

SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos
Núm. 62/293.990, presentada el 11 de febrero de 2016. Las enseñanzas completas de la solicitud
anterior se incorporan aquí como referencia.

APOYO GUBERNAMENTAL

Esta invención se hizo con el apoyo del Gobierno bajo el número de concesión R33
AI100190 otorgado por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos sobre
la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El virus del dengue (DV por sus siglas en inglés) es un patógeno transmitido por
mosquitos que causa la fiebre del dengue (DF por sus siglas en inglés) y enfermedades graves que
ponen en peligro la vida, la fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de shock del dengue
(DHF/DSS). El DV es un virus de ARN pequeño, con envoltura y de cadena positiva que pertenece
al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*, que también incluye el virus Zika y el virus de la fiebre
amarilla. Cuatro subtipos o serotipos de virus distintos del dengue (DV-1 a DV-4) se transmiten a los
humanos a través de las picaduras de las especies de mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.
Se ha estimado que cada año ocurren de 50 a 100 millones de casos de DF y de 250,000 a 500,000
casos de DHF. El dengue constituye un importante problema de salud pública internacional, ya que
las dos quintas partes de la población mundial viven en regiones endémicas del dengue y se estima
que cada año se producen entre 50 y 100 millones de casos de infección por dengue. Además, 2,500
millones de personas corren el riesgo de infección en las regiones tropicales y subtropicales del
mundo en ausencia de una intervención efectiva.

Hay cuatro subtipos de virus del dengue: dengue-1 (DV1), dengue-2 (DV2), dengue-
3 (DV3) y dengue-4 (DV4). Cada uno de estos subtipos forma un subgrupo antígenoicamente
distinto dentro de la familia *Flavivirus*. A pesar de la extensa reactividad cruzada entre estos virus
en las pruebas serológicas, no existe una inmunidad de protección cruzada en humanos. Las
personas que viven en un área endémica pueden tener hasta cuatro infecciones, una con cada
serotipo, durante sus vidas.

El DV codifica una glicoproteína no estructural, NS1 (Figura 16), que se asocia con
las membranas intracelulares y la superficie celular. La NS1 finalmente se secreta como un
hexámero soluble de células infectadas con DV y circula en el torrente sanguíneo de pacientes

infectados. Por lo tanto, la NS1 sirve como un antígeno objetivo conveniente para detectar y diagnosticar la infección de un paciente humano potencialmente infectado con uno o más serotipos del virus del dengue al proporcionar una muestra de sangre de dicho paciente para pruebas.

Si bien es deseable poder detectar los cuatro serotipos de dengue, la implementación de un único ensayo que sea altamente sensible para todos los serotipos se ha visto obstaculizada por la relación limitada de los objetivos virales a nivel del ácido nucleico. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de desarrollar un diagnóstico preciso que pueda detectar y distinguir entre los cuatro serotipos del virus del dengue.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos monoclonales y pares de anticuerpos coincidentes de los anticuerpos monoclonales de la invención para la detección específica de uno o más de los cuatro serotipos del virus dengue en una muestra biológica que puede contener uno o más de tales serotipos del virus del dengue. Los anticuerpos de la invención facilitan el desarrollo de pruebas diagnósticas confirmatorias *in vitro* que detectan y distinguen la presencia de uno o más serotipos del virus del dengue en una muestra biológica, preferiblemente una muestra derivada de un sujeto humano. La invención proporciona además pares de anticuerpos monoclonales coincidentes en los que uno o ambos miembros del par combinado están unidos a diversas partículas o fases sólidas, con o sin marcadores conjugados de cualquier tipo. La invención también proporciona kits que contienen los pares de anticuerpos coincidentes de la invención. La invención también proporciona anticuerpos monoclonales específicos para uno o más de DV1, DV2, DV3 o DV4 que son útiles como agentes terapéuticos para la prevención y el tratamiento de la infección por el virus del dengue y trastornos relacionados con la infección por el virus del dengue.

Las combinaciones de estos anticuerpos también permiten una detección Pan de cualquiera de los 4 serotipos del dengue en una tira. Además de ser capaz de detectar serotipos en cada tira individual o todos los serotipos en una tira, otras configuraciones incluirían cada uno de los serotipos en áreas particulares de una sola tira. El uso de combinaciones de pares de anticuerpos se puede adaptar a múltiples tiras o tiras con múltiples áreas de detección.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción más particular de las modalidades preferidas de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos en los que los mismos caracteres de referencia

se refieren a las mismas partes a lo largo de las diferentes vistas. Los dibujos no están necesariamente a escala, sino que se hace hincapié en ilustrar los principios de la invención.

La Figura 1 muestra los patrones de señal en la detección de las cuatro proteínas NS1 del serotipo del virus del dengue usando un formato de intercalado de flujo lateral. Cada carril de cada prueba de especificidad de serotipo para D1, DV2, DV3 o DV4 incluye un par de anticuerpos diferente. El par de anticuerpos representado en cada carril de cada prueba respectiva para la especificidad del serotipo se indica como el anticuerpo de captura localizado en la línea de prueba (papel) o el anticuerpo de detección que en este caso está conjugado con una nanopartícula colorimétrica (NP) y representado. Los anticuerpos en los primeros 4 carriles de cada prueba de especificidad de serotipo son: Carril 1 = Ab 271 (papel) y Ab 912 (NP); Carril 2 = Ab 1 (papel) y Ab 164 (NP); Carril 3 = Ab55 (papel) y Ab 411 (NP); Carril 4 = Ab 55 (papel) y Ab 626 (NP). Las pruebas que muestran 5 carriles tienen los mismos pares de anticuerpos en los Carriles 1-4. El Carril 5 es una detección Pan del dengue en donde el anticuerpo en el papel es Ab 323 y los anticuerpos con el marcador de detección NP son Abs 271, 164, 411 y 626.

La Figura 2 muestra los datos experimentales utilizados para definir el patrón que se muestra en la Diapositiva 1. La muestra cargada en las tiras fue sobrenadante de células Vero infectadas con dengue. El orden de las tiras es como en la Figura 1.

La Figura 3 muestra datos experimentales de ensayos de flujo lateral que indican que el par de anticuerpos 725-55/725-411 es específico para detectar la proteína NS1 serotipo 3 del dengue. Este par es intercambiable (reversible) en el papel y en las nanopartículas. “Brasil” y “Asia” se refieren a cepas virales de diferentes áreas geográficas.

La Figura 4 muestra datos experimentales de ensayos de flujo lateral que indican que el par de anticuerpos 725-323/725-55 detecta NS1 serotipos 3 y 4, pero no 1 y 2. Este par es reversible.

La Figura 5 muestra datos experimentales de ensayos de flujo lateral que indican que el par de anticuerpos 725-323/725-411 es específico para la proteína NS1 serotipo 3 (Brasil = “Américas”) y recombinante (serotipo 3) del dengue de *The Native Antigen Company* (Reino Unido). Este par es reversible.

La Figura 6 muestra datos experimentales de ensayos de flujo lateral que indican que el par 725-323/724-626 es específico para el virus del dengue 4. Este par es reversible.

La Figura 7 muestra datos experimentales de ensayos de flujo lateral que indican que el par 724-626/725-55 es específico para la proteína NS1 serotipo 4 del virus del dengue. Este par es reversible.

La Figura 8 muestra datos experimentales de ensayos de control de flujo lateral que indican que el par 724-626/725-411 no detecta ninguna de las proteínas NS1 del serotipo del dengue.

La Figura 9 muestra datos experimentales de ensayos de flujo lateral que indican que los pares de anticuerpos indicados en la figura no reaccionan de forma cruzada con la proteína NS1 recombinante del virus de la fiebre amarilla purificada adquirida de *The Native Antigen Company* (Reino Unido).

La Figura 10 muestra las secuencias de péptidos que son reconocidas por los anticuerpos individuales mostrados en la Figura 9 en un ensayo de inmunotransferencia.

La Figura 11 muestra péptidos reconocidos por el anticuerpo 323 en el ensayo de selección de péptidos.

La Figura 12 muestra péptidos reconocidos por el anticuerpo 55 en el ensayo de selección de péptidos.

La Figura 13 muestra péptidos reconocidos por el anticuerpo 411 en el ensayo de selección de péptidos.

La Figura 14 muestra péptidos reconocidos por el anticuerpo 626 en el ensayo de selección de péptidos.

La Figura 15 muestra péptidos reconocidos por el anticuerpo 271 en el ensayo de selección de péptidos.

La Figura 16 es un esquema que muestra la estructura de la proteína NS1.

La Figura 17 es un esquema que muestra la ubicación aproximada de los péptidos 20 y 29 en la proteína NS1 del virus del dengue.

La Figura 18 muestra las secuencias de ADN y de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 55. El orden de cada secuencia es el siguiente: secuencia líder-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. En la figura, la secuencia de líder es texto sin formato. La primera región marco (FR1) está subrayada. La primera región CDR (CDR1) está subrayada con una línea ondulada. La segunda región marco (FR2) está subrayada con un doble subrayado. La segunda región CDR (CDR2) está subrayada con una línea punteada y discontinua. La tercera región marco (FR3) está subrayada con un subrayado grueso y sólido. La tercera región CDR (CDR3) está subrayada con grandes guiones. La cuarta región de marco (FR4) está subrayada con pequeños puntos.

La Figura 19 muestra las secuencias de ADN y de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 271. El orden de cada secuencia es el siguiente: secuencia líder-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. En la figura, la secuencia de líder es texto sin formato. La

primera región marco (FR1) está subrayada. La primera región CDR (CDR1) está subrayada con una línea ondulada. La segunda región marco (FR2) está subrayada con un doble subrayado. La segunda región CDR (CDR2) está subrayada con una línea punteada y discontinua. La tercera región marco (FR3) está subrayada con un subrayado grueso y sólido. La tercera región CDR (CDR3) está subrayada con grandes guiones. La cuarta región de marco (FR4) está subrayada con pequeños puntos.

La Figura 20 muestra las secuencias de ADN y de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 323. El orden de cada secuencia es el siguiente: secuencia líder-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. En la figura, la secuencia líder es texto sin formato. La primera región marco (FR1) está subrayada. La primera región CDR (CDR1) está subrayada con una línea ondulada. La segunda región marco (FR2) está subrayada con un doble subrayado. La segunda región CDR (CDR2) está subrayada con una línea punteada y discontinua. La tercera región marco (FR3) está subrayada con un subrayado grueso y sólido. La tercera región CDR (CDR3) está subrayada con guiones grandes. La cuarta región de marco (FR4) está subrayada con pequeños puntos.

La Figura 21 muestra las secuencias de ADN y de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 411. El orden de cada secuencia es el siguiente: secuencia líder-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. En la figura, la secuencia líder es texto sin formato. La primera región marco (FR1) está subrayada. La primera región CDR (CDR1) está subrayada con una línea ondulada. La segunda región marco (FR2) está subrayada con un doble subrayado. La segunda región CDR (CDR2) está subrayada con una línea punteada y discontinua. La tercera región marco (FR3) está subrayada con un subrayado grueso y sólido. La tercera región CDR (CDR3) está subrayada con guiones grandes. La cuarta región de marco (FR4) está subrayada con pequeños puntos.

La Figura 22 muestra las secuencias de ADN y aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 626. El orden de cada secuencia es el siguiente: secuencia líder-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. En la figura, la secuencia líder es texto sin formato. La primera región marco (FR1) está subrayada. La primera región CDR (CDR1) está subrayada con una línea ondulada. La segunda región marco (FR2) está subrayada con un doble subrayado. La segunda región CDR (CDR2) está subrayada con una línea punteada y discontinua. La tercera región marco (FR3) está subrayada con un subrayado grueso y sólido. La tercera región CDR (CDR3) está subrayada con guiones grandes. La cuarta región de marco (FR4) está subrayada con pequeños puntos.

La Figura 23 ilustra un formato de un ensayo de flujo lateral para uso con los anticuerpos de la invención. Este formato también se refiere a la “tira reactiva” o al “formato de media tira”.

La Figura 24 ilustra los límites de detección para las proteínas NS-1 virales utilizando una tira pan-dengue.

La Figura 25 ilustra los límites de detección para las proteínas NS-1 virales usando tiras 1-4 de serotipo específico (SSp).

La Figura 26 proporciona análisis ROC y análisis de sensibilidad/especificidad del virus del dengue.

La Figura 27 es un alineamiento de secuencia de las cuatro proteínas NS1 del serotipo del dengue que muestra el mapeo del epítipo lineal de los anticuerpos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los términos “un”, “uno”, “una”, “el” y “la” tal como se usan en el presente documento se definen para significar “uno o más” e incluyen el plural a menos que el contexto sea inapropiado.

Como se conoce en la técnica, un “anticuerpo” es una inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno particular. El término abarca las inmunoglobulinas que se producen de forma natural porque son generadas por un organismo que reacciona al antígeno, y también las que se producen o manipulan sintéticamente. Un anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Un anticuerpo puede ser miembro de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo cualquiera de las clases humanas: IgG, IgM, IgA e IgD. Se sabe que una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) típica como se entiende en la técnica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par teniendo una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kD) y una cadena “pesada” (aproximadamente 50-70 kD). El término N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Los términos “cadena ligera variable” (VL) y “cadena pesada variable” (VH) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente. Cada región variable se subdivide a su vez en regiones hipervariables (HV) y marco (FR). Las regiones hipervariables comprenden tres áreas de secuencia de hipervariabilidad llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR 1, CDR 2 y CDR 3), separadas por cuatro regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4) que forman una estructura de lámina beta y sirven como un andamio para mantener las regiones HV en posición. El extremo C de cada cadena pesada y ligera define una región constante que consiste en un dominio para la cadena ligera (CL) y tres para la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Preferiblemente, los términos “de longitud completa”,

“total” o “íntacto” se usan en referencia a un anticuerpo para indicar que contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, opcionalmente asociadas por enlaces disulfuro como ocurre con los anticuerpos producidos naturalmente. Preferiblemente, un anticuerpo es producido por una célula. Preferiblemente, un anticuerpo se produce por síntesis química. Preferiblemente, un anticuerpo se deriva de un mamífero. Preferiblemente, un anticuerpo se deriva de un animal tal como, pero no limitado a, ratón, rata, caballo, cerdo o cabra. Preferiblemente, un anticuerpo se produce usando un sistema de cultivo celular recombinante. Preferiblemente, un anticuerpo puede ser un anticuerpo purificado (por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad inmune). Preferiblemente, un anticuerpo puede ser un anticuerpo humano. Preferiblemente, un anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado (anticuerpo de especies no humanas cuyas secuencias de proteína se han modificado para aumentar su similitud con variantes de anticuerpos producidas naturalmente en humanos). Preferiblemente, un anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico (anticuerpo fabricado combinando material genético de una fuente no humana, por ejemplo, ratón, rata, caballo o cerdo, con material genético de humanos).

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una porción de un anticuerpo íntacto, generalmente la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo íntacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv: diacuerpos; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un solo sitio antigénico. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales pueden ser frecuentemente ventajosos porque se sintetizan mediante el cultivo de hibridomas, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente descripción pueden prepararse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante generalmente bien conocidos. Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se usan indistintamente y todas las designaciones de este tipo incluyen la progenie. Por lo tanto, las palabras “transformantes” y “células transformadas” incluyen la célula sujeto primaria y el cultivo derivado de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. También se
5 entiende que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que se cribó en la célula originalmente transformada. Cuando se proponen designaciones distintas, esto quedará claro a partir del contexto.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína”, como se usan en la presente
10 memoria, son intercambiables y se definen como una biomolécula compuesta de aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

El término “subtipo” o “serotipo” se usa aquí indistintamente y en referencia a un virus, por ejemplo, virus del dengue, y significa variantes genéticas de ese antígeno de virus de modo que un subtipo es reconocido por un sistema inmune aparte de un subtipo diferente. Por ejemplo, el
15 subtipo 1 del virus del dengue (DV1) se distingue inmunológicamente del subtipo 2 del virus del dengue (DV2).

Como se usa en esta invención, el término “epítipo” significa cualquier determinante antigénico en un antígeno al que se une el anticuerpo.

La palabra “complejo” como se usa en el presente documento se refiere al producto
20 de una reacción específica de agente de unión-ligando. Preferiblemente, el término “complejo” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo de detección marcado unido a su analito objetivo antes de ser detectado por, y unido a, un anticuerpo de captura en un inmunoensayo intercalado.

El término “antígeno” también denominado aquí “analito” se refiere a un polipéptido o
25 proteína que es capaz de unirse específicamente a (inmunoreaccionar con) un anticuerpo y formar un producto de inmunorreacción (inmunocomplejo). El sitio en el antígeno con el que se une el anticuerpo se denomina un determinante antigénico o epítipo.

Como se usa en este documento, el término “pares de anticuerpos coincidentes” se
30 refiere a conjuntos de anticuerpos que, cuando se usan juntos, son capaces de unirse específicamente a diferentes epítipos en el mismo antígeno proteico, por lo que se pueden usar juntos en un complejo para la captura y detección de un solo antígeno, por ejemplo, en un inmunoensayo intercalado. La unión específica para cada anticuerpo puede determinarse midiendo la afinidad de unión que tiene un anticuerpo por un antígeno usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Preferiblemente, los pares de anticuerpos coincidentes de la invención se

unen específicamente a un solo serotipo de la proteína NS1 del dengue, y no hacen reacción cruzada con otros serotipos del virus del dengue o, preferiblemente, otras proteínas NS1 de virus relacionados tales como virus Zika o fiebre amarilla que pueden estar presentes en una muestra biológica que se está probando. Preferiblemente, los pares de anticuerpos coincidentes son pares de anticuerpos monoclonales.

Tal como se usa en la presente memoria, un “inmunoensayo tipo intercalado” es un ensayo que usa dos anticuerpos, que se unen a diferentes sitios en un antígeno tal como un serotipo específico de la proteína NS1 del virus del dengue. El anticuerpo de captura, que es altamente específico para el antígeno, está unido a una superficie sólida. Dependiendo del formato del ensayo, un segundo anticuerpo denominado anticuerpo de detección que comprende un marcador de detección y que también se une al antígeno en un epítipo diferente que el anticuerpo de captura se pone en contacto con una muestra biológica sospechosa de contener el antígeno objetivo y luego se pone en contacto con el anticuerpo de captura. Como resultado, el antígeno está ‘intercalado’ entre los dos anticuerpos.

El término “ensayos de flujo lateral (LFA por sus siglas en inglés)” como se usa en la presente memoria son inmunoensayos que pueden usarse para detectar agentes biológicos que incluyen diversos analitos en muestras, incluida una muestra biológica, que pueden contener tales agentes. El formato general de LFA utiliza el mismo razonamiento que ELISA, donde el anticuerpo de captura se inmoviliza o se une a una membrana de nitrocelulosa en fase sólida, por ejemplo, en lugar de un pocillo de plástico. La ventaja del formato LFA es que la membrana permite un ensayo de una etapa diferente al que se encuentra en el ELISA de múltiples pasos. Basándose en el principio de alta afinidad, sensibilidad y selectividad entre pares específicos de anticuerpos y antígenos, los ensayos basados en inmunología están fácilmente disponibles debido a la gran variedad de anticuerpos existentes y el potencial de producir muchos más, así como la disponibilidad de reactivos de reacción a un precio razonable. La tecnología de flujo lateral es muy adecuada para el diagnóstico de enfermedades en el punto de atención (POC) porque es robusta y económica, sin necesidad de energía, una cadena de frío para almacenamiento y transporte o reactivos especializados. Muchos dispositivos de LFA comprenden una matriz capaz de soportar la prueba y que está hecha de un material que es capaz de absorber una muestra líquida y que promueve la acción capilar de la muestra líquida a lo largo de la matriz, tal como la nitrocelulosa. La matriz puede tener cualquier forma o tamaño, un tamaño común es una tira que puede sostenerse en una mano. En un formato de prueba ejemplar, después de absorber la muestra líquida en la almohadilla de muestra, el líquido se mueve hacia la almohadilla conjugada por acción capilar, rehidrata las partículas conjugadas marcadas con una fracción detectable tal como una etiqueta coloreada, permitiendo la mezcla de

estas partículas con la muestra líquida absorbida. Los conjugados marcados interactúan con el analito específico contenido en la muestra, iniciando así las interacciones intermoleculares, que dependen de la afinidad y avidez de los reactivos. Luego el conjugado marcado y su analito específico migran hacia el anticuerpo en la línea de prueba, capturando y reconociendo el conjugado marcado y su analito objetivo, donde se inmoviliza y produce una señal distinta, por ejemplo, en forma de, por ejemplo, una línea con color, lo que indica que la prueba es positiva. Los reactivos en exceso pasan las líneas de captura a una línea de control opcional que comprende un control positivo que asegura que todos los reactivos son funcionales y finalmente los reactivos en exceso quedan atrapados en la almohadilla de mecha, que está diseñada para atraer la muestra a través de la membrana por acción capilar y mantener un flujo lateral a lo largo de la tira de cromatografía. En otro formato ejemplar a veces denominado “tira reactiva” o “media tira” (Figura 23), los anticuerpos y suero marcados están presentes en un contenedor tal como un tubo de ensayo, en el que se conjugan. Una membrana de nitrocelulosa con un anticuerpo de captura unido a ella en una línea de prueba se pone en contacto con el conjugado marcado de anticuerpo y analito objetivo en el contenedor y migra hacia la línea de prueba donde es capturado por el anticuerpo en la línea de prueba donde se inmoviliza y produce una señal distinta, por ejemplo, una línea con color. Algunos ensayos de flujo lateral pueden tener más de una línea de prueba para la prueba múltiple de analitos múltiples. Como se usa en este documento, el término “flujo lateral” se refiere al flujo capilar a través de un material en una dirección horizontal, pero se entenderá que se aplica al flujo de un líquido desde un punto de aplicación del líquido a otra posición lateral, incluso si, por ejemplo, el dispositivo está vertical o en una pendiente. El flujo lateral depende de las propiedades de la interacción líquido/sustrato (humectación superficial o acción de mecha) y no requiere ni implica la aplicación de fuerzas externas, por ejemplo, aplicaciones de vacío o presión por parte del usuario.

Como se usa en este documento, el término “identidad” se refiere a la relación general entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptido. El cálculo del porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, se puede realizar alineando las dos secuencias para propósitos de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir espacios en una o ambas primera y segunda secuencias de ácido nucleico para una alineación óptima y las secuencias no idénticas pueden descartarse para propósitos de comparación). Preferiblemente, la longitud de una secuencia alineada para propósitos de comparación es de por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95 %, o sustancialmente 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan a

continuación. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que debe introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el algoritmo de Meyers y Miller (CABIOS, 1989, 4:11-17), que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0) usando una tabla de residuo de peso PAM 120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. La secuencia de referencia puede ser, independientemente, una secuencia de longitud completa (por ejemplo, un péptido V_H o V_L) o una subsecuencia de la misma, tal como una o más regiones CDR o marco.

Como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente” se refiere a la condición cualitativa de mostrar una extensión o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés.

La frase “identidad sustancial” o “sustancialmente idéntica” se usa en la presente memoria para hacer referencia a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como apreciarán las personas con conocimientos ordinarios en la materia, generalmente se considera que dos secuencias son “sustancialmente idénticas” si contienen residuos idénticos en las posiciones correspondientes. Como es bien sabido en esta materia, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos se pueden comparar utilizando cualquiera de una variedad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas de cómputo comerciales tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST con espacios y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Ejemplos de tales programas se describen en Altschul et al., *Basic local alignment search tool*, *J. Mol. Biol.* 215(3):403-410, 1990; Altschul et al. *Methods in Enzymology*; Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis et al, *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; y Misener et al, (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology*, vol. 132), Humana Press, 1999. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente proporcionan típicamente una indicación del grado de identidad. Preferiblemente, se considera que dos secuencias son sustancialmente idénticas si por lo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de sus residuos correspondientes son idénticos en un tramo relevante de residuos. Preferiblemente, el estiramiento relevante es una secuencia completa. Preferiblemente, el tramo

relevante es por lo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más residuos. El estiramiento relevante puede ser, independientemente, una secuencia de longitud completa (por ejemplo, un péptido V_H o V_L) o una subsecuencia de la misma, tal como una o más regiones CDR o marco.

El término “muestra biológica”, como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra de origen biológico, o una muestra derivada de la muestra de origen biológico, preferiblemente de un paciente humano. Las muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, sangre, plasma, suero, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo, semen, orina, heces, lágrima, saliva, aspirado de aguja, sección externa de la piel, tracto respiratorio, intestinal o genitourinario, tumor, órgano, cultivo celular, constituyente de cultivo celular, muestra de tejido, sección de tejido, célula completa, constituyente celular, citoespín o frotis celular. El término “muestra biológica” no incluye muestras que contienen proteínas objetivo que se han desnaturalizado o alterado de otro modo de manera que la proteína ya no está en su configuración nativa.

Los términos “paciente” o “sujeto” tal como se usan en la presente memoria se refieren a un animal. Preferiblemente, el animal es un mamífero. Más preferiblemente, el mamífero es un ser humano. Un “paciente” también se refiere, por ejemplo, a perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, cobayos, peces, aves y similares.

Como se usa en este documento, el término “agente antiviral” se refiere a una clase de medicación usada específicamente para tratar infecciones virales inhibiendo, desactivando o destruyendo partículas de virus. En general, un agente antiviral puede ser o comprender un compuesto de cualquier clase química (por ejemplo, una molécula pequeña, metal, ácido nucleico, polipéptido, lípido y/o carbohidrato). Preferiblemente, un agente antiviral es o comprende un anticuerpo o imitador de anticuerpo. Preferiblemente, un agente antiviral es un anticuerpo anti-dengue de la invención (por ejemplo, Ab 55, Ab 271, Ab323, Ab 411, Ab 626). Preferiblemente, un agente antiviral es o comprende un agente de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, un ARNsi, un ARNsh, etc.) o imitaciones de los mismos. Preferiblemente, un agente antiviral es o comprende una molécula pequeña. Preferiblemente, un agente antiviral es o comprende un compuesto de origen natural (por ejemplo, una molécula pequeña).

El término “terapia de combinación”, como se usa en el presente documento, se refiere a aquellas situaciones en las que se administran dos o más agentes farmacéuticos diferentes en regímenes solapantes de modo que el sujeto se expone simultáneamente a ambos agentes.

El término “comparable” se usa en este documento para describir dos (o más) conjuntos de condiciones o circunstancias que son suficientemente similares entre sí para permitir la comparación de los resultados obtenidos o los fenómenos observados. Preferiblemente, los conjuntos o circunstancias de condiciones comparables se caracterizan por una pluralidad de características sustancialmente idénticas y una o una pequeña cantidad de características variadas. Los expertos en la materia apreciarán que los conjuntos de condiciones son comparables entre sí cuando se caracterizan por un número y tipo suficiente de características sustancialmente idénticas para garantizar una conclusión razonable de que las diferencias en los resultados obtenidos o fenómenos observados en los diferentes conjuntos o circunstancias de condiciones son causadas por o son indicativas de la variación en esas características que son variadas.

Como se usa en el presente documento, el término “correspondiente a” se usa a menudo para designar la posición/identidad de un residuo de aminoácido en un polipéptido de interés. Los expertos en la materia apreciarán que, por motivos de simplicidad, los residuos en un polipéptido se designan a menudo usando un sistema de numeración canónico basado en un polipéptido relacionado de referencia, de modo que un aminoácido “correspondiente a” un residuo en la posición 190, por ejemplo, no necesita ser realmente el aminoácido 190° en una cadena de aminoácidos particular sino que corresponde al residuo encontrado en 190 en el polipéptido de referencia; los expertos en la materia aprecian fácilmente cómo identificar los aminoácidos “correspondientes”.

Como se usa en este documento, los términos “forma de dosificación” y “forma de dosificación unitaria” se refieren a una unidad físicamente discreta de una proteína terapéutica (por ejemplo, anticuerpo) para el paciente a tratar. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado. Se entenderá, sin embargo, que la dosificación total de la composición será decidida por el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico.

Un “régimen de dosificación” (o “régimen terapéutico”), como se usa ese término en la presente memoria, es un conjunto de dosis unitarias (típicamente más de una) que se administran individualmente a un sujeto, típicamente separadas por periodos de tiempo. Preferiblemente, un agente terapéutico dado tiene un régimen de dosificación recomendado, que puede implicar una o más dosis. Preferiblemente, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis, cada una de las cuales está separada entre sí por un período de tiempo de la misma longitud; preferiblemente, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis y por lo menos dos periodos de tiempo diferentes que separan las dosis individuales. Preferiblemente, todas las dosis dentro de un régimen de dosificación son de la misma cantidad de dosis unitaria. Preferiblemente,

diferentes dosis dentro de un régimen de dosificación son de diferentes cantidades. Preferiblemente, un régimen de dosificación comprende una primera dosis en una primera dosis, seguida de una o más dosis adicionales en una segunda dosis diferente de la primera cantidad de dosis. Preferiblemente, un régimen de dosificación comprende una primera dosis en una primera dosis, seguida de una o más dosis adicionales en una segunda dosis igual a la primera cantidad de dosis.

Como se usa en el presente documento, el término “aislado” se refiere a una sustancia y/o entidad que ha sido (1) separada de por lo menos algunos de los componentes con los que se asoció cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) producida, preparada y/o fabricada por la mano del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas se pueden separar de aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o más de aproximadamente 99% de los otros componentes con los que se asociaron inicialmente. Preferiblemente, los agentes aislados tienen aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o más de aproximadamente 99% de pureza. Como se usa en el presente documento, una sustancia es “pura” si está sustancialmente libre de otros componentes. Como se usa en el presente documento, el cálculo del porcentaje de pureza de sustancias y/o entidades aisladas no debe incluir excipientes (por ejemplo, tampón, disolvente, agua, etc.).

El término “farmacéuticamente aceptable” como se usa en el presente documento, se refiere a sustancias que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuadas para el uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Como se usa en el presente documento, el término “portador farmacéuticamente aceptable” significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un material de carga, diluyente, excipiente o disolvente encapsulante, líquido o sólido, implicado en portar o transportar el compuesto objeto de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano o parte del cuerpo. Cada portador debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y

sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de ajonjolí, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soya; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; agua simple, solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones tamponadas de pH; poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Como se usa en este documento, el término “composición farmacéutica” se refiere a un agente activo, formulado junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, el agente activo está presente en una cantidad de dosis unitaria apropiada para la administración en un régimen terapéutico que muestra una probabilidad estadísticamente significativa de alcanzar un efecto terapéutico predeterminado cuando se administra a una población relevante. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas pueden formularse especialmente para la administración en forma sólida o líquida, que incluyen aquellas adaptadas para lo siguiente: administración oral, por ejemplo, inmersiones (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), tabletas, por ejemplo, aquellas dirigidas para absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural tales como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida; aplicación tópica, por ejemplo, tal como crema, pomada, o un parche o aerosol de liberación controlada aplicado a la piel, los pulmones o la cavidad oral; intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, tal como un pesario, crema o espuma; sublingualmente; ocularmente; transdérmicamente; o nasalmente, pulmonarmente y a otras superficies de la mucosa.

Una persona que es “susceptible a” una enfermedad, trastorno o afección (por ejemplo, una infección por un virus del dengue o “DV”) está en riesgo de desarrollar la enfermedad, trastorno o afección. Preferiblemente, una persona que es susceptible a una enfermedad, trastorno o afección no presenta ningún síntoma de la enfermedad, trastorno o afección. Preferiblemente, una persona que es susceptible a una enfermedad, trastorno o afección no ha sido diagnosticada con la enfermedad, trastorno y/o afección. Preferiblemente, una persona que es susceptible a una enfermedad, trastorno o afección es una persona que ha estado expuesta a condiciones asociadas con el desarrollo de la enfermedad, trastorno o afección (por ejemplo, la persona ha estado expuesta

al DV). Preferiblemente, el riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno y/o afección es un riesgo basado en la población (por ejemplo, usuarios de drogas intravenosas, receptores de sangre, productos sanguíneos y órganos donados antes de 1992, cuando tales productos comenzaron a cribarse; trabajadores de la salud que manipulan agujas, bebés nacidos de madres infectadas con DV, etc.).

De acuerdo con la presente invención, “los síntomas se reducen” cuando uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno o afección particular se reduce en magnitud (por ejemplo, intensidad, gravedad, etc.) o frecuencia. Para fines de claridad, un retraso en el inicio de un síntoma particular se considera una forma de reducir la frecuencia de ese síntoma. Para dar algunos ejemplos, los síntomas ejemplares de DV incluyen, pero no se limitan a, aparición repentina de fiebre, fiebre alta (a menudo más de 40°C), dolores musculares y articulares, dolor de cabeza, vómitos, diarrea, aparición de una erupción como enrojecimiento de la piel o sarpullido parecido al sarampión, petequias (pequeñas manchas rojas causadas por capilares rotos que no desaparecen cuando se presiona la piel), sangrado de las membranas mucosas, recuento bajo de glóbulos blancos, nivel bajo de plaquetas, acidosis metabólica, nivel elevado de aminotransferasa del hígado, pérdida de plasma que resulta en hemoconcentración (indicada por un aumento del hematocrito) e hipoalbuminemia, acumulación de líquido en el tórax y la cavidad abdominal (por ejemplo, derrame pleural o ascitis), hemorragia gastrointestinal, choque y hemorragia, prueba de torniquete positivo, hipotensión, infección del cerebro o el corazón, deterioro de órganos vitales (por ejemplo, hígado), trastornos neurológicos tales como mielitis transversa y/o combinaciones de los mismos. No se pretende que la presente invención se limite solo a los casos en que se eliminan los síntomas. La presente invención contempla específicamente un tratamiento tal que uno o más síntomas se reducen (y la condición del sujeto se “mejora”), aunque no se elimina por completo.

Como se usa en el presente documento, la frase “agente terapéutico” se refiere a cualquier agente que provoca un efecto farmacológico deseado cuando se administra a un organismo. Preferiblemente, se considera que un agente es un agente terapéutico si demuestra un efecto estadísticamente significativo en una población apropiada. Preferiblemente, la población apropiada puede ser una población de organismos modelo. Preferiblemente, una población apropiada puede definirse por varios criterios, tales como un cierto grupo de edad, sexo, antecedentes genéticos, condiciones clínicas preexistentes, etc. Preferiblemente, un agente terapéutico es cualquier sustancia que puede usarse para aliviar, mejorar, aminorar, inhibir, prevenir, retrasar el inicio, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección.

Como se usa en este documento, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de una proteína terapéutica que confiere un efecto terapéutico sobre el sujeto tratado, a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible mediante algún ensayo o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación o siente un efecto). En particular, la “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de una proteína o composición terapéutica efectiva para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección deseada, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable, tal como aliviar los síntomas asociados con la enfermedad, prevenir o retrasar el inicio de la enfermedad, y/o también disminuir la gravedad o la frecuencia de los síntomas de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente efectiva se administra comúnmente en un régimen de dosificación que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier proteína terapéutica particular, una cantidad terapéuticamente efectiva (y/o una dosis unitaria apropiada dentro de un régimen de dosificación efectivo) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, en combinación con otros agentes farmacéuticos. Además, la cantidad (y/o dosis unitaria) terapéuticamente efectiva específica para cualquier paciente en particular puede depender de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del agente farmacéutico específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración, y/o la tasa de excreción o metabolismo de la proteína de fusión específica empleada; la duración del tratamiento; y factores similares, como es bien sabido en la materia médica.

Como se usa aquí, el término “tratamiento” (también “tratar” o “que trata”) se refiere a cualquier administración de una sustancia (por ejemplo, composiciones proporcionadas) que alivia parcial o completamente, mejora, revive, inhibe, retrasa el inicio de, reduce la gravedad y/o reduce la incidencia de uno o más síntomas, características y/o causas de una enfermedad, trastorno y/o afección particular (por ejemplo, DV). Tal tratamiento puede ser de un sujeto que no muestra signos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante y/o de un sujeto que muestra solamente signos tempranos de la enfermedad, trastorno y/o afección. Alternativa o adicionalmente, dicho tratamiento puede ser de un sujeto que muestra uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante. Preferiblemente, el tratamiento puede ser de un sujeto que ha sido diagnosticado como que padece la enfermedad, trastorno y/o afección relevante. Preferiblemente, el tratamiento puede ser de un sujeto que se sabe que tiene uno o más factores de susceptibilidad que están correlacionados estadísticamente con un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante.

La expresión “dosis unitaria”, como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad administrada como una única dosis y/o en una unidad físicamente discreta de una composición farmacéutica. Preferiblemente, una dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de un agente activo. Preferiblemente, una dosis unitaria contiene una sola dosis completa del agente. Preferiblemente, se administra más de una dosis unitaria para lograr una dosis única total. Preferiblemente, se requiere, o se espera que se requiera, la administración de dosis unitarias múltiples para lograr un efecto deseado. Una dosis unitaria puede ser, por ejemplo, un volumen de líquido (por ejemplo, un portador aceptable) que contiene una cantidad predeterminada de uno o más agentes terapéuticos, una cantidad predeterminada de uno o más agentes terapéuticos en forma sólida, una formulación de liberación sostenida o dispositivo de administración de fármaco que contiene una cantidad predeterminada de uno o más agentes terapéuticos, etc. Se apreciará que una dosis unitaria puede estar presente en una formulación que incluye cualquiera de una variedad de componentes además del(de los) agente(s) terapéutico(s). Por ejemplo, se pueden incluir portadores aceptables (por ejemplo, portadores farmacéuticamente aceptables), diluyentes, estabilizantes, tampones, conservadores, etc., como se describe más adelante. Los expertos en la materia apreciarán que, preferiblemente, una dosificación diaria total apropiada de un agente terapéutico particular puede comprender una porción, o una pluralidad, de dosis unitarias, y puede decidirse, por ejemplo, por el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico. Preferiblemente, el nivel de dosis efectivo específico para cualquier sujeto u organismo particular puede depender de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto activo específico empleado; composición específica empleada; edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto; tiempo de administración, y tasa de excreción del compuesto activo específico empleado; duración del tratamiento; medicamentos y/o terapias adicionales utilizados en combinación o coincidentes con el(los) compuesto(s) específico(s) empleados, y factores similares bien conocidos en la materia médica.

Como se usa en este documento, el término “vacunación” se refiere a la administración de una composición destinada a generar una respuesta inmune, por ejemplo, a un agente causante de enfermedad. Para los fines de la presente invención, la vacunación puede administrarse antes, durante y/o después de la exposición a un agente causante de enfermedad, preferiblemente, antes, durante y/o poco después de la exposición al agente. Preferiblemente, la vacunación incluye administraciones múltiples, apropiadamente espaciadas en el tiempo, de una composición de vacunación.

La presente invención proporciona “pares de anticuerpos coincidentes” que comprenden los nuevos anticuerpos monoclonales de la invención en los que cada par de

anticuerpos coincidentes es capaz de detectar y distinguir entre los serotipos DV1, DV2, DV3 y DV4 de la proteína NS1 del virus del dengue en un inmunoensayo apropiado. Preferiblemente, cada par de anticuerpos coincidentes de la invención tampoco reacciona de forma cruzada con ninguna proteína, incluidas las proteínas NS1 de virus estrechamente relacionados tales como el virus Zika y el virus de la fiebre amarilla. La invención también proporciona kits que comprenden uno o más de los pares de anticuerpos coincidentes de la invención para usarse en inmunoensayos intercalados apropiados para analizar muestras biológicas para detectar la presencia del virus del dengue. La invención también proporciona métodos para identificar pares de anticuerpos coincidentes que son altamente específicos para no más de un serotipo de la proteína NS1 del virus del dengue y que preferiblemente no tienen reacción cruzada con las proteínas del virus Zika y que preferiblemente no tienen reacción cruzada con proteínas del virus de la fiebre amarilla. Para mayor claridad, uno o ambos anticuerpos de un par adaptado individualmente pueden unirse a más de una secuencia de proteína NS1. Es la combinación o el par de anticuerpos que se unen a una NS1 de DV.

Existe una variedad de formatos de ensayo conocidos por los expertos en la materia para usar anticuerpos para detectar un antígeno en una muestra que se puede emplear eficazmente en los métodos descritos. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Preferiblemente, el ensayo es similar a un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) - ensayo intercalado, preferiblemente en un formato de flujo lateral. En este ensayo, un anticuerpo de proteína NS1 anti-dengue de la invención referido aquí como el “anticuerpo de detección” que está marcado con un reactivo de detección tal como un marcador colorimétrico colocado tal como pipeteando sobre una membrana tal como nitrocelulosa. Una muestra biológica que puede contener virus del dengue se aplica o contacta de otra manera con la membrana en la que está presente el anticuerpo de detección. La muestra biológica migra a lo largo de la membrana a través de una región que contiene el anticuerpo de detección en donde el anticuerpo de detección se une a un epítipo específico de la proteína NS1 del virus del dengue si dicha proteína está presente en la muestra biológica. El complejo del anticuerpo de detección con su antígeno unido migra después al área de prueba en donde un segundo anticuerpo de la invención, denominado en este documento “anticuerpo de captura”, se inmoviliza y se une a un epítipo diferente del complejo NS1 formando así un intercalado del anticuerpo de detección, antígeno y anticuerpo de captura. La concentración del reactivo de detección en el área de prueba indica la presencia de NS1 de dengue de un serotipo específico en la muestra. Tales pruebas pueden realizarse típicamente con una cantidad muy pequeña de muestra biológica.

Un ensayo como se describe aquí puede implicar en principio más que un par de anticuerpos monoclonales coincidentes tal como es el caso cuando se multiplexa la detección de

más de un serotipo de proteína NS1 del virus del dengue con una mezcla de anticuerpos de captura en un área de detección de membrana única. Preferiblemente, el método para detectar uno o más serotipos del virus del dengue en una muestra o sujeto emplea más de un par de anticuerpos coincidentes de la invención en un ensayo de flujo lateral multiplexado (LFA) tal como el descrito en la solicitud estadounidense No. 15/041,788, titulada Ensayo de Flujo Lateral Multiplexado de Hamad-Schifferli et al., presentada el 11 de febrero de 2016.

Para ser eficaz en un ensayo para detectar uno o más serotipos del virus del dengue, deben estar presentes un par de anticuerpos coincidentes de la invención en una cantidad suficiente para permitir la unión significativa al antígeno. Con el fin de obtener tales cantidades de antígeno unido, la cantidad precisa de cada anticuerpo puede variar ampliamente dependiendo de su afinidad por el antígeno, de modo que se requieren cantidades menores de anticuerpos que tienen afinidades mayores que las de los anticuerpos que tienen afinidades menores. Los métodos para medir la afinidad del anticuerpo por un antígeno se conocen en la materia.

Los anticuerpos monoclonales novedosos preferidos útiles en uno o más pares coincidentes de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpo (Ab) 55, anticuerpo (Ab) 271, anticuerpo (Ab) 323, anticuerpo (Ab) 411 y anticuerpo (Ab) 626. Estos anticuerpos se identificaron como útiles en un par adaptado específico para un solo serotipo de la proteína NS1 del virus del dengue y como un par coincidente, que no reaccionaba cruzadamente con otros serotipos del virus del dengue usando métodos de la invención para seleccionar y cribar pares de anticuerpos coincidentes. Las secuencias peptídicas de epítipo de la proteína NS1 reconocidas por cada uno de los anticuerpos 55, 271, 323, 411 y 626 se encuentran en la Tabla 2 y se muestran en la Figura 10.

Los anticuerpos monoclonales novedosos preferidos útiles en uno o más pares coincidentes de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpo (Ab) 1, anticuerpo (Ab) 164, anticuerpo (Ab) 243, anticuerpo (Ab) 850 y anticuerpo (Ab) 912. Estos anticuerpos se identificaron como útiles en un par adaptado específico para un único serotipo de la proteína NS1 del virus del dengue y como un par coincidente, sin reacción cruzada con otros serotipos del virus del dengue usando métodos de la invención para seleccionar y cribar pares de anticuerpos coincidentes. Las secuencias peptídicas de epítipo de la proteína NS1 reconocidas por cada uno de los anticuerpos 1, 243 y 912 se proporcionan en la Tabla 2.

Por lo menos uno de los anticuerpos de los pares de anticuerpos coincidentes aquí descritos está preferiblemente marcado con marcadores detectables estándar, tales como sistemas de detección quimioluminiscentes, marcadores radiactivos tales como ^{125}I y enzimas tales como peroxidasa de rábano picante, biotina y avidina. Preferiblemente, los marcadores adecuados

incluyen nanopartículas de oro, perlas de látex de colores, partículas magnéticas, nanopartículas de carbono, nanopartículas de selenio, nanopartículas de plata, puntos cuánticos, fósforos conversores superiores, fluoróforos orgánicos, tintes textiles, enzimas, liposomas.

Cualquier marcador detectable reconocido en la materia como útil en diversos
5 ensayos podría usarse en la presente invención. En particular, el componente de marcador detectable puede incluir composiciones detectables por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. El componente de marcador produce, por lo tanto, una señal detectable. Los marcadores ejemplares incluyen colorantes fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, radioisótopos, reactivos electrodenso, enzimas o partículas coloreadas (tales
10 como un sol o coloide metálico, preferiblemente oro). El componente de marcador puede generar una señal medible, tal como radiactividad, luz fluorescente, color o actividad enzimática, que puede usarse para identificar y cuantificar la cantidad de marcador unido a un sitio de prueba. Por lo tanto, el componente de marcador también puede representar la presencia de un antígeno particular unido al mismo.

Un marcador adecuadp depende de los métodos de detección previstos. El marcador
15 puede ser un marcador directo o indirecto. Un marcador directo puede ser detectado por un instrumento, dispositivo o a simple vista sin paso adicional para generar una señal detectable. Un marcador visual directo, por ejemplo, un marcador de partícula de oro o látex, puede detectarse a simple vista. Un marcador indirecto, por ejemplo, un marcador de enzima, requiere una etapa
20 adicional para generar una señal detectable. Preferiblemente, el marcador es un marcador soluble, tal como un marcador colorimétrico, radiactivo, enzimático, luminiscente o fluorescente. Dependiendo de las configuraciones específicas, los marcadores tales como marcador colorimétrico, radioactivo, enzimático, luminiscente o fluorescente pueden ser un marcador soluble o un marcador de partícula o partículas.

Preferiblemente, el marcador detectable que tiene una emisión espectral única
25 incluye, pero no se limita a, nanopartículas de metal noble (NP) tales como nanopartículas de oro o plata, perlas de látex coloreadas, partículas magnéticas, nanopartículas de carbono, nanopartículas de selenio, puntos cuánticos, fósforos de conversión superior, fluoróforos orgánicos y enzimas. Preferiblemente, los marcadores detectables proporcionan una señal espectral directa al completar
30 el ensayo, tal como el color detectable por el color a partir de nanopartículas metálicas. La liberación de color de una conversión de enzima, por ejemplo, requiere un paso adicional para producir una firma espectral que preferiblemente se evita.

Uno o más de los pares de anticuerpos coincidentes de la presente invención se pueden usar para detectar y distinguir entre uno o más serotipos del virus del dengue encontrados

en una muestra biológica. La detección de uno o más serotipos del virus del dengue en un paciente permite al médico tratar al paciente con una o más de las vacunas correctas, por ejemplo, que son específicas de uno o más de los serotipos del virus del dengue que se encuentran en el paciente. El diagnóstico preciso de la fiebre del dengue es vital para el manejo de pacientes individuales, y permite intervenciones apropiadas de control de infecciones tales como la cuarentena y la institución de procedimientos de brotes. Uno de los aspectos inusuales del dengue es que, en algunos casos, la segunda infección tiene síntomas de la enfermedad que son mucho más graves y pueden ser potencialmente mortales. La infección primaria da como resultado la fiebre del dengue, en donde los síntomas son fiebre, dolor en las articulaciones y los músculos, dolores, náuseas y erupción cutánea. Los pacientes generalmente se recuperan en 10 días y son inmunes a ese serotipo en particular. Sin embargo, los pacientes infectados con otro serotipo de dengue (infección secundaria) tienen un riesgo mucho mayor de fiebre hemorrágica por dengue, lo que puede resultar en complicaciones mucho más graves, como sangrado severo, y los pacientes corren el riesgo de sufrir el síndrome de choque por dengue. Esta es una afección potencialmente mortal y, por lo general, solo se puede ofrecer atención de apoyo. Por lo tanto, la capacidad de distinguir entre qué serotipo está infectado un paciente es fundamental para determinar si están o no en riesgo de fiebre hemorrágica por dengue o síndrome de choque del dengue.

Desde un punto de vista de salud pública, el uso de pares de anticuerpos combinados de la invención en los kits y métodos de la invención que puede distinguir los serotipos, sería útil para saber cuándo una población está en riesgo de un brote de fiebre hemorrágica. Por ejemplo, cuando dos serotipos diferentes han ingresado en la misma zona geográfica, las composiciones y los métodos de la invención podrían mapear los datos entrantes y proporcionar una comprensión de la distribución geográfica de los virus asociados con la fiebre hemorrágica. Si una región ya es hiperendémica y los cuatro serotipos circulan simultáneamente, los métodos de la presente invención pueden explorar la dinámica de la infección del virus y proporcionar datos únicos sobre la prevalencia de un serotipo sobre el otro. La dinámica del serotipo del virus es un aspecto muy importante de los esfuerzos de vacunación, en esta nueva fase de vacunación contra el dengue con una vacuna tetravalente, la protección equitativa para cada uno de los cuatro serotipos podría abordarse utilizando los pares de anticuerpos coincidentes de la invención como un componente de la vigilancia epidemiológica.

Un par de anticuerpos monoclonales preferido usado como anticuerpos de captura y detección en un inmunoensayo intercalado es Ab 271 emparejado con Ab 912 (271/912) para detectar la proteína NS1 del virus del dengue serotipo 1 (DV1) (Figuras 1 y 2).

Un par de anticuerpos monoclonales preferido usado como anticuerpos de captura y detección en un inmunoensayo intercalado es Ab 1 emparejado con Ab 164 (1/164) para detectar NS1 del virus de dengue serotipo 2 (DV2) (Figuras 1 y 2). Otro par de anticuerpos preferidos para la captura y detección de NS1 del dengue serotipo 2 (DV2) son Ab 850 emparejado con Ab 243 (850/243).

Un par de anticuerpos monoclonales preferido usado como anticuerpos de captura y detección en un inmunoensayo intercalado es Ab 55 emparejado con Ab 411 (55/411) para detectar NS1 del dengue serotipo 3 (DV3) (Figura 3). Otro par preferido de anticuerpos para la captura y detección de NS1 del dengue serotipo 3 (DV3) es Ab 323 emparejado con Ab 55 (323/55) (Figura 4). Otro par preferido de anticuerpos para la captura y detección de NS1 del dengue serotipo 3 (Dv3) es Ab 323 emparejado con Ab 411 (323/411) (Figura 5).

Un par de anticuerpos monoclonales preferido usado como anticuerpos de captura y detección en un inmunoensayo intercalado es Ab 323 emparejado con Ab 626 (323/626) (Figura 6) para detectar NS1 del dengue serotipo 4 (DV4). Otro par de anticuerpos preferido para la captura y detección de NS1 del dengue serotipo 4 (DV4) es Ab 626 emparejado con Ab 55 (626/55) (Figura 7).

La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 55 se encuentran en la Figura 18. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 271 se encuentran en la Figura 19. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 323 se encuentran en la Figura 20. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 411 se encuentran en la Figura 21. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 626 se encuentran en la Figura 22. La invención incluye anticuerpos que son por lo menos 90% idénticos, preferiblemente por lo menos 95% idénticos y preferiblemente por lo menos 99% idénticos a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos 55, 271, 323, 411 o 626.

Los pares de anticuerpos de la invención preferiblemente no reaccionan de forma cruzada con las proteínas del virus Zika. Preferiblemente, los pares de anticuerpos coincidentes de la invención tampoco reaccionan de forma cruzada con las proteínas del virus de la fiebre amarilla.

El "formato de media tira" (también referido aquí como una tira reactiva) junto con los formatos de ensayo de flujo lateral se encuentran entre los ejemplos en los que los anticuerpos descritos en la presente memoria se utilizan para detectar la infección por el virus del dengue. Además de usar pares específicos de anticuerpos para distinguir entre los serotipos del dengue, la combinación de anticuerpos también se puede utilizar para detectar cualquiera de los serotipos (detección de pan-dengue).

Preferiblemente, los anticuerpos de la invención también son útiles para unirse a los ligandos naturales (NS1 presente en suero, o fluidos corporales, o sobrenadantes infectados con células) que están unidos a superficies sólidas, tales como una placa de microtitulación con pocillos. El anticuerpo específico para una proteína NS1 del dengue específico puede inmovilizarse e incubarse apropiadamente con un anticuerpo secundario anti-ratón con diversos ligandos enzimáticos. Estos anticuerpos detectores se unirán a los anticuerpos de NS1 descritos en esta invención, y una señal detectable adicionalmente generada se interpretará entonces como la cantidad de NS1 contenida en la muestra original. Este tipo de técnica conocida como ELISA indirecto, en presencia de controles negativos adicionales, controles positivos y controles de corte; y/o tampones apropiados se puede utilizar como una manera de determinar numéricamente la cantidad inicial de proteína NS1 en una muestra dada.

Preferiblemente, los anticuerpos de la invención también son útiles en un ensayo de citometría de flujo o ensayo de inmunofluorescencia. El uso de anticuerpos para detectar una célula infectada con el virus del dengue es una aplicación alternativa mediante la cual las células que se infectan *in vivo* o *in vitro* se utilizan en un ensayo en combinación con los anticuerpos de la invención. Las células se pueden fijar y permeabilizar de acuerdo con los protocolos y se pueden incubar con una cantidad apropiada de anticuerpo, suficiente para unirse a la NS1 objetivo dentro y sobre la superficie de las células infectadas. La señal positiva es reconocida por un anticuerpo secundario anti-ratón que detecta de manera proporcional la intensidad de una luz fluorescente y mediante el uso de la detección por citometría de flujo de la detección por inmunofluorescencia, se obtiene el número y la proporción de células infectadas como resultado de este ensayo.

Los pares de anticuerpos coincidentes de la presente invención se pueden presentar en kits con marcadores detectables opcionales y otros reactivos tales como controles y tampones positivos o negativos para dicha detección. Preferiblemente, el kit incluye por lo menos un par de anticuerpos coincidentes de la invención. Preferiblemente, uno de los anticuerpos del par de anticuerpos coincidentes se marca, por ejemplo, con un marcador de detección colorimétrico. El anticuerpo marcado puede estar presente preferiblemente en un vial al que se añaden la muestra biológica y los tampones apropiados para permitir que el anticuerpo de detección marcado se compleje con cualquier antígeno objetivo que esté presente en la muestra. Alternativamente, el anticuerpo marcado se puede unir a, por ejemplo, la ubicación apropiada en una tira de ensayo tal como la descrita en la solicitud estadounidense con No. de serie 15/041,788, titulada Ensayo de Flujo Lateral Multiplexado de Hamad-Schifferli et al., presentada en la misma fecha que la presente e incorporada aquí como referencia. Preferiblemente, el anticuerpo de captura se une a una tira de ensayo o alternativamente puede estar presente en su propio vial hasta que se use en un

inmunoensayo apropiado. El kit puede comprender además un contenedor con un control positivo, un control negativo o un diluyente de muestra si es apropiado. Alternativamente, los controles se pueden unir a una tira de ensayo apropiada tal como la descrita en la Solicitud Estadounidense con No. de serie 15/041,788, titulada Ensayo de Flujo Lateral Multiplexado de Hamad-Schifferli et al.,
5 presentada en la misma fecha que la presente. Preferiblemente, el kit también comprende reactivos adicionales o tampones o equipo médico tal como jeringas estériles, para obtener o recolectar la muestra, un contenedor para contener y/o almacenar la muestra. Para usar el kit de la invención, una muestra biológica se recolecta de un humano tal como suero humano y luego se pone en contacto con el primer anticuerpo marcado del par de anticuerpos durante un tiempo suficiente y en
10 condiciones para que cualquier antígeno objetivo presente en el suero se una al primer anticuerpo. El complejo se pone entonces en contacto con el segundo anticuerpo del par de anticuerpos, preferiblemente como resultado de la acción capilar en la tira de ensayo que dibuja el complejo del primer anticuerpo de detección del par de anticuerpos en contacto con el segundo anticuerpo de captura del par de anticuerpos que da como resultado la unión detectable entre el primer anticuerpo
15 de detección marcado formando un complejo con el antígeno y el segundo anticuerpo de captura también unido al antígeno.

Además del uso de los novedosos anticuerpos de la invención como pares de anticuerpos coincidentes para el diagnóstico y detección de serotipos específicos de proteína NS1 del virus del dengue, uno o más anticuerpos individuales contra el virus del dengue de la invención
20 también son útiles como agentes terapéuticos o profilácticos en el tratamiento del virus del dengue. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención son útiles en el tratamiento de la infección DV crónica y/o aguda, por ejemplo, administrando a un paciente que padece o es susceptible de tal infección una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos de la invención. Preferiblemente, una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad suficiente para lograr uno
25 o más efectos biológicos particulares, que incluyen, pero no se limitan a, (i) reducir la gravedad o frecuencia de, y/o retrasar el inicio o la reaparición de uno o más síntomas o características de la infección por DV en un individuo susceptible o que padece infección por DV; y/o (ii) reducir el riesgo de infección y/o el desarrollo de uno o más síntomas o características de infección por DV en un individuo expuesto o en riesgo de exposición a infección por DV. Preferiblemente, los uno o más
30 síntomas o características de la infección por DV es o comprende fiebre alta y por lo menos uno o más síntomas adicionales seleccionados de, por ejemplo, dolor de cabeza severo, dolor ocular severo, dolor en las articulaciones, dolor muscular, dolor en los huesos, erupción, manifestación de sangrado leve (por ejemplo, sangrado de la nariz o encías, moretones fáciles), dolor abdominal, vómitos, heces negras, alquitranadas, somnolencia o irritabilidad, piel pálida, fría o pegajosa,

dificultad para respirar, recuento de glóbulos blancos bajo, partículas virales circulantes en un individuo o uno más tejidos (por ejemplo, sangre, médula ósea) u órganos (por ejemplo, hígado) del mismo. Preferiblemente, un individuo que padece infección por DV muestra fiebre alta y por lo menos dos de tales síntomas adicionales.

5 Preferiblemente, los anticuerpos de la invención pueden usarse para prevenir, reducir la recurrencia y/o retrasar el inicio de uno o más síntomas o características de la infección por DV. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención se pueden usar, por ejemplo, para la inmunización pasiva de individuos recientemente expuestos a DV o en riesgo de exposición a DV, recién nacidos de madres con DV positivo y/o pacientes de trasplante de hígado (por ejemplo, para prevenir
10 posibles infecciones recurrentes por DV en tales pacientes).

Preferiblemente, la presente invención proporciona métodos terapéuticos de tratamiento, utilizados después del desarrollo de uno o más síntomas de infección por DV. Preferiblemente, la presente invención proporciona métodos terapéuticos de profilaxis, utilizados antes del desarrollo de uno o más síntomas de infección por DV, y/o antes de la exposición a DV,
15 infección por DV, o riesgo de la misma. La presente invención también proporciona tecnologías de inmunización pasiva. Preferiblemente, los anticuerpos anti-dengue de la invención se combinan con una o más sustancias farmacéuticamente aceptables adicionales para proporcionar composiciones farmacéuticas. La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para el tratamiento, prevención, diagnóstico y/o caracterización de la infección por DV.

20 Preferiblemente, los anticuerpos anti-dengue de la invención se pueden utilizar junto con una o más terapias diferentes para tratar, reducir la incidencia, frecuencia o gravedad de, y/o retrasar el inicio de la infección por DV o uno o más síntomas o características del mismo. Por ejemplo, preferiblemente, los anticuerpos anti-dengue de la invención se utilizan junto con uno o más agentes antivirales, antiinflamatorios, analgésicos, agentes terapéuticos inmunomoduladores y
25 terapia de combinación, que preferiblemente implica otros objetivos de DV. Por ejemplo, preferiblemente, los anticuerpos anti-dengue de la invención se administran en combinación con uno o más interferones (por ejemplo, interferón α -2b, interferón- γ , etc.), analgésicos (preferiblemente que contienen paracetamol y no aspirina y/o ibuprofeno), anticuerpos monoclonales anti-DV, anticuerpos policlonales anti-DV, inhibidores de la ARN polimerasa, inhibidores de la proteasa, análogos de
30 nucleósidos, inhibidores de helicasa, inmunomoduladores, compuestos antisentido, ARN de interferencia corta (siRNA), ARN de horquilla corta (shRNA), micro ARN (miRNA) , aptámeros de ARN, ribozimas y combinaciones de los mismos.

Preferiblemente, la invención proporciona un anticuerpo anti-dengue cuya región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera incluye por lo menos una región

determinante de complementariedad (CDR) que comparte por lo menos 80% de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos 95% de identidad de secuencia y preferiblemente por lo menos 99% de identidad de secuencia, con una CDR de anticuerpo de referencia (Ab) 55 mostrada en la Figura 18.

5 Preferiblemente, la secuencia difiere por sustitución de por lo menos un residuo amino dentro de la referencia de por lo menos una CDR de Ab 55 de la Figura 18. Preferiblemente, el anticuerpo incluye por lo menos una CDR que es sustancialmente idéntica a por lo menos una CDR de referencia de Ab 55 ya que es idéntica a dicha CDR de referencia o incluye entre 1-5 sustituciones de aminoácidos dentro de dicha CDR de referencia. Preferiblemente, el anticuerpo incluye por lo menos una CDR
10 de cadena pesada que es sustancialmente idéntica a por lo menos una CDR Ab 55 de referencia de cadena pesada y también incluye por lo menos una CDR de cadena ligera que es idéntica a por lo menos una CDR Ab 55 de referencia de cadena ligera. Preferiblemente, cada una de las CDR en el anticuerpo es sustancialmente idéntica a por lo menos una de las CDR de referencia de Ab 55 de la Figura 18.

15 Preferiblemente, la invención proporciona un anticuerpo anti-dengue cuya región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera incluye por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) que comparte por lo menos 80% de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente a por lo menos 95% de identidad de secuencia y preferiblemente por lo menos 99% de identidad de
20 secuencia, con una CDR de referencia Ab 271 mostrada en la Figura 19. Preferiblemente, la secuencia difiere por sustitución de por lo menos un residuo amino dentro de la referencia de por lo menos una CDR de Ab 271 de la Figura 19. Preferiblemente, el anticuerpo incluye por lo menos una CDR que es sustancialmente idéntica a una CDR de referencia de Ab 271 de referencia en que es idéntica a dicha CDR de referencia o incluye entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos dentro de
25 dicha CDR de referencia. Preferiblemente, el anticuerpo incluye por lo menos una CDR de cadena pesada que es sustancialmente idéntica a por lo menos una CDR de Ab271 de referencia de cadena pesada y también incluye por lo menos una CDR de cadena ligera que es idéntica a por lo menos una CDR de Ab271 de referencia de cadena ligera. Preferiblemente, cada una de las CDR en el anticuerpo es sustancialmente idéntica a una de las CDR de referencia de Ab 271 de la Figura 19.

30 Preferiblemente, la invención proporciona un anticuerpo anti-dengue cuya región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera incluye por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) que comparte por lo menos 80% de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos un 95% de identidad de secuencia y preferiblemente por lo menos 99% de identidad de

secuencia, con una CDR del anticuerpo de referencia (Ab) 323 que se muestra en la Figura 20. Preferiblemente, la secuencia difiere por sustitución de por lo menos un residuo amino dentro de la referencia por lo menos una CDR de Ab 323 de la Figura 20. Preferiblemente, el anticuerpo incluye por lo menos una CDR que es sustancialmente idéntica a por lo menos una CDR de referencia de Ab 323 en que es idéntica a dicha CDR de referencia o incluye entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos dentro de dicha CDR de referencia. Preferiblemente, el anticuerpo incluye por lo menos una CDR de cadena pesada que es sustancialmente idéntica a por lo menos una CDR de Ab 323 de referencia de cadena pesada y también incluye por lo menos una CDR de cadena ligera que es idéntica a por lo menos una referencia de cadena ligera de CDR de Ab 323. Preferiblemente, cada una de las CDR en el anticuerpo es sustancialmente idéntica a por lo menos una de las CDRs de referencia de Ab 323 de la Figura 20.

Preferiblemente, la invención proporciona un anticuerpo cuya región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera incluye por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) que comparte por lo menos 80% de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos 95% identidad de secuencia y preferiblemente por lo menos 99% de identidad de secuencia, con una CDR del anticuerpo de referencia (Ab) 411 que se muestra en la Figura 21. Preferiblemente la secuencia difiere por sustitución de por lo menos un residuo amino dentro de la referencia de por lo menos una CDR de Ab 411 de la Figura 21. Preferiblemente, el anticuerpo incluye por lo menos una CDR que es sustancialmente idéntica a por lo menos una CDR de referencia de Ab 411 en que es idéntica a dicha CDR de referencia o incluye entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos dentro de dicha CDR de referencia. Preferiblemente, el anticuerpo incluye por lo menos una CDR de cadena pesada que es sustancialmente idéntica a por lo menos una CDR de Ab 411 de referencia de cadena pesada y también incluye por lo menos una CDR de cadena ligera que es idéntica a por lo menos una CDR de Ab 411 de referencia de cadena ligera. Preferiblemente, cada una de las CDRs en el anticuerpo es sustancialmente idéntica a por lo menos una de las CDR de referencia de Ab 411 de la Figura 21.

Preferiblemente, la invención proporciona un anticuerpo cuya región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera incluye por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) que comparte por lo menos 80% de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos 90% de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos 95% identidad de secuencia y preferiblemente por lo menos 99% de identidad de secuencia, con una CDR del anticuerpo de referencia de (Ab) 626 que se muestra en la Figura 22. Preferiblemente, la secuencia difiere por sustitución de por lo menos un residuo amino dentro de la referencia de por lo

menos una CDR de Ab 626 de la Figura 22. Preferiblemente, el anticuerpo incluye por lo menos una CDR que es sustancialmente idéntica a por lo menos una CDR de referencia de Ab 626 ya que es idéntica a dicha CDR de referencia o incluye entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos dentro de dicha CDR de referencia. Preferiblemente, el anticuerpo incluye por lo menos una CDR de cadena pesada que es sustancialmente idéntica a por lo menos una CDR de Ab 626 de referencia de cadena pesada y también incluye por lo menos una CDR de cadena ligera que es idéntica a por lo menos una cadena ligera de referencia de Ab 626 de CDR. Preferiblemente, cada una de las CDRs en el anticuerpo es sustancialmente idéntica a por lo menos una de las CDRs de referencia de Ab 626 de la Figura 22.

Preferiblemente, la invención proporciona un anticuerpo que es una IgG. Preferiblemente, un anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Preferiblemente, un anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo purificado, un anticuerpo aislado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo policlonal y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, se proporciona un anticuerpo en el que el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en: un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd, un fragmento Fd', un fragmento Fv, un fragmento dAb, un fragmento scFv, una región CDR aislada, un diacuerpo dsFv, un anticuerpo monocatenario y combinaciones de los mismos.

Preferiblemente, la invención proporciona una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos anti-dengue de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde la composición farmacéutica trata por lo menos una infección por serotipo de virus del dengue en un paciente. Preferiblemente, una composición farmacéutica incluye además por lo menos un agente antiviral adicional. Preferiblemente, la invención proporciona métodos para tratar a un sujeto que lo necesita que padece una infección causada por lo menos por un serotipo del virus del dengue, que incluye la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-dengue de la invención.

Preferiblemente, la invención proporciona métodos para fabricar composiciones farmacéuticas, el método incluye las etapas de proporcionar un anticuerpo anti-dengue de la invención (por ejemplo, Ab 55, Ab 271, Ab323, Ab 411, Ab 626, y otros) y formular el anticuerpo con por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable, de modo que se genere una composición farmacéutica. Preferiblemente, la composición farmacéutica es una composición líquida. Preferiblemente, la composición farmacéutica se formula para administración parenteral. Preferiblemente, la composición farmacéutica se formula para administración intravenosa.

Preferiblemente, la composición farmacéutica se formula para administración intravenosa a un niño. Preferiblemente, la composición farmacéutica se formula para administración oral.

Los anticuerpos anti-dengue de la invención o porciones de los mismos, o ácidos nucleicos que los codifican, se pueden producir por cualquier medio disponible. Los métodos para generar anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y/o anticuerpos policlonales) son bien conocidos en la materia. Se apreciará que una amplia gama de especies de animales se puede usar para la producción de antisueros, incluyendo el conejo, el ratón, la rata, el hámster, el cobayo o la cabra. La elección del animal puede decidirse por la facilidad de manipulación, los costos o la cantidad deseada de sueros, como lo sabrá un experto en la materia. Se apreciará que el agente de anticuerpo también se puede producir transgénicamente a través de la generación de un mamífero o planta que es transgénico para las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable a partir de la misma. En relación con la producción transgénica en mamíferos, los anticuerpos pueden producirse y recuperarse de la leche de cabras, vacas u otros mamíferos. Los anticuerpos anti-dengue de la invención y/o porciones de los mismos se pueden producir, por ejemplo, utilizando un sistema de célula hospedadora diseñado para expresar un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención. Alternativa o adicionalmente, los anticuerpos anti-dengue pueden prepararse parcial o totalmente mediante síntesis química (por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos automático).

Las fuentes ejemplares de anticuerpos anti-dengue de la invención incluyen, sin limitación, medio de cultivo acondicionado derivado del cultivo de una línea celular recombinante que expresa una proteína de interés, o de un extracto celular de, por ejemplo, células productoras de anticuerpos, bacterias, células fúngicas, células de insectos, plantas transgénicas o células vegetales, animales transgénicos o células animales, o suero de animales, líquido ascítico, hibridoma o sobrenadantes de mieloma. Las células bacterianas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células de *Escherichia coli*. Los ejemplos de cepas de *E. coli* adecuadas incluyen: HB101, DH5 α , GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539, y cualquier cepa de *E. coli* que no escinda ADN extraño. Las células hospedadoras fúngicas adecuadas que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y células de *Aspergillus*. Las células de insecto adecuadas incluyen, pero sin limitación, células Schneider S2, células D. Mel-2, células SF9, SF21, HIGH-5™, MIMIC™-SF9, MG1 y KC1. Las líneas celulares recombinantes ejemplares adecuadas incluyen, pero no se limitan a, línea de mieloma de ratón BALB/c, retinoblastos humanos (PER.C6), células de riñón de mono, línea de riñón embrionario humano (293), células de riñón de hámster bebé (BHK), células de ovario de hámster chino (CHO), células de ratón de Sertoli, células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HeLa), células

de riñón canino, células de hígado de rata búfalo, células de pulmón humano, células de hígado humano, células de tumor de mama de ratón, células TR1, células MRC 5, células FS4 y línea de hepatoma humano (Hep G2).

Los anticuerpos anti-dengue de la invención se pueden expresar usando diversos
5 vectores (por ejemplo, vectores virales) conocidos en la materia y las células se pueden cultivar en diversas condiciones conocidas en la materia (por ejemplo, lote de alimentación). Diversos métodos de ingeniería genética de las células para producir anticuerpos son bien conocidos en la materia. (Véase, por ejemplo, Ausabel et al., Eds. (1990), *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, Nueva York)).

10 Los anticuerpos anti-dengue se pueden purificar, si se desea, usando filtración, centrifugación y/o diversos métodos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de afinidad. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpos anti-dengue se obtienen por métodos que incluyen digestión con enzimas, tales como pepsina o papaína, y/o mediante escisión de enlaces disulfuro por reducción química.

15 El anticuerpo anti-dengue de la invención también se puede usar para identificar y/o caracterizar otros agentes de unión al virus del dengue (por ejemplo, anticuerpos, polipéptidos, moléculas pequeñas, etc.).

La presente invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo anti-dengue de la invención. Los ácidos nucleicos preferidos de los anticuerpos anti-
20 dengue de la invención se encuentran en las Figuras 18-22. La invención también proporciona ácidos nucleicos que son complementarios a ácidos nucleicos que codifican un agente de anticuerpo.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos anti-dengue de la invención (por ejemplo, Ab 55, Ab 271, Ab323, Ab 411, Ab
25 626 y otros). Preferiblemente, la presente invención proporciona por lo menos un anticuerpo de la invención y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender y/o administrarse opcionalmente en combinación con una o más sustancias terapéuticamente activas adicionales. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas proporcionadas son útiles como agentes profilácticos (es decir, vacunas) en el tratamiento o
30 prevención de uno o más serotipos de infección por DV o de ramificaciones negativas asociadas o correlacionadas con infección por DV. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas son útiles en aplicaciones terapéuticas, por ejemplo en individuos que padecen o son susceptibles a uno o más serotipos de infección por DV. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se formulan para administración a humanos.

Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento pueden proporcionarse en una forma inyectable estéril (por ejemplo, una forma que es adecuada para inyección subcutánea o infusión intravenosa). Por ejemplo, preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se proporcionan en una forma de dosificación líquida que es adecuada para inyección.

5 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se proporcionan como polvos (por ejemplo, liofilizados y/o esterilizados), opcionalmente al vacío, que se reconstituyen con un diluyente acuoso (por ejemplo, agua, tampón, solución salina, etc.) antes de la inyección. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se diluyen y/o reconstituyen en agua, solución de cloruro de sodio, solución de acetato de sodio, solución de alcohol bencílico, solución salina tamponada con fosfato,
10 etc. Preferiblemente, el polvo se debe mezclar suavemente con el diluyente acuoso (por ejemplo, no agitarse).

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas proporcionadas comprenden uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, conservador, diluyente inerte, agente dispersante, agente tensioactivo y/o emulsionante, agente tamponante, etc.).

15 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas comprenden uno o más conservadores. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas no comprenden conservador.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se proporcionan en una forma que puede refrigerarse y/o congelarse. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se proporcionan en una forma que no se puede refrigerar y/o congelar. Preferiblemente, las soluciones reconstituidas y/o las formas de dosificación líquidas pueden almacenarse durante un cierto período
20 de tiempo después de su reconstitución (por ejemplo, 2 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 5 días, 7 días, 10 días, 2 semanas, un mes, dos meses o más).

Las formas de dosificación líquidas y/o las soluciones reconstituidas pueden comprender material particulado y/o decoloración antes de la administración. Preferiblemente, una
25 solución no se debe usar si está decolorada o turbia y/o si queda materia particulada después de la filtración.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en este documento se pueden preparar mediante cualquier método conocido o en desarrollo en la técnica de la farmacología. Preferiblemente, tales métodos preparatorios incluyen la etapa de poner en relación
30 el ingrediente activo con uno o más excipientes y/o uno o más de otros ingredientes accesorios, y luego, si es necesario y/o deseable, conformar y/o envasar el producto en una dosis unitaria única o múltiple deseada.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede preparar, envasar y/o vender a granel, como una dosis unitaria única, y/o como una pluralidad de dosis

unitarias únicas. Como se usa en este documento, una “dosis unitaria” es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo generalmente es igual a la dosis que se administraría a un sujeto y/o una fracción conveniente de dicha dosis tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosis.

5 Cantidades relativas de ingrediente activo, excipiente farmacéuticamente aceptable, y/o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de acuerdo con la invención pueden variar, dependiendo de la identidad, tamaño y/o condición del sujeto tratado y/o dependiendo de la vía por la que se administrará la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre 0.1% y 100% (p/p) de ingrediente activo.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable que, tal como se usa en el presente documento, puede ser o comprender disolventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservadores, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según se
15 adapten a la forma de dosificación particular deseada. *Remington's, The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª Edición, A.R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) describe diversos excipientes utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de las mismas.

20 Se apreciará que se puede emplear un anticuerpo anti-dengue de la invención (por ejemplo, Ab 55, Ab 271, Ab 323, Ab 411, Ab 626, y otros) de acuerdo con la presente invención y/o sus composiciones farmacéuticas. en terapias de combinación. Por “en combinación con”, no pretende implicar que los agentes se deben administrar al mismo tiempo y/o formularse para administración conjunta, aunque estos métodos de administración están dentro del alcance de la invención. Las composiciones se pueden administrar concurrentemente con, antes o después de,
25 uno o más procedimientos terapéuticos o médicos deseados. Se apreciará que los agentes terapéuticamente activos utilizados en combinación pueden administrarse juntos en una única composición o administrarse por separado en diferentes composiciones. En general, cada agente se administrará en una dosis y/o en un cronograma determinado para ese agente.

30 La combinación particular de terapias (por ejemplo, terapéuticas o procedimientos) para emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los procedimientos terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado a alcanzar. También se apreciará que las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden emplear en terapias de combinación (por ejemplo, terapias de vacunas combinadas), es

decir, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar simultáneamente con, antes o después de, uno o más de otros procedimientos terapéuticos y/o de vacunación deseados.

Las cantidades terapéuticamente efectivas de anticuerpos anti-dengue de acuerdo con la invención se combinan para su uso en combinación con una composición farmacéutica proporcionada y por lo menos otro ingrediente activo. Preferiblemente, un ingrediente activo es un agente antiviral, tal como, pero no limitado a, interferones (por ejemplo, interferón α -2b, interferón- γ , etc.), anticuerpos monoclonales anti-DV, anticuerpos policlonales anti-DV, ARN. inhibidores de polimerasa, inhibidores de proteasa, inhibidores de helicasa, inmunomoduladores, compuestos antisentido, ARN de interferencia corta, ARN de horquilla corta, micro ARN, aptámeros de ARN, ribozimas y combinaciones de los mismos. La combinación particular de terapias para emplear en un régimen de combinación generalmente tendrá en cuenta la compatibilidad de los procedimientos terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado a alcanzar. También se apreciará que las terapias y/o vacunas empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un antígeno de la invención puede administrarse simultáneamente con otra vacuna DV), o puede lograr diferentes efectos.

Se apreciará que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo propósito (por ejemplo, los anticuerpos DV útiles para tratar, prevenir y/o retrasar el inicio de la infección por DV pueden administrarse simultáneamente con otro agente útil para tratar, prevenir y/o retrasar el inicio de la infección por DV), o pueden lograr diferentes efectos (por ejemplo, el control de cualquier efecto adverso). La invención abarca la administración de composiciones farmacéuticas en combinación con agentes que pueden mejorar su biodisponibilidad, reducir y/o modificar su metabolismo, inhibir su excreción y/o modificar su distribución dentro del cuerpo.

Preferiblemente, los agentes utilizados en combinación se utilizan a niveles que no exceden los niveles a los que se utilizan individualmente. Preferiblemente, los niveles utilizados en combinación serán menores que los utilizados individualmente.

Preferiblemente, los anticuerpos anti-dengue de acuerdo con la invención pueden administrarse con interferón, con inhibidores de ARN polimerasa o con ambos inhibidores de interferón y ARN polimerasa.

Preferiblemente, la terapia de combinación puede implicar administraciones de una pluralidad de anticuerpos anti-dengue dirigidos a diferentes proteínas de DV, por ejemplo, para interferir simultáneamente con múltiples mecanismos en el proceso infeccioso.

Un experto en la técnica apreciará que cualquier permutación o combinación de anticuerpos anti-dengue de acuerdo con la presente invención se puede combinar con cualquier otro

agente de anticuerpo para formular composiciones y/o regímenes de terapia de combinación que comprenden una pluralidad de diferentes anticuerpos anti-dengue.

Los anticuerpos anti-dengue de acuerdo con la invención y las composiciones farmacéuticas de los mismos de acuerdo con la presente invención se pueden administrar de acuerdo con cualquier vía y régimen apropiados. Preferiblemente, una vía o régimen es uno que se ha correlacionado con un beneficio terapéutico positivo. Preferiblemente, una vía o régimen es uno que ha sido aprobado por la FDA y/o la EP.

Preferiblemente, la cantidad exacta administrada puede variar de un sujeto a otro, dependiendo de uno o más factores, como es bien sabido en la materia médica. Tales factores pueden incluir, por ejemplo, una o más de la especie, la edad, el estado general del sujeto, la gravedad de la infección, la composición particular, su modo de administración, su modo de actividad, el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del anticuerpo anti-dengue específico empleado; la composición farmacéutica específica administrada; la vida media de la composición después de la administración; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado y similares. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones de la presente invención será decidido por el médico tratante dentro del alcance de un juicio médico sólido.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar por cualquier vía, como apreciarán los expertos en la materia. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran por vía oral (PO), intravenosa (IV), intramuscular (IM), intraarterial, intramedular, intratecal, subcutánea (SQ), intraventricular, transdérmica, interdérmica, intradérmica, rectal (PR), vaginal, intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), tópica (por ejemplo, en forma de polvos, ungüentos, cremas, geles, lociones y/o gotas), mucosal, intranasal, bucal, enteral, vítrea, sublingual; por instilación intratraqueal, instilación bronquial y/o inhalación; como un aerosol oral, aerosol nasal y/o aerosol, y/o a través de un catéter de vena porta.

Preferiblemente, los anticuerpos anti-dengue de acuerdo con la presente invención y/o las composiciones farmacéuticas de los mismos se pueden administrar por vía intravenosa, por ejemplo, mediante infusión intravenosa. Preferiblemente, los anticuerpos anti-dengue de acuerdo con la presente invención y/o sus composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inyección intramuscular. Preferiblemente, los anticuerpos anti-dengue de acuerdo con la presente invención

y/o sus composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inyección subcutánea. Preferiblemente, los anticuerpos anti-dengue de acuerdo con la presente invención y/o sus composiciones farmacéuticas se pueden administrar a través de un catéter de vena porta. Sin embargo, la invención abarca la administración de anticuerpos anti-dengue DV de acuerdo con la presente invención y/o composiciones farmacéuticas de los mismos por cualquier vía apropiada teniendo en cuenta los probables avances en las ciencias de la administración de fármacos.

Preferiblemente, los anticuerpos anti-dengue de acuerdo con la presente invención y/o las composiciones farmacéuticas de los mismos de acuerdo con la invención se pueden administrar a niveles de dosificación suficientes para liberar de aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0.5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal del sujeto por día para obtener el efecto terapéutico deseado. La dosis deseada puede administrarse más de tres veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, cada dos días, cada tres días, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada dos meses, cada seis meses o cada doce meses. Preferiblemente, la dosificación deseada puede administrarse usando administraciones múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o más administraciones).

Preferiblemente, los anticuerpos anti-dengue de acuerdo con la invención se pueden utilizar para aplicaciones profilácticas. Preferiblemente, las aplicaciones profilácticas implican sistemas y métodos para prevenir, inhibir la progresión y/o retrasar el inicio de la infección por DV, y/o cualquier otra afección asociada a DV en individuos susceptibles y/o que muestran síntomas de infección por DV. Preferiblemente, las aplicaciones profilácticas implican sistemas y métodos para prevenir, inhibir la progresión y/o retrasar el inicio de la infección del cerebro. Preferiblemente, las aplicaciones profilácticas implican sistemas y métodos para prevenir, inhibir la progresión y/o retrasar el deterioro de órganos vitales (por ejemplo, hígado).

Ejemplos

La presente invención se entenderá mejor en relación con los siguientes Ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de la invención. Diversos cambios y modificaciones serán evidentes para los expertos en la materia, y dichos cambios y modificaciones incluyen, sin limitación, aquellas

relacionadas con las formulaciones y/o métodos de la invención que pueden realizarse sin apartarse del espíritu de la invención y el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Preparación de Glicoproteína NS1 Recombinante.

La proteína NS1 de longitud completa de cada uno de los serotipos de dengue se obtuvo de una fuente comercial (*Native Antigen Company*, Oxfordshire, RU), utilizando un sistema de expresión de mamíferos. Brevemente, se concentró NS1 secretada, se purificó usando cromatografía de vidrio, y se examinó mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras, con y sin tratamiento térmico. Ningún tratamiento térmico asegura que los dímeros de NS1 se puedan observar mediante SDS-PAGE. Los resultados demostraron la presencia de monómeros glucosilados, dímeros glucosilados y una pequeña fracción de monómeros no glucosilados y dímeros no glucosilados.

Ejemplo 2: Preparación de anticuerpos para glicoproteína NS1.

Sueros de ratones policlonales y anticuerpos monoclonales contra la glicoproteína NS1 del dengue aislada como se describe y en combinación con un método de selección se prepararon generalmente de la siguiente manera.

Se emulsionaron 30 µg de NS1 purificada en 50 µl de PBS con el mismo volumen de adyuvante de Freund completo y se inyectó por vía subcutánea en un ratón Balb/c hembra de 5 semanas de edad. Siete días más tarde, se inyectó por vía intraperitoneal la misma cantidad de NS1 emulsificada con adyuvante incompleto de Freund en el mismo ratón. La inyección se repitió una vez más 21 días después de la inyección inicial. En los días 42, 43 y 46, el ratón recibió inyecciones intraperitoneales de 30 µg de NS1 en 50 µl de PBS sin adyuvante. Dos días después, el animal se sacrificó y el bazo se extirpó en condiciones estériles.

El bazo se homogeneizó con tijeras en medio RPMI 1640 sin suero, y se pasó a través de un filtro de células de nailon para formar una suspensión de esplenocitos. Los esplenocitos se recolectaron por centrifugación, los eritrocitos se eliminaron mediante reactivo de lisis de eritrocitos y se lavaron con RPMI 1640. Se cultivaron células de mieloma de ratón en medio H-FSM, que contenía FBS al 5% hasta una densidad de 4.3×10^5 /ml. Un número total de 5.6×10^8 células de mieloma, y esplenocitos por separado, se lavaron extensivamente mediante centrifugación con medio RPMI 1640 precalentado a 37°C. Las células de mieloma y los esplenocitos se combinaron, se centrifugaron juntos y el sedimento se rompió sutilmente. La fusión celular se realizó añadiendo solución de polietilenglicol (1,500 Mw) gota a gota al sedimento celular a 37°C. Las células resultantes se lavaron con RPMI 1640, se resuspendieron en 300 ml de FBS precalentado H-SFM

al 5% y se distribuyeron en treinta placas de cultivo celular de 96 pocillos, 100 µl de la suspensión celular por pocillo.

Las células se dejaron crecer durante un día, y se seleccionaron con 130 µl por pocillo de la doble concentración de medio HAT en H-SFM con FBS. Siete días después, se eliminaron 130 µl de cada contenido de pocillo y se sustituyeron por medio nuevo y similar que contenía HAT a la concentración recomendada.

Trece días después de la fusión celular, los sobrenadantes de cultivo de las líneas de hibridoma resultantes se analizaron mediante un ensayo ELISA Pan NS1. Las NS1 de cada uno de los serotipos del dengue se mezclaron en porciones iguales, la mezcla se revistió sobre placas ELISA (100 ng por pocillo en 50 µl de tampón de carbonato/bicarbonato de sodio, pH 9.6) durante la noche a 4°C, y los pocillos se bloquearon con 200 µl por pocillo de 5% de leche desnatada en polvo en PBS que contiene 0.05% de TWEEN™20 (Tampón de Lavado ELISA, EWB) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del bloqueo, los pocillos se lavaron seis veces con EWB en un lavador de placas automatizado, y los sobrenadantes del cultivo de hibridoma se incubaron en los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de otro lavado, los pocillos se incubaron con anticuerpos de cabra específicos para inmunoglobulina de ratón, marcados con peroxidasa de rábano picante durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron de nuevo y se visualizaron con reactivo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. La reacción se detuvo con 1N de ácido sulfúrico y se leyó en un lector de placas ELISA a 450 nm de longitud de onda.

Los pocillos de hibridoma correspondientes a los resultados positivos de ELISA frente a una mezcla de los cuatro serotipos de NS1 de dengue se transfirieron a pocillos de una placa de cultivo celular de 96 pocillos y se cultivaron en 1 ml de medio H-FSM/FBS que contenía aditivo de HT. Las líneas se verificaron repetidamente para detectar la secreción específica de anticuerpos y el sobrenadante de los pocillos positivos se realizó secuencialmente en 4 pruebas ELISA individuales, y los pocillos positivos y los resultados individuales positivos y negativos se informaron. La lista de clones, expansión y reevaluación se realizó utilizando un análisis FACS de células Vero infectadas con cuatro serotipos diferentes del virus del dengue, los clones individuales se expandieron aún más, se clonaron mediante dilución limitante y se criopreservaron en una versión final de una línea estable de hibridoma “subclonado”.

Ejemplo 3: Secuenciación de anticuerpos producidos por hibridomas.

El ARN total se extrajo de células de hibridoma congeladas proporcionadas por el cliente y el ADNc se sintetizó a partir del ARN. Luego se realizó la PCR para amplificar las regiones

variables (cadenas pesadas y ligeras) del anticuerpo, que luego se clonaron en un vector de clonación estándar por separado y se secuenciaron.

Materiales

- Células de hibridoma de los hibridomas 724-55, 724-271, 724-323, 724-411 y 724-626.
- Reactivo TRIzol® (Ambion, Cat. No.: 15596-026);
- PrimeScript™ Kit de Síntesis de ADNc de Primera hebra (Takara, Cat. No.: 6110A).

Métodos

Se aisló el ARN total de las células de hibridoma siguiendo el manual técnico del Reactivo TRIzol®. El ARN total se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. El ARN total se transcribió de forma inversa en ADNc utilizando cebadores antisentido específicos de isotipo o cebadores universales siguiendo el manual técnico del kit de síntesis de ADNc de primera hebra PrimeScript™. Los fragmentos de anticuerpos de VH y VL se amplificaron de acuerdo con los procedimientos estándar. Los fragmentos de anticuerpos amplificados se clonaron por separado en un vector de clonación estándar usando procedimientos de clonación molecular estándar. Se realizó una selección de PCR de colonias para identificar clones con insertos de tamaños correctos. Se secuenciaron no menos de cinco colonias individuales con insertos de tamaños correctos para cada fragmento de anticuerpo.

Resultados y análisis

El ARN total aislado de la muestra se ejecutó junto con un marcador de ADN *Marker III* (TIANGEN), Cat. No.: MD103) en un gel de agarosa al 1.5%/GelRed™. Se corrieron cuatro microlitros de productos de PCR de cada muestra junto con el marcador de ADN *Marker III* en un gel de agarosa al 1.5%/GelRed™. Los productos de PCR se purificaron y almacenaron a -20°C hasta su uso posterior. Se enviaron cinco colonias individuales con los tamaños correctos de inserción de VH y VL para la secuenciación. Los genes VH y VL de cinco clones diferentes (ver el archivo adjunto para la secuencia y la alineación de la secuencia para obtener detalles) resultaron ser casi idénticos.

Se cree que la secuencia consenso de la Figura 18 es la secuencia del anticuerpo producido por el hibridoma MA724-55. Se cree que la secuencia de consenso de la Figura 19 es la secuencia del anticuerpo producido por el hibridoma MA724-271. Se cree que la secuencia

consenso de la Figura 20 es la secuencia del anticuerpo producido por el hibridoma MA724-323. Se cree que la secuencia consenso de la Figura 21 es la secuencia del anticuerpo producido por el hibridoma MA724-411. Se cree que la secuencia de consenso de la Figura 22 es la secuencia del anticuerpo producido por el hibridoma MA724-626.

Ejemplo 4: Caracterización de anticuerpos generados contra NS 1.

Los anticuerpos purificados por afinidad se obtuvieron por cromatografía de Proteína L y luego se resuspendieron en tampón de fosfato y se refrigeraron hasta su uso. La conjugación de anticuerpos a la superficie de nanopartículas de oro se realizó siguiendo procedimientos comerciales de unión de anticuerpos modificados (Innova, Inc). Los anticuerpos conjugados se utilizaron en una prueba de flujo lateral o una prueba de media tira para encontrar la detección óptima de los ligandos por medio de la intensidad, presencia o ausencia de una señal de color en la superficie de la tira.

La capacidad de los mAbs para hacer pares específicos para la adaptación a una detección de flujo lateral de infecciones por dengue se probó usando iteraciones de todas las combinaciones posibles y se seleccionó la combinación con la mejor capacidad de unión como el “par” preferible para realizar la prueba usando una infección de laboratorio de referencia o una muestra de un paciente con determinación de serotipo PCR positiva conocida. Además, el virus detectado por PCR se secuenció completamente para determinar la ubicación geográfica del virus aislado que se utiliza en todo el mundo. Las muestras del Viejo Mundo y del Nuevo Mundo fueron igualmente detectables por los pares de anticuerpos.

Los isotipos de los mAb específicos de NS1 del dengue se evaluaron mediante ELISA y mediante pruebas rápidas obtenidas de una fuente comercial para definir sus isotipos de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b).

Las curvas de Langmuir se generaron para calcular una constante de afinidad para cada anticuerpo. Las imágenes de la línea de prueba se convirtieron en escala de grises, y luego se obtuvo la intensidad de la línea de prueba en relación con el fondo utilizando el software de imágenes (*NIH ImageJ*). Las intensidades de línea de prueba en función de la concentración de antígeno (c) se ajustan a la siguiente ecuación:

$$\text{Intensidad} = c / (K_d^{\text{eff}} \times (1 + (c / K_d^{\text{eff}})))$$

que da como resultado un valor para K_d^{eff} , que es una constante de disociación efectiva y una medida de la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

La sensibilidad del extremo inferior de este ensayo indicó que los niveles de 2 ng-20 ng fueron detectables en un formato de media tira. Se encontró que los cálculos de K_d^{eff} para los pares de anticuerpos 271/912 para unirse a la proteína NS1 del serotipo DV1 eran de 1.099 nM. Se encontró que el K_d^{eff} para el par de anticuerpos 626/55 para unirse a la proteína NS1 del serotipo DV4 era de 0.06742 nM. Los valores numéricos para los datos de sensibilidad se encuentran en la Figura 26 y en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Valores Numéricos de Prueba de Sensibilidad

Análisis	Bueno	Excelente	Excelente	Excelente	Excelente
Áreas	0.88	0.95	1.00	0.98	0.95
Corte	1.14	1.18	1.20	1.37	1.19
Sensibilidad al corte	0.76	0.89	1.00	1.00	0.88
Sensibilidad al corte	0.89	0.98	1.00	0.96	1.00
NÚM. TODOS positivos	17	9	16	6	58
NÚM. TODOS negativos	37	45	39	46	11
NÚM. Verdaderos positivos	13	8	16	6	51
NÚM. Verdaderos negativos	33	44	39	44	11
NÚM. Falsos positivos	4	1	0	0	7
NÚM. Falsos negativos	4	1	0	2	0

Ejemplo 5: Comparación de Epítomos para Anticuerpos Monoclonales de NS1.

Después se realizó un ensayo de unión a epítomos para determinar la unión a péptidos inmovilizados en nitrocelulosa, cada péptido fue proporcionado por un repertorio sin fines de lucro de reactivos de Biodefensa (distribución ATCC) indicados en la Tabla 2 como BEI y después de la dilución en el tampón apropiado, cada péptido fue detectado a 10 µg usando una pipeta manual. Los anticuerpos se diluyeron e incubaron con la matriz de péptidos detectados en la nitrocelulosa y se bloquearon en solución de leche en polvo, de manera similar a la realización de un procedimiento de *Western Blot*, la detección final de la unión a cada uno de los péptidos detectados se realizó mediante una señal de luminiscencia proveniente de un anticuerpo anti-ratón secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante y la solución de sustrato apropiada y la visualización de la membrana se realizaron en un instrumento *ChemiDoc* para generar un resultado fotográfico de la membrana. Dado que la matriz se compuso con péptidos individuales localizados en ubicaciones

específicas, el número y la identidad de las manchas positivas se registró e informó como epítomos positivos como se muestra en las Figuras 10-15 y las Figuras 24-26.

Ejemplo 6: Alineación de Proteínas NS 1 y Mapeo de Epítomos Lineales

Se determinó la alineación de proteínas NS1 y el mapeo de epítomos lineales de los anticuerpos utilizados en las pruebas rápidas de NS1 específicas del serotipo del virus dengue y en la prueba NS1 pan-dengue. La comparación de la similitud de aminoácidos se basó en el análisis de secuencias de proteínas NS1 de los siguientes virus: DENV1-Cepa Singapore/S275/1990, número de acceso P33478; DENV2-Cepa NGC, número de acceso AAA42941; DENV3-Filipinas/H87/1956, número de acceso AAA99437; DENV4-Singapur/8976/1995, número de acceso AAV31422. Las secuencias de aminoácidos se compararon mediante un programa de software de alineación, *Color Align Conservation* (Stothard P (2000) *The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. Biotechniques* 28: 1102-1104) para el resultado del programa de alineación de secuencias y los resultados se muestran en la Figura 27. Los residuos que son idénticos entre las secuencias reciben un fondo negro, y los que son similares entre las secuencias reciben un fondo gris. Los residuos restantes reciben un fondo blanco. Los epítomos de péptidos lineales representados por los anticuerpos 323, 1, 55, 912, 243 y 626 se muestran en la Tabla 2. La columna izquierda de la Tabla 2 muestra el número de anticuerpos, y la columna central muestra el uso de los anticuerpos en las pruebas rápidas. La columna de la derecha muestra epítomos lineales en las proteínas virales NS1 que se definieron experimentalmente.

Tabla 2. Epítomos Reconocidos por Anticuerpos Probados

mAb #	APLICACIÓN DE INMUNOCROMATOGRAFÍA	EPÍTOPO LINEAL
271	membrana, tira reactiva 1 (DENV serotipo 1) nanopartículas, tira reactiva 5 (pan-DENV)	DV3 NS1: MELKYSWKTWGLAKIVT (SEQ ID NO: 2) [BEI]
912	nanopartículas, tira reactiva 1 (DENV serotipo 1)	DV1 NS1 YGGPISQHNYR (SEQ ID NO: 33)
1	membrana, tira reactiva 2 (DENV serotipo2)	DV1 NS1: MIRPQPMEHKYSWKS (SEQ ID NO: 34) DV1 NS1: HKYSWKSWSGKAKIIG (SEQ ID NO: 35)
243	nanopartículas, tira reactiva 2 (DENV serotipo 2) nanopartículas, tira reactiva 5 (pan-DENV)	DV2 NS1: GGPVSQHNYR (SEQ ID NO: 36)
55	membrana, tira reactiva 3 (DENV serotipo 3)	DV3 NS1: MELKYSWKTWGLAKIVT (SEQ ID NO: 2) [BEI] DV3.NS1: GVFTTNIWLKLREVYTQ (SEQ ID NO: 3) [BEI] DV3.NS1: VEDYGFGVFTTNIWLKL (SEQ ID NO: 3) [BEI]

		4) [BEI] DV4.NS1: GFGMFTTNIWMKFREG SEQ ID NO: 5) [BEI]
411	nanopartículas, tira reactiva 3 (DENV serotipo 3) nanopartículas, tira reactiva 5 (pan-DENV)	DV3 NS1: MELKYSWKTWGLAKIVT SEQ ID NO: 2) [BEI] DV1 NS1: IWLKLRDSYTQMCDH (SEQ ID NO: 37)
55	membrana, tira reactiva 4 (DENV serotipo 4)	DV3 NS1: MELKYSWKTWGLAKIVT (SEQ ID NO: 2) [BEI] DV3 NS1: GVFTTNIWLKLREVTQ (SEQ ID NO: 3) [BEI] DV3 NS1: VEDYGFGVFTTNIWLKL (SEQ ID NO: 4) [BEI] DV4 NS1: GFGMFTTNIWMKFREG (SEQ ID NO: 5)
626	membrana, tira reactiva 4 (DENV serotipo 4) nanopartículas, tira reactiva 5 (pan-DENV)	DV3 NS1: MELKYSWKTWGLAKIVT (SEQ ID NO: 2) [BEI] DV4 NS1: GFGMFTTNIWMKFREG (SEQ ID NO: 5) [BEI]
323	membrana, tira reactiva 5 (pan-DENV)	DV2.p15: TELKYSWKTWKGAKML (SEQ ID NO: 28) [BEI] DV3.p20: MELKYSWKTWGLAKIVT (SEQ ID NO: 2) [BEI] DV3.p29: GVFTTNIWLKLREVTQ (SEQ ID NO: 34) [BEI] DV4.p20: PVNDLKYSWKTWKGAKI (SEQ ID NO: 1) [BEI]

La patente y la literatura científica a las que se hace referencia en este documento establecen el conocimiento que está disponible para los expertos en la materia. Todas las patentes de los Estados Unidos y las solicitudes de patente de los Estados Unidos publicadas o no publicadas citadas en este documento se incorporan como referencia. Todas las patentes extranjeras publicadas y las solicitudes de patentes citadas en este documento se incorporan aquí como referencia. Todas las demás referencias, documentos, manuscritos y bibliografía científica publicados aquí citados se incorporan aquí por referencia.

Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a modalidades preferidas de la misma, los expertos en la materia entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcado por las reivindicaciones adjuntas. También debe entenderse que las modalidades preferidas descritas en este documento no son mutuamente excluyentes y que las características de las diversas modalidades preferidas se pueden combinar en su totalidad o en parte de acuerdo con la invención.