcaccctctccaagagcac ctctgggggacagcggccctgggtgcctggtaaggactacttccccgaac ctgtgacggctcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacctcc cggctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtagcgtgc cctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccc agcaacaccaagggtggacaagagagttgagccaaatctgtgacaaaactca cacatgcccacgtgcccagcacctgaaGCCGCCgggggacccgtcagtc ttctcttcccccaaaaacccaaggacaccctcatgatctccggaccctgag gtcacatgcgtgggtgggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaac tggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagg agcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccag gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctccc agccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaac cacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggt cagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagt ggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgct ggactccgacggctccttctctatagcaagctaccgtggacaagagcag gtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaca ccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa
15		
20	IgG1 CH1-CH2- CH3 LALA nucl	96
25	IgG CK nucl	97
30	IgG CL nucl	98

	ZKA3	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	99	GFIFSNYA
35	CDRH2	100	IGGKGDSI

	CDRH3	101	VKDLAVLESDRLEVDQ
	VH	102	EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCSGS GFTFSNY AMVWARQAP GKGGLEYVSG IGGKGDSI YHIDSVKGRFTISRDN SKRTVYLQ MSRLRTEDTAVYYC VKDLAVLESDRLEVDQ WGQGLVIVSA
5	ZKA4	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	103	GFTFSSYV
	CDRH2	104	TSYDGSNK
	CDRH3	105	ARGPVPYWSGESYS GAYFDF
10	VH	106	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYV MHWVRQAP GKGLEWVT TSYDGSNK YYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQ MNSLRGEDTAIYYC ARGPVPYWSGESYS GAYFDFWGQGILV TVSS
	ZKA5	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
15	CDRH1	107	GFTFSNYY
	CDRH2	108	MSSSETIK
	CDRH3	109	ARSGIETVAGSIDYY GMDV
20	VH	110	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAGS GFTFSNYY MTWIRQAP GKGLELVSY MSSSETIK YYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQ MNSLRADDTARYYC ARSGIETVAGSIDYY GMDVWGHGTPVT VSS
	ZKA6	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	111	DFTVSNYA
25	CDRH2	112	VSYDGSNK
	CDRH3	113	ATGVTMFQGAQTNAEYLHY
	VH	114	QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCEAS DFTVSNYA MHWVRQAP GKGLEWVAV VSYDGSNK YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTALYYC ATGVTMFQGAQTNAEYLHY WGQGS LVT ISS
30	ZKA7	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	115	GFTFSRYG
	CDRH2	116	VSGDGSST
35	CDRH3	117	VKDFWSGDQSLESDF

5	VH	118	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSAS GFTFSRYGMVWARQAP GKGLEYL SGVSGDGSST YYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLH MSRLRDEDTAMYYC VKDFWSGDQSLESDFW QGALVTVSS
	ZKA8	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	119	GFTFSAHA
	CDRH2	120	ISRNEDYT
	CDRH3	121	VKDFGTSPQTDF
10	VH	122	DERLVESGGGLVQPGGSLRLVCSAS GFTFSAHAMHWVRQPP GKGLEYVST ISRNEDYTY YADSVKGRFTISRDN SKNSLYLQ MRRLRPEDTAIYYC VKDFGTSPQTDFW QGTLVAVSS
	ZKA76	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	123	GFTFSTYF
	CDRH2	124	ISSTGSYK
	CDRH3	125	ARPFHSEYTYGLDAFDI
15	VH	126	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSTYFMHWVRQAP GKGLEWVAS ISSTGSYK FYADSVKGRFTISRDN TKNSLFLQ MNSLRAEDTAVFYC ARPFHSEYTYGLDAFDI WQGQTM LTVS S
	ZKA117	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	127	GGSI RRTNSY
	CDRH2	128	ISYSGST
	CDRH3	129	ARLNDGSTVTTSSYFDY
25	VH	130	QLQLQESGPGLVKPS ETL SLTCTVSGGSI RRTNSYWGWI RQ TTGKGLQWIGS ISYSGST FYNPSL KSRVTISLDTS KDHFSL ELSSVTAADTAIYYC ARLNDGSTVTTSSYFDY WGQGT LTV SS
	ZKB27	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	131	GYSFTSSW
	CDRH2	132	IDPSDSYT
	CDRH3	133	ARHDYSVSENGMDV
35	VH	134	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKAS GYSFTSSWINWVRQMP GKGLEWMGR IDPSDSYT TYNPSFQGHVTISVDK SIGTAYLQ WNSLRASDTAMYYC ARHDYSVSENGMDV WGQGT TVTVSS

	ZKB29	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	135	GFTFSSYT
	CDRH2	136	ISYDGSHK
5	CDRH3	137	ARRSYSISCFDY
	VH	138	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYTMHWVRQAP GKGLEWVAV ISYDGSHK FYADSVKGRFTISRDN SKDTLYLQ MNSLR AEDTALYYC ARRSYSISCFDY WGQGTLV TISS
	ZKB34	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
10	CDRH1	139	GFTFSRSG
	CDRH2	140	VSYDGSNK
	CDRH3	141	AKDLTMVRGVHYYYVMDV
15	VH	142	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSRSGMHWVRQAP GKGLEWVAV VSYDGSNK YYSDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRVEDTAVYYC AKDLTMVRGVHYYYVMDV WGQGT T V T VSS
	ZKB39	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	143	GYTFDDYY
20	CDRH2	144	INPHRGGT
	CDRH3	145	VRDQYCDGGNCYGIHQPHYGMDV
25	VH	146	QVQLVQSGAEVKKPGASLVSKAS GYTFDDYY IHWVRQAP GQGLEWLGR INPHRGGT NYAQKFQGRVIMTLDMSISTTYME LRRITSDDAVYYC VRDQYCDGGNCYGIHQPHYGMDV WGQG TTVT VSS
	ZKB46	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	147	GYSFTSYW
	CDRH2	148	IDPSDSYT
30	CDRH3	149	ARREYSSSSGQEDWFDP
	VH	150	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKG GYSFTSYWISWVRQMP GKGLEWMGR IDPSDSYT NYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYC ARREYSSSSGQEDWFDP WGQGT L V T V S S
35	ZKB53	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos

5	CDRH1	151	GFTFSSYA
	CDRH2	152	ISYDGSNR
	CDRH3	153	ARHVEQLPSSGYFQH
	VH	154	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSY AMHWVRQTP GKGLEWVTV ISYDGSNR YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRSED TAVYYC ARHVEQLPSSGYFQH WGQGT LTVSS
	ZKC26	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
10	CDRH1	155	GFIFSDFY
	CDRH2	156	IGHDGSYI
	CDRH3	157	ARAHGGFRH
	VH	158	QVQVVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFIFSDFY MSWMRQAP GKGLEWVAY IGHDGSYI LYADSVKGRFTISRDN AKNSLFLR MNSLRVED TAVYYC ARAHGGFRH WGQGT VVAVSP
	ZKD5	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
15	CDRH1	159	GFTFTSYG
	CDRH2	160	ISYDGSNK
	CDRH3	161	ARDRDHYDLWNAYTFDY
	VH	162	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFTSYG MHWVRQTP GKGLDWVAV ISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDN SKDTLYLQ MNSLRAAD TALLYC ARDRDHYDLWNAYTFDY WGQGT LTVS S
	ZKD7	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
20	CDRH1	163	GFTFSNYA
	CDRH2	164	ISYDVSDK
	CDRH3	165	AGGPLGVVVIKPSNAEHFHH
	VH	166	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSNYA AMHWVRQAP GKGLEWVAV ISYDVSDK YYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQ MNSLRAED TAAYYC AGGPLGVVVIKPSNAEHFHH WGQGT LV TVSS
	ZKD8	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
25	CDRH1	167	GFTFINYA

5	CDRH2	168	ISYDGSNK
	CDRH3	169	ATDADAYGDSGANFHY
	VH	170	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAAS GFTTFINYA IHWVRQAP GKGLEWVAV ISYDGSNK FYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRADDTAVYYC ATDADAYGDSGANFHY WGQGLTVTVSS
	ZKD15	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	171	DASISSGGFS
10	CDRH2	172	IYSSGDT
	CDRH3	173	ARAHTPTSKFYYYYAMDV
	VH	174	QLQLQESGGLVKPSQTLSTCTVSD DASISSGGFS WSWIRQ PLGKGLEWLGY IYSSGDT FYNPSLQGRVTMSVDIFRSQFSL KLTSVTAADTAMYYC ARAHTPTSKFYYYYAMDV WGQGT TVT VSS
15	ZKD16	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	175	GFTFSDHF
	CDRH2	176	SRNKPNSYTT
	CDRH3	177	AKVGGCYGGDCHVENDY
20	VH	178	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCVAS GFTFSDHF MDWVRQAP GKGLEWVGR SRNKPNSYTT EYAASVKGRFSISRDDSKKALY LQMNSLQTEDTAVYYC AKVGGCYGGDCHVENDY WGQGT LVT VSS
	ZKD17	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	179	GFIFSDYA
25	CDRH2	180	ISYDGSSR
	CDRH3	181	ARGYCSSGTCFSTNAEYFHP
30	VH	182	QVQMVESGGGVVQPGTSLRLSCATSG GFIFSDYA MHWVRQAP GKGLEWVAV ISYDGSSR LYADSVKGRFTVSRDN SKNTLYLQ MHS LRAGDTAVYYC ARGYCSSGTCFSTNAEYFHP WGQGT LA TISS
	ZKD20	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	183	GFTFSDHF
35	CDRH2	184	SRNKPNSYTT

5	CDRH3	185	ARVGGCNGGDCHVENDY
	VH	186	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS GGTFSDHF MDWVRQAP GKGLEWVGR SRNKPNSY TTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLY LQMNSLQTEDTAVYYC ARVGGCNGGDCHVENDY WGQGLT VSS
	ZKA134	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	187	GGTFSAYA
	CDRH2	188	IIPFFGTA
10	CDRH3	189	ARSDIVSTTRGYHHYGMDV
	VH	190	QVHLVQSGAEVKKPGSSVNVSCKAS GGTFSAYA ISWVRQAP GQGLEWMGG IIPFFGT AYYAQKFGRVTVTADKSTSTVYME MTSLRSEDTAVYYC ARSDIVSTTRGYHHYGMDV WGQGT TVT VSS
	ZKA246	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	191	GYTFSDYY
	CDRH2	192	INPYSGGT
15	CDRH3	193	ARGFTMISDREFDP
	VH	194	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS GYTFSDYY MHWVRQAP GQGLEWMGR INPYSGGT NYAQKFHGRVTVTTRDTSISTVYME LRGLRSDDTAVYYC ARGFTMISDREFDP WGQGLT TVTVSS
	ZKA256	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	195	GFTFSTYW
	CDRH2	196	IKQDGSEK
20	CDRH3	197	ARDPGYDDFWSGSYSGSFDI
	VH	198	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTY WMTWVRQAP GKGLEWVAN IKQDGSEK YYVDSVKGRFTISRDN TKNSLYLQVNSLRAEDTAIYYC ARDPGYDDFWSGSYSGSFDI WGQGT MTVTVSS
	ZKB42	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	199	GFTFNNYG
	CDRH2	200	ISYDGNKK
25	CDRH3	201	VKYGERINGYSDFPDH

5	VH	202	QVQVVESGGGVVQPGRSRLRFCAAS GYTFNNYGMHWVRQAP GKGLEWVAL ISYDGNKKYY ADSVKGRFSISRDN SKNTLYLQ MNRLRSGDTAVYHC VKYGERINGYSDPFDHWGQGLTVTVSS
	ZKB85	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	203	GYTFTTYA
	CDRH2	204	INTNTGNP
	CDRH3	205	ARVIVPYAFDI
10	VH	206	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKAS GYTFTTYAMNWVRQAP GQGP EWVGW INTNTGNPT YAQGFTGREVLSDLTSVSTAF LQ ISSLKAEDTAVYYC ARVIVPYAFDI WGQGTMTVTVSS
	ZKB47	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	207	GYTFNNY
	CDRH2	208	INPSGGPT
	CDRH3	209	ARDQYGGYARYGMDV
15	VH	210	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQAS GYTFNNYMHWVRQAP GQGLEWMGI INPSGGPT SYAQKFQGRVTMTTDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYC ARDQYGGYARYGMDV WGQGTMTVTVSS
	ZKC6	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	211	GYTFTGY
	CDRH2	212	INPNSGGT
	CDRH3	213	ARVSDWGFAFDI
20	VH	214	QVQLVQSGTEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGYMHWVRQAP GQGLEWMGR INPNSGGT NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYME LSGLRSDDTAVYYC ARVSDWGFAFDI WGQGTMTVTSQ
	ZKA160	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	215	GGSITSYS
	CDRH2	216	IFYSGST
	CDRH3	217	ARDQTMPVWVGMDV
25	VH	218	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSITSYSWSWIRQPP GKGLEWIGY IFYSGST DYNPSLKSRTISVDTSKQDFSLRL RSVTAADTAVYYC ARDQTMPVWVGMDV WGQGTMTVTVSS
	ZKA172	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos

5	CDRH1	219	GYIFTRYW
	CDRH2	220	IDPSDSYT
	CDRH3	221	ARQETAREDGMAV
	VH	222	EVQLVQSGAEVKKPGKSLRISCKGSG GYIFTRYW ISWVRQMP GKGLEWMGR IDPSDSYT NYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMY YCARQETAREDGMAV WGQGTITVTVSS
	ZKA174	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
10	CDRH1	223	GGSMSNSYYH
	CDRH2	224	IYYSGST
	CDRH3	225	ARNPVFNPLTLTHDAFDI
15	VH	226	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GGSMSNSYYH WGWIRQ PPGKGLEWIGS IYYSGST YYNPSLKSRTISVDTSKNQFSL KLNSVTAADTAVYY CARNPVFNPLTLTHDAFDI WGQGTMTV VSS
	ZKA189	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	227	GFTFSSYA
20	CDRH2	228	ISGSGDNT
	CDRH3	229	AKWPYYDFWSGSESYFDP
	VH	230	GVQLLESFGALVQPGKSLRLSCAAS GFTFSSYA ALTWVRQAP GKGLQWVSA ISGSGDNT YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLR AEDTAVYY CAKWPYYDFWSGSESYFDP WGQGTITVTV SS
25	ZKA195	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	231	GYNFPSYW
	CDRH2	232	IDPSDSYT
30	CDRH3	233	ARADCRSTSCYLVFE
	VH	234	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKDS GYNFPSYW IHWVRQMP GKGLEWMGT IDPSDSYT NYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMY YCARADCRSTSCYLVFE WGQGTITVTVSS
	ZKA215	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
35	CDRH1	235	GYTFTSYW

5	CDRH2	236	IDPSDSHT
	CDRH3	237	ARHALPNYFDS
	VH	238	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSG GYTFTSYW ISWVRQMP GKGLEWMGR IDPSDSHT DYSPSFQGHVTISADKSI SAAYLQ WSSLKASDTAMY YCARHALPNYFDS WGQGTTLTVSS
	ZKA218	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	239	GFPFSSYW
10	CDRH2	240	INSDGRNT
	CDRH3	241	ARGGYDYDSSGCFDY
	VH	242	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFPFSSYWM HWVRQAP GKGLVWVSR INSDGRNT NYADSVKGRFTISRDN AENTVYLQ MNSLRAEDTAV YYCARGGYDYDSSGCFDY WGQGTTLTVSS
	ZKB75	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	243	GFTFSNYA
15	CDRH2	244	ISGTGGST
	CDRH3	245	AKDSASRGGYC SGGVCYLNP GHHDY
	VH	246	EVQVLESGGGLLQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYAM SWVRQAP GKGLEWVST ISGTGGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAV YYCAKDSASRGGYC SGGVCYLNP GHHDYWG QGTTLTVSS
	ZKB83	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	247	GYSFTNYW
20	CDRH2	248	IDPSDSYT
	CDRH3	249	ARLRGSLYC SGGRCYSVPGETPN WFDP
	VH	250	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSG GYSTNYW ITWVRQMP GKGLEWMGS IDPSDSYT NYSPSFQGHVTISADWSINTAYLQ WSSLKASDTAK YYCARLRGSLYC SGGRCYSVPGETPN WFDP WGQGTTLTVSS
	ZKC3	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	251	GGSITSYY
35	CDRH2	252	IYYSGST

	CDRH3	253	ARVGGAPYYYYGMDV
	VH	254	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS GGSITSYY WSWIRQPP GKGLEWIGY IYYSGST NYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYC ARVGGAPYYYYGMDV WGQGTITVTVSS
5	ZKC18	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	255	GFTFGDYA
	CDRH2	256	IRSKAYGGTT
	CDRH3	257	SRDHTGTTYAFDI
10	VH	258	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTAS GFTFGDYA MSWFRQAP GKGLEWVGFI IRSKAYGGTTEYA ASVKGRFTISRDDSKSIAY LQMNSLKTEDTAVYYC SRDHTGTTYAFDI WGQGTMTVTSQ
	ZKD1	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
	CDRH1	259	GFTFSSYG
15	CDRH2	260	IWYDGSNK
	CDRH3	261	ARDRRGYGDYVGYYYYGMDV
20	VH	262	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYGM HWVRQAP GKGLEWVAV IWYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYC ARDRRGYGDYVGYYYYGMDV WGQGTITV VSS

Nombre	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
ZIKV EDIII genérico	263	TAAFTFTKXPAEXXHGTVTVEVQYXGXDGPCCKXPXQMAV DXQTLTPVGRITANPVITEXTENSKMMLELDPPFGDSYIVI GXGXKKITHHWHR
ZIKV H/PF/2013 EDIII	264	TAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCCKVPAQMAVD MQTLTPVGRITANPVITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIG VGEKKITHHWHR
ZIKV EDIII genérico	265	X ₁ GX ₂ X ₃ YSLCTAAFTFTKX ₄ PAEX ₅ X ₆ HGTVTVEVQYX ₈ GX ₉ D GPCCKX ₁₀ PX ₁₁ QMAVDX ₁₂ QTLTPVGRITANPVITEX ₁₃ TX ₁₄ N SKMMLELDPPFGDSYIVIGX ₁₅ GX ₁₆ X ₁₇ KITHHWHRSG en donde X1 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente K, A o E; X2 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente V, F o L;

5			X3 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente S o F; X4 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente I o V; X5 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente T o V; X6 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente L o D; X7 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente V o G; X8 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente A o G; X9 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente) excepto R, preferiblemente T o A; X10 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente V o I; X11 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente A o V; X12 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente M o T; X13 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente S o G; X14 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente E o K; X15 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente V o I; X16 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente E, A, K o D; y X17 puede ser cualquier aminoácido (que se presenta naturalmente), preferiblemente E, A o K, más preferiblemente K o A
10			
15			
20			
	Zika-E-F1 cebador	266	TGCAAACGCGGTCGCAAACCTGGTTG
25	ZIKV-E-R1 cebador	267	CGTGCCAAGGTAATGGAATGTCGTG
	ZIKV-Ef1530 cebador	268	AGCCTAGGACTTGATTGTGAACCGA
	ZIKV-E- R2769cebador	269	TTACAGATCCCACAACGACCGTCAG
	ZIKV-E-F2	270	ACTTGGTCATGATACTGCTGATTGC
30	ZIKV-E-R2	271	TCGGTTCACAATCAAGTCCTAGGCT
	ZIKV-E-f2058	272	GCTAACCCCGTAATCACTGAAAGCA
	ZIKV-E-r2248	273	AAGACTGCCATTCTCTTGGCACCTC

* las secuencias resaltadas en **negrita** son regiones CDR (nucleótidos o aa) y los residuos subrayados son residuos mutados en comparación con la secuencia de "línea germinal".