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

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a epítopos del virus del Zika ("ZIKV", por sus siglas en inglés). Dichos anticuerpos (i) neutralizan potencialmente la infección del virus del Zika (ZIKV) o (ii) se dirigen contra la proteína no estructural 1 ("NS1", por sus siglas en inglés) de ZIKV y se pueden usar como diagnóstico. La invención también se refiere a los sitios antigénicos a los que se unen los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno, así como a los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos e inmortalizan las células B que producen dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Además, la invención se refiere al uso de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención en métodos de análisis, así como en el diagnóstico, prevención y tratamiento de la infección por ZIKV.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El virus del Zika (ZIKV), un flavivirus transmitido por mosquitos, es una emergencia de salud pública. El ZIKV se aisló por primera vez a partir de macacos en 1947, en el bosque de Zika en Uganda (G. W. A. Dick, S. F. Kitchen, A. J. Haddow, Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 46, 509–520 (1952)) y la primera infección humana se reportó en Nigeria en 1954 F. N. Macnamara, Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 48, 139–145 (1954)). Desde entonces, las infecciones por ZIKV se informaron esporádicamente en África y el sureste de Asia (D. Musso, Van Mai Cao-Lormeau, D. J. Gubler, Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *The Lancet*. 386, 243–244 (2015)), pero se registraron epidemias en Micronesia en 2007 (M. R. Duffy *et al.*, Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 360, 2536–2543 (2009)) y en la Polinesia Francesa en 2013-14, y el virus se propagó posteriormente a otros países del continente de Oceanía (V.-M. Cao-Lormeau, D. Musso, Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet*. 384, 1571–1572 (2014); D. Musso, E. J. Nilles, V.-M. Cao-Lormeau, Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O595–6 (2014)). Después de su introducción en Brasil en 2015, el ZIKV se ha propagado rápidamente y, en febrero de 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo declaró una emergencia de salud pública de interés internacional (L. R. Baden, L. R. Petersen, D. J. Jamieson, A. M. Powers, M. A. Honein, Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* 374, 1552–1563 (2016); A. S. Fauci, D. M. Morens, Zika Virus in the Americas - Yet Another Arbovirus Threat. *N Engl J Med*, 160113142101009

(2016); D. L. Heymann *et al.*, Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? *Lancet*. 387, 719–721 (2016)). La vía principal de la infección por ZIKV es a través de las picaduras de los mosquitos *Aedes*, pero el virus también puede transmitirse por vía sexual (D. Musso *et al.*, Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis*. 21, 359–361 (2015)) y vertical (J. Mlakar *et al.*, Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med*. 374, 951–958 (2016)). Si bien la mayoría de las infecciones por ZIKV son asintomáticas o causan sólo síntomas leves, existe evidencia de que la infección por ZIKV puede conducir a complicaciones neurológicas, como el síndrome de Guillain-Barré en adultos (V.-M. Cao-Lormeau *et al.*, Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. 0 (2016), doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6) y defectos congénitos de nacimiento, incluyendo la microcefalia en el feto en desarrollo G. Calvet, R. S. Aguiar, A. Melo, S. A. Sampaio, Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* (2016), doi:10.1016/s1473-3099(16)00095-5; J. Mlakar *et al.*, Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med*. 374, 951–958 (2016); E. J. Rubin, M. F. Greene, L. R. Baden, Zika Virus and Microcephaly. *N Engl J Med* (2016), doi:10.1056/NEJMe1601862), probablemente por su capacidad para infectar las células progenitoras neurales humanas (H. Tang *et al.*, Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Stem Cell*, 1–5 (2016)).

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

Mientras que las proteínas envolventes (E) del flavivirus median la fusión y son el objetivo principal de los anticuerpos neutralizantes, la proteína no estructural 1 (NS1) es secretada por las células infectadas y participa en la evasión inmune y la patogénesis (D. A. Muller, P. R. Young, The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res*. 98, 192–208 (2013)). Dos estudios estructurales recientes mostraron un alto nivel de similitud estructural entre la proteína E del ZIKV y la de otros flavivirus, tal como el virus del dengue (“DENV”, por sus siglas en inglés), el virus de la fiebre amarilla (“YFV”, por sus siglas en inglés) y el virus del Nilo Occidental (“WNV”, por sus siglas en inglés), pero también revelaron características únicas que pueden estar relacionadas con el neurotropismo de ZIKV (L. Dai *et al.*, Structures

of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host Microbe* (2016), doi:10.1016/j.chom.2016.04.013; D. Sirohi *et al.*, The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, aaf5316 (2016)). De manera similar, el análisis estructural de la proteína NS1 de ZIKV ("ZIKV-NS1", por su nombre en inglés) reveló características conservadas con NS1 de otros flavivirus, aunque con diferentes características electrostáticas (J. Kim *et al.*, Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses, 1–6 (2016)).

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

Recientemente, se demostró que la mayoría de los anticuerpos que reaccionaban a la proteína envolvente del DENV también se unían a ZIKV, pero aquellos que reconocen el epítopo de bucle de fusión lineal principal ("FLE", por sus siglas en inglés) no neutralizaban el ZIKV y en su lugar promovían el aumento dependiente de anticuerpos ("ADE", por sus siglas en inglés) de la infección por ZIKV (Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A,

Barba-Spaeth G, Duangchinda T, Sakuntabhai A, Cao-Lormeau VM, Malasit P, Rey FA, Mongkolsapaya J, Screaton GR: La reactividad serológica cruzada con el virus del dengue impulsa la potenciación dependiente de anticuerpos de la infección con el virus del Zika. Nat Immunol. 2016 Jun 23. doi: 10.1038/ni.3515. [Publicación electrónica previa a impresión]).

Además, de acuerdo con la OMS, el reciente aumento en casos de microcefalia y otros trastornos neurológicos potencialmente asociados con la infección por el virus del Zika ha provocado un aumento en la demanda de pruebas de laboratorio para detectar la infección por el virus del Zika. En este contexto, se requiere una alta especificidad de los anticuerpos para distinguir la infección por ZIKV de la infección de otros flavivirus. Sin embargo, los anticuerpos anti-Zika conocidos suelen ser reactivos cruzados para otros flavivirus y, por lo tanto, no son útiles para distinguir la infección por ZIKV de la infección de otros flavivirus.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En vista de lo anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar nuevos anticuerpos, que se unen específicamente a epítopos de ZIKV. También es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos anti-ZIKV potencialmente neutralizantes. Dichos anticuerpos preferiblemente no contribuyen a la potenciación dependiente de anticuerpos (ADE) de la infección por el virus del Zika. También es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos anti-ZIKV altamente específicos útiles en el diagnóstico y ensayo de la infección por ZIKV y métodos de diagnóstico que usan dichos anticuerpos.

El objeto subyacente de la presente invención se resuelve mediante el objeto reivindicado.

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

A continuación, se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con modalidades específicas, sin embargo, se debe entender que se pueden combinar de cualquier manera y en cualquier número para crear modalidades adicionales. No se debe interpretar que los ejemplos descritos de diversas maneras y las modalidades preferidas limitan la presente invención sólo a las modalidades descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción respalda y abarca modalidades que combinan las modalidades explícitamente descritas con cualquier cantidad de elementos descritos y/o preferidos. Además, se debe considerar que todas las permutaciones y combinaciones de

todos los elementos descritos en esta solicitud se describen en la descripción de la presente aplicación, a menos que el contexto indique lo contrario.

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

Los términos “un” y “una”, así como “el” y “la”, y referencias similares utilizados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse como que abarcan tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente o el contexto lo contradiga claramente. La mención de los rangos de valores en la presente tiene por único fin servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del rango. A menos que se indique lo contrario en la presente, cada valor individual se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionaran individualmente en la presente. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

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

El término “aproximadamente” en relación con un valor numérico x significa x ± 10%.

De la manera que se usa en la presente, el término “enfermedad” pretende ser generalmente sinónimo, y se usa de manera intercambiable con los términos “trastorno” y “condición ” (tal como en la condición médica), en el sentido de que todos reflejan una condición anormal del cuerpo humano o animal o de una de sus partes que dificulta el funcionamiento normal, se manifiesta típicamente al distinguir signos y síntomas, y causa que el ser humano o el animal tengan una duración o calidad de vida reducida.

De la manera que se usa en la presente, la referencia al “tratamiento” de un sujeto o paciente pretende incluir la prevención, la profilaxis, la atenuación, la mejora y la terapia. Los términos “sujeto” o “paciente” se usan de manera intercambiable en la presente para referirse a todos los mamíferos, incluyendo los seres humanos. Los ejemplos de sujetos incluyen seres

humanos, vacas, perros, gatos, caballos, cabras, ovejas, cerdos y conejos. En una modalidad, el paciente es un ser humano.

De la manera que se usan en la presente, los términos “fragmento de unión a antígeno”, “fragmento” y “fragmento de anticuerpo” se usan indistintamente para referirse a cualquier fragmento de un anticuerpo de la invención que retiene la actividad de unión a antígeno del anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo monocatenario, un fragmento de unión a antígeno (“Fab”, por sus siglas en inglés), Fab’, F(ab’)2, un fragmento variable (Fv) o un fragmento Fv monocatenario (“scFv”, por sus siglas en inglés). Además, de la manera que se usa en la presente, el término “anticuerpo” incluye tanto anticuerpos como fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

De la manera que se usa en la presente, el término “anticuerpo” abarca varias formas de anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos, en particular fragmentos de unión a antígeno, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos recombinantes y anticuerpos modificados genéticamente (variante o anticuerpos mutantes) siempre que se conserven las propiedades características de acuerdo con la invención. Se prefieren los anticuerpos humanos y los anticuerpos monoclonales, y se prefieren especialmente los anticuerpos monoclonales humanos, en particular como anticuerpos monoclonales humanos recombinantes.

Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M. A., & van de Winkel, J. G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Los anticuerpos humanos también pueden producirse en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., *Nature* 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., *Year Immunol.* 7 (1993) 3340). Los anticuerpos humanos también pueden producirse en bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom, H. R., & Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388; Marks, J. D., et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); y Boerner, P., et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales humanos se preparan utilizando una inmortalización mejorada de células B con el virus de Epstein-Barr (“EBV”, por sus siglas en inglés), tal como se describe en Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. (2004): An efficient method to make

human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. Nat. Med. 10(8):871-5. De la manera que se usa en la presente, el término “anticuerpo humano” también comprende tales anticuerpos que se modifican, por ejemplo, en la región variable, para generar las propiedades de acuerdo con la invención tal como se describe en la presente. De la manera que se usa en la presente, el término “región variable” (región variable de una cadena ligera (“V_L”, por sus siglas en inglés), región variable de una cadena pesada (“V_H”, por sus siglas en inglés)) denota cada uno de los pares de cadenas ligeras y pesadas que participan directamente en la unión del anticuerpo al antígeno.

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

Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo purificado, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab, Fab’, F(ab’)2, Fv o scFv.

Los anticuerpos de la invención pueden ser, por lo tanto, preferiblemente anticuerpos humanos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos recombinantes o anticuerpos purificados. La invención también proporciona fragmentos de los anticuerpos de la invención, particularmente fragmentos que retienen la actividad de unión a antígeno de los anticuerpos. Tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monocatenarios, Fab, Fab’, F(ab’)2, Fv o scFv. Aunque la especificación, incluyendo las reivindicaciones, puede, en algunas partes, referirse explícitamente a los fragmentos de unión a antígeno, los fragmentos de anticuerpos, las variantes y los derivados de los anticuerpos, se entiende que el término “anticuerpo” o “anticuerpo de la invención” incluye todas las categorías de anticuerpos, específicamente, fragmento(s) de unión a antígeno, fragmento(s) de anticuerpos, variante(s) y derivado(s) de anticuerpos.

Los fragmentos de los anticuerpos de la invención se pueden obtener a partir de los anticuerpos mediante métodos que incluyen la digestión con enzimas, tales como pepsina o papaína, y/o mediante la escisión de enlaces disulfuro por reducción química. Alternativamente, los fragmentos de los anticuerpos pueden obtenerse mediante la clonación y expresión de parte de las secuencias de las cadenas pesadas o ligeras. Los "fragmentos" de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab’, $F(ab')_2$ y Fv. La invención también abarca fragmentos Fv monocatenarios (scFv) derivados de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, la invención incluye un scFv que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (“CDRs”, por sus siglas en inglés) de un anticuerpo de la invención. También se incluyen los monómeros y dímeros de cadena pesada o ligera, los anticuerpos de cadena pesada de dominio único, los anticuerpos de cadena ligera

de dominio único, así como los anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, Fv monocatenario en el que los dominios variables de cadena ligera y pesada están unidos por un enlazador peptídico.

Los fragmentos de anticuerpos de la invención pueden impartir interacciones monovalentes o multivalentes y estar contenidos en diversas estructuras, tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, las moléculas scFv se pueden sintetizar para crear un "triacuerpo" trivalente o un "tetracuerpo" tetravalente. Las moléculas scFv pueden incluir un dominio de la región Fc que da como resultado minicuerpos bivalentes. Además, las secuencias de la invención pueden ser un componente de moléculas multiespecíficas en las que las secuencias de la invención se dirigen a los epítopos de la invención y otras regiones de la molécula se unen a otros objetivos. Las moléculas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, Fab2 biespecífico, Fab3 triespecífico, scFv biespecífico y diacuerpos (Holliger & Hudson, 2005, *Nature Biotechnology* 9: 1126-1136).

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

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

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

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

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

De la manera que se usa en la presente, el término “vacuna” se entiende típicamente como un material profiláctico o terapéutico que proporciona al menos un antígeno, preferiblemente un inmunógeno. El antígeno o inmunógeno puede derivarse de cualquier material que sea adecuado para la vacunación. Por ejemplo, el antígeno o inmunógeno puede derivarse de un patógeno, tal como de bacterias o partículas de virus, etc., o de un tumor o tejido canceroso. El antígeno o inmunógeno estimula el sistema inmune adaptativo del cuerpo para proporcionar una respuesta inmune adaptativa. En particular, un “antígeno” o un “inmunógeno” se refiere típicamente a una sustancia que puede ser reconocida por el sistema inmune, preferiblemente por el sistema inmune adaptativo, y que es capaz de desencadenar una respuesta inmune específica de antígeno, por ejemplo, mediante la formación de anticuerpos y/o células T específicas de antígeno como parte de una respuesta inmune adaptativa. Típicamente, un antígeno puede ser o puede comprender un péptido o proteína que puede ser presentado por el complejo mayor de histocompatibilidad (“MHC”, por sus siglas en inglés) a las células T.

De la manera que se usa en la presente, el término “variante de secuencia” (también denominada “variante”) se refiere a cualquier alteración en una secuencia de referencia, por lo que una secuencia de referencia es cualquiera de las secuencias enumeradas en las “Tablas de secuencias y números de identificación de secuencias” (listado de secuencias), es decir, SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 407. Por lo tanto, el término “variante de secuencia” incluye variantes de secuencia de nucleótidos y variantes de secuencia de aminoácidos. Cabe destacar que las variantes de secuencia a las que se hace referencia en la presente son en particular variantes de secuencia funcional, es decir, variantes de secuencia que mantienen la función biológica de, por ejemplo, el anticuerpo. En el contexto de la presente invención, dicha función biológica mantenida es preferiblemente la neutralización de la infección por ZIKV, la unión del anticuerpo a la proteína E de ZIKV y/o la unión del anticuerpo a la proteína NS1 de ZIKV. Las variantes de secuencia preferidas son, por lo tanto, variantes de secuencia funcional que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con una secuencia de referencia. De la manera que se usa en la presente, la frase *“variante de secuencia funcional de la(s) misma(s) que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia”* significa que (i) la variante de secuencia es funcional tal como se describe aquí y (ii) cuanto mayor sea el % de identidad de secuencia, más preferible es la variante de secuencia. En otras palabras, la frase “variante de secuencia

funcional de la(s) misma(s) que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia", significa en particular que la variante de secuencia funcional tiene al menos 70% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 75% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 80% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 85% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 88% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente al menos 90% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente al menos 92% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia, aún más preferiblemente al menos 96% de identidad de secuencia, de manera particularmente preferible al menos 97% de identidad de secuencia, de manera particularmente preferible al menos 98% de identidad de secuencia y lo más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia respectiva.

El término "variante de secuencia" incluye en particular variantes que comprenden mutaciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia de referencia. Las variantes ejemplares de una secuencia de resto Fc incluyen, pero no se limitan a, aquellas que tienen una sustitución de L a A en la posición de la región constante de la cadena pesada 2 ("CH2", por sus siglas en inglés) 4, CH2 5, o ambas.

La identidad de secuencia generalmente se calcula con respecto a la longitud completa de la secuencia de referencia (es decir, la secuencia indicada en la solicitud). El porcentaje de identidad, tal como se menciona en la presente, se puede determinar, por ejemplo, usando la herramienta básica de búsqueda de alineación local ("BLAST", por sus siglas en inglés) usando los parámetros predeterminados especificados por el Centro Nacional de Información Biotecnológica ("NCBI", por sus siglas en inglés; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) [matriz BLOSUM 62; penalización de apertura de hueco = 11 y penalización de extensión de hueco = 1].

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

secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% idéntica en secuencia a la secuencia de referencia.

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

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

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

Es importante destacar que las alteraciones en las variantes de secuencia no anulan la funcionalidad de la secuencia de referencia respectiva, en el presente caso, por ejemplo, la funcionalidad de una secuencia de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para unirse al mismo epítopo y/o para neutralizar suficientemente la infección de ZIKV. Se puede, encontrar orientaciones para determinar qué nucleótidos y residuos de aminoácidos, respectivamente, pueden ser sustituidos, insertados o eliminados sin eliminar dicha funcionalidad mediante el uso de programas informáticos bien conocidos en la técnica.

De la manera que se usa en la presente, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos “derivada de” un ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína designado se refiere al origen del ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos que se deriva de una secuencia particular tiene una secuencia de aminoácidos que es esencialmente idéntica a esa secuencia o una porción de la misma, de la cual se deriva, por lo que “esencialmente idénticas” incluye variantes de secuencia tal como se define anteriormente. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos que se deriva de un péptido o proteína particular, se deriva del dominio correspondiente en el péptido o proteína particular. Por lo tanto, “correspondiente” se refiere en particular a la misma funcionalidad. Por ejemplo, un “dominio extracelular” corresponde a otro “dominio extracelular” (de otra proteína), o un “dominio transmembrana” corresponde a otro “dominio transmembrana” (de otra proteína). Las partes “correspondientes” de péptidos, proteínas y ácidos nucleicos son, por lo tanto, fácilmente identificables para un experto en la técnica. Del mismo modo, las secuencias “derivadas de” otra secuencia suelen ser fácilmente identificables para un experto en la técnica por tener su origen en la secuencia.

Preferiblemente, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos derivada de otro ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína puede ser idéntica al ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína de partida (del cual se deriva). Sin embargo, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos derivada de otro ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína también puede tener una o más mutaciones con respecto al ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína de partida (del cual se deriva), en particular, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos derivada de otro ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína puede ser una variante de secuencia funcional, tal como se describió anteriormente, del ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína de partida (del cual se deriva). Por ejemplo, en un péptido/proteína, uno o más residuos de aminoácidos pueden sustituirse con otros residuos de aminoácidos o pueden ocurrir una o más inserciones o deleciones de residuos de aminoácidos.

De la manera que se usa en la presente, el término “mutación” se refiere a un cambio en la secuencia de ácido nucleico y/o en la secuencia de aminoácidos en comparación con una secuencia de referencia, por ejemplo, una secuencia genómica correspondiente. Una mutación, por ejemplo, en comparación con una secuencia genómica, puede ser, por ejemplo, una mutación somática (de origen natural), una mutación espontánea, una mutación inducida, por ejemplo, inducida por enzimas, sustancias químicas o radiación, o una mutación obtenida por mutagénesis dirigida (métodos de biología molecular para realizar cambios específicos e intencionales en la secuencia de ácido nucleico y/o en la secuencia de aminoácidos). Por lo tanto, los términos “mutación” o “mutar” deben entenderse que también incluyen hacer una

mutación física, por ejemplo, en una secuencia de ácido nucleico o en una secuencia de aminoácidos. Una mutación incluye la sustitución, deleción e inserción de uno o más nucleótidos o aminoácidos, así como la inversión de varios nucleótidos o aminoácidos sucesivos. Para lograr una mutación en una secuencia de aminoácidos, preferiblemente se puede introducir una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos para expresar un polipéptido mutado (recombinante). Se puede lograr una mutación, por ejemplo, al alterar, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio, un codón de una molécula de ácido nucleico que codifica un aminoácido para dar como resultado un codón que codifica un aminoácido diferente, o al sintetizar una variante de secuencia, por ejemplo, al conocer la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido y diseñar la síntesis de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante del polipéptido sin la necesidad de mutar uno o más nucleótidos de una molécula de ácido nucleico.

Varios documentos se citan a lo largo del texto de esta memoria descriptiva. Cada uno de los documentos citados en la presente (incluyendo todas las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.), ya sea mencionadas anteriormente o a continuación, se incorporan en su totalidad en la presente a modo de referencia. Nada en la presente debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a anteceder tal descripción en virtud de la invención anterior.

Debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente memoria, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente tiene el propósito de describir solamente modalidades particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica.

<u>Anticuerpos que neutralizan potentemente la infección por el virus del Zika</u>

La presente invención se basa, entre otros hallazgos, en el descubrimiento y aislamiento de anticuerpos que se unen específicamente a los epítopos del virus del Zika. Dichos anticuerpos son (i) altamente potentes para neutralizar el virus del Zika, si se dirigen a un sitio antigénico de la proteína envolvente (E) del virus del Zika o a un epítopo cuaternario del ZIKV, o (ii) son útiles en el diagnóstico de la infección por el virus del Zika, si se dirigen a la proteína NS1 del virus del Zika. Dichos anticuerpos son deseables, ya que sólo se requieren pequeñas cantidades de los anticuerpos para neutralizar el virus del Zika. En particular, actualmente no hay ninguna prevención/tratamiento disponible para la infección por el virus del Zika. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son altamente efectivos tanto en la prevención como en el tratamiento o atenuación de la infección por el virus del Zika.

Además, debido a la especificidad de los anticuerpos para el virus del Zika, no provocan ADE, sino que bloquean la ADE. En el diagnóstico, los anticuerpos específicos del Zika proporcionan una herramienta importante para distinguir la infección por el virus del Zika de la infección por otros flavivirus, tal como el virus del dengue.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, caracterizado porque se une específicamente a un epítopo del virus del Zika y neutraliza la infección del virus del Zika. En otras palabras, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, reduce la infectividad viral del virus del Zika.

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

En una modalidad preferida de un ensayo de neutralización de ZIKV, las células cultivadas, por ejemplo las células Vero, se incuban con una cantidad fija de ZIKV en presencia o ausencia del anticuerpo a analizar, por ejemplo, durante aproximadamente cuatro días. Después de la incubación, las células se pueden lavar y cultivar adicionalmente. Para medir la infectividad del virus, se puede usar citometría de flujo. Para este fin, las células se pueden fijar, por ejemplo, con 2% de formaldehído, permeabilizar, por ejemplo, en solución salina amortiguada con fosfato (“PBS”, por sus siglas en inglés), suero de ternera fetal (“FCS”, por sus siglas en inglés) al 1%, saponina al 0,5%, y teñir, por ejemplo, con anticuerpo de ratón 4G2. A continuación, las células pueden incubarse con una IgG anti-ratón de cabra conjugada con un colorante, tal como Alexa Fluor488 y analizarse mediante citometría de flujo.

Alternativamente, las células viables pueden detectarse por citometría de flujo utilizando, por ejemplo, el reactivo WST-1 (Roche). Una cepa de ZIKV preferida para usarse en dicho ensayo de neutralización es ZIKV H/PF/2013.

El anticuerpo y el fragmento de unión a antígeno de la invención tienen una alta potencia neutralizante. La concentración del anticuerpo requerida para una neutralización del 50% del virus Zika (concentración inhibitoria media, CI_{50}) en comparación con los controles sin anticuerpos, es, por ejemplo, de hasta aproximadamente 3 µg/ml o hasta aproximadamente 1 µg/ml. Preferiblemente, la concentración del anticuerpo de la invención requerida para una neutralización del 50% de ZIKV (CI_{50}) es de hasta aproximadamente 500 ng/ml, más preferiblemente la concentración del anticuerpo de la invención requerida para una neutralización del 50% de ZIKV (CI_{50}) es de hasta aproximadamente 250 ng/ml, incluso más preferiblemente la concentración del anticuerpo de la invención requerido para una neutralización del 50% de ZIKV (CI_{50}) es de hasta aproximadamente 150 ng/ml. Lo más preferiblemente, la concentración del anticuerpo de la invención requerida para una neutralización del 50% de ZIKV (CI_{50}) es de aproximadamente 100 ng/ml o menos, por ejemplo. aproximadamente 90 ng/ml o menos, aproximadamente 80 ng/ml o menos, aproximadamente 70 ng/ml o menos, aproximadamente 60 ng/ml o menos, aproximadamente 50 ng/ml o menos, aproximadamente 45 ng/ml o menos, aproximadamente 40 ng/ml o menos, aproximadamente 35 ng/ml o menos, aproximadamente 30 ng/ml o menos, aproximadamente 25 ng/ml o menos, aproximadamente 20 ng/ml o menos o, de manera particularmente preferible, aproximadamente 15 ng/ml o menos. En particular, la concentración del anticuerpo de la invención requerida para una neutralización del 50% de ZIKV (CI_{50}) es preferiblemente de aproximadamente 50 ng/ml o menos. Esto significa que sólo se requieren bajas concentraciones del anticuerpo para una neutralización del 50% de ZIKV. La concentración del anticuerpo de la invención requerida para una neutralización del 50% de ZIKV (CI_{50}) puede medirse usando ensayos de neutralización estándar, como sabe un experto en la técnica o, en particular, como se describe anteriormente.

En general, la unión de un anticuerpo se puede evaluar mediante el uso de un ensayo ELISA estándar (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), que es bien conocido por los expertos. Un ensayo ELISA estándar ejemplar se puede realizar de la siguiente manera: Las placas ELISA se pueden recubrir (por ejemplo, durante la noche a 4°C) con una cantidad suficiente (por ejemplo, 1 µg/ml) de la proteína/complejo/partícula a la que la unión del anticuerpo se analizará (por ejemplo, para la unión a DENV como se describe a continuación, se utilizan las proteínas E de DENV y/o las partículas similares a virus”(“VLP”, por sus siglas en inglés) de DENV), por ejemplo, en PBS. Las placas se pueden bloquear, por ejemplo, con una solución al 1% p/v de albúmina de suero bovino (“BSA”, por sus siglas en inglés) en PBS, y se incuban con el anticuerpo a analizar (por ejemplo, durante aproximadamente 1,5 horas a

temperatura ambiente). Después del lavado, la unión del anticuerpo puede ser revelada, por ejemplo, utilizando IgG anti-humana de cabra acoplada a fosfatasa alcalina. A continuación, las placas se pueden lavar, se puede añadir el sustrato requerido (por ejemplo, fosfato de p-nitrofenilo ("p-NPP", por sus siglas en inglés)) y las placas se pueden leer, por ejemplo, a 405 nm. Las afinidades relativas de la unión del anticuerpo pueden determinarse midiendo la concentración de anticuerpo monoclonal ("mAb", por sus siglas en inglés) (concentración efectiva del 50%, CE_{50}) requerida para lograr una unión máxima del 50% en la saturación. Los valores de CE_{50} pueden calcularse mediante la interpolación de curvas de unión equipadas con una regresión no lineal de cuatro parámetros con una pendiente variable.

Preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención no se une esencialmente a las partículas similares al virus del dengue y/o a la proteína envolvente del dengue. Más preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, no se une esencialmente a partículas similares al virus del dengue y/o a la proteína envolvente del dengue de cualquiera de los cuatro serotipos DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4. Por lo tanto, "esencialmente no vinculante" significa que para el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, ningún valor de CE_{50} de hasta 10^2 ng/ml, preferiblemente hasta 10^3 ng/ml, más preferiblemente hasta $5*10^3$ ng/ml, incluso más preferiblemente hasta $8*10^3$ ng/ml, y lo más preferiblemente hasta 10^4 ng/ml puede determinarse en un ensayo ELISA estándar para partículas similares al virus del dengue (VLP de DENV) y/o la proteína envolvente del dengue (proteína E de DENV). En otras palabras, la concentración del anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, requerida para lograr una unión máxima del 50% en la saturación (CE_{50}) a partículas similares al virus del dengue (VLP de DENV) y/o a la proteína envolvente del dengue (proteína E de DENV) en un ensayo ELISA estándar es típicamente más de 10^2ng/ml, preferiblemente más de 10^3 ng/ml, más preferiblemente más de $5*10^3$ ng/ml, incluso más preferiblemente más de $8*10^3$ ng/ml, y lo más preferiblemente más 10^4 ng/ml.

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

La ADE puede evaluarse mediante un ensayo basado en citometría de flujo utilizando, por ejemplo, células cultivadas o líneas celulares, tales como células K562. Por ejemplo, los anticuerpos a analizar y el ZIKV pueden mezclarse durante 1 hora a 37°C y añadirse a 5000 células K562/pocillo. Después de cuatro días, las células pueden fijarse, permeabilizarse y teñirse con m4G2, por ejemplo, tal como se describe anteriormente para los ensayos de

neutralización. El número de células infectadas se determinó mediante citometría de flujo, tal como se describe anteriormente para los ensayos de neutralización.

Preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo humano. También se prefiere que el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, sea un anticuerpo monoclonal, preferiblemente un anticuerpo monoclonal humano. Además, también se prefiere que el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, sea un anticuerpo recombinante.

Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un resto Fc. Más preferiblemente, el resto Fc se deriva de origen humano, por ejemplo, de IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4 humana, por lo que se prefiere particularmente la IgG1 humana.

De la manera que se usa en la presente, el término “resto Fc” se refiere a una secuencia derivada de la porción de una cadena pesada de inmunoglobulina que comienza en la región bisagra justo antes del sitio de escisión de papaína (por ejemplo, el residuo 216 en IgG nativa, suponiendo que el primer residuo de la región constante de la cadena pesada será 114) y finaliza en el extremo C-terminal de la cadena pesada de inmunoglobulina. Por consiguiente, un resto Fc puede ser un resto Fc completo o una porción (por ejemplo, un dominio) del mismo. Un resto Fc completo comprende al menos un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 (por ejemplo, las posiciones de aminoácidos de la UE 216-446). Un residuo de lisina (K) adicional a veces está presente en el extremo C-terminal del resto Fc, pero a menudo se escinde de un anticuerpo maduro. Cada una de las posiciones de aminoácidos dentro de un resto Fc se han numerado de acuerdo con el sistema de numeración de la UE de Kabat reconocido en la técnica, véase, por ejemplo, Kabat et al., en “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, 1983 y 1987.

Preferiblemente, en el contexto de la presente invención, un resto Fc comprende al menos uno de: un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3 o una variante, porción o fragmento de los mismos. En modalidades preferidas, un resto Fc comprende al menos un dominio bisagra, un dominio CH2 o un dominio CH3. Más preferiblemente, el resto Fc es un resto Fc completo. El resto Fc también puede comprender una o más inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos con respecto a un resto Fc de origen natural. Por ejemplo, al menos uno de un dominio bisagra, dominio CH2 o dominio CH3 (o porción de los mismos) puede eliminarse. Por ejemplo, un resto Fc puede comprender o consistir en: (i) dominio bisagra (o porción del mismo) fusionado a un dominio CH2 (o porción del mismo), (ii) un dominio bisagra (o porción del mismo) fusionado a un dominio CH3 (o porción del mismo), (iii) un dominio CH2 (o porción

del mismo) fusionado a un dominio CH3 (o porción del mismo), (iv) un dominio bisagra (o porción del mismo), (v) un dominio CH2 (o porción del mismo), o (vi) un dominio CH3 o porción del mismo.

Un experto en la técnica entenderá que el resto Fc puede modificarse de modo que varíe en la secuencia de aminoácidos del resto Fc completo de una molécula de inmunoglobulina de origen natural, al tiempo que conserva al menos una función deseable conferida por el resto Fc de origen natural. Dichas funciones incluyen la unión al receptor de Fc (FcR), la modulación de la vida media del anticuerpo, la función de itotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos ("ADCC", por sus siglas en inglés), la unión a la proteína A, la unión a la proteína G y la unión al complemento. Los expertos en la técnica conocen bien las porciones de restos Fc de origen natural, que son responsables y/o esenciales para tales funciones.

Por ejemplo, para activar la cascada de complemento, C1q se une a al menos dos moléculas de IgG1 o una molécula de IgM, unida al objetivo antigénico (Ward, E. S., & Ghetie, V., *Ther. Immunol.* 2 (1995) 77-94). Burton, D. R., describió (*Mol. Immunol.* 22 (1985) 161-206) que la región de la cadena pesada que comprende los residuos de aminoácidos 318 a 337 está implicada en la fijación del complemento. Duncan, A. R., & Winter, G. (Nature 332 (1988) 738-740), utilizando mutagénesis dirigida, informaron que Glu318, Lys320 y Lys322 forman el sitio de unión a C1q. El papel de los residuos Glu318, Lys320 y Lys 322 en la unión de C1q se confirmó mediante la capacidad de un péptido sintético corto que contiene estos residuos para inhibir la lisis mediada por el complemento.

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

La reticulación de receptores mediante el dominio Fc de los anticuerpos IgG nativos (FcγR) desencadena una amplia variedad de funciones efectoras, tales como la fagocitosis, la

citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la liberación de mediadores inflamatorios, así como la depuración de complejos inmunes y la regulación de la producción de anticuerpos. Por lo tanto, se prefieren los restos Fc que proporcionan reticulación de receptores (FcγR). En humanos, se han caracterizado tres clases de FcγR, que son: (i) FcγRI (CD64), que se une a la IgG monomérica con alta afinidad y se expresa en macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos; (ii) FcγRII (CD32), que se une a la IgG complejada con afinidad media a baja, se expresa ampliamente, en particular en leucocitos, se sabe que es un elemento central en la inmunidad mediada por anticuerpos, y que se puede dividir en FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIC, que realizan diferentes funciones en el sistema inmune, pero se unen con una afinidad baja similar a la IgG-Fc, y los ectodominios de estos receptores son altamente homólogos; y (iii) FcγRIII (CD16), que se une a la IgG con afinidad media a baja y existe como dos tipos: FcγRIIIA se encuentra en las células citolíticas (“NK”, por sus siglas en inglés), macrófagos, eosinófilos y algunos monocitos y células T, y media ADCC y FcγRIIIB, y que se expresa altamente en los neutrófilos. FcγRIIA se encuentra en muchas células involucradas en la eliminación (por ejemplo, macrófagos, monocitos, neutrófilos) y parece ser capaz de activar el proceso de eliminación. FcγRIIB parece desempeñar un papel en los procesos inhibitorios y se encuentra en las células B, macrófagos, mastocitos y eosinófilos. Es importante destacar que el 75% de todos los FcγRIIB se encuentran en el hígado (Ganesan, L. P. et al., 2012: FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. Journal of Immunology 189: 4981-4988). El FcγRIIB se expresa abundantemente en el endotelio sinusoidal del hígado, denominado “LSEC”, por sus siglas en inglés, y en las células de Kupffer en el hígado, y el LSEC es el sitio principal de la depuración de los complejos inmunes pequeños (Ganesan, L. P. et al., 2012: FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. Journal of Immunology 189: 4981-4988).

Por consiguiente, en la presente invención se prefieren los anticuerpos, y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que pueden unirse a FcγRIIb, por ejemplo, anticuerpos que comprenden un resto Fc para unirse a FcγRIIb, en particular una región Fc, tal como, por ejemplo, anticuerpos de tipo IgG. Además, es posible diseñar el resto Fc para mejorar la unión de FcγRIIB mediante la introducción de las mutaciones S267E y L328F, tal como se describe en Chu, S. Y. et al., 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcgammaRIIb with Fc-engineered antibodies. Molecular Immunology 45, 3926–3933. Por lo tanto, la eliminación de los complejos inmunes se puede potenciar (Chu, S., et al., 2014: La eliminación acelerada de IgE en chimpancés está mediada por Xmab7195, un anticuerpo modificado mediante Fc con afinidad mejorada para el receptor inhibitorio FcγRIIb. Am J Respir Crit, American Thoracic Society International Conference Abstracts). Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, se prefieren los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que

comprenden un resto Fc modificado con las mutaciones S267E y L328F, en particular, según se describe en Chu, S.Y. et al., 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcgammaRIIb with Fc-engineered antibodies. Molecular Immunology 45, 3926–3933.

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

Con respecto a la unión de FcγRI, la modificación en la IgG nativa de al menos uno de E233-G236, P238, D265, N297, A327 y P329 reduce la unión a FcγRI. Los residuos de IgG2 en las posiciones 233-236, sustituidos en IgG1 e IgG4, reducen la unión a FcγRI 10^3 veces y eliminan la respuesta de monocitos humanos a los glóbulos rojos sensibilizados con anticuerpos (Armor, K. L., et al. *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613-2624). Con respecto a la unión de FcγRII, se encuentra una unión reducida para FcγRIIA, por ejemplo, para la mutación de IgG de al menos uno de E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 y K414. Con respecto a la unión de FcγRIII, se encuentra una unión reducida a FcγRIIIA, por ejemplo, para la mutación de al menos uno de E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 y D376. El mapeo de los sitios de unión en la IgG1 humana para los receptores de Fc, los sitios de mutación mencionados anteriormente y los métodos para medir la unión a FcγRI y FcγRIIA se describen en Shields, R. L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604.

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

Por ejemplo, el resto Fc puede comprender o consistir en al menos la porción de un resto Fc que se sabe en la técnica que se requiere para la unión a FcRn o la vida media prolongada. Alternativa o adicionalmente, el resto Fc del anticuerpo de la invención comprende al menos la porción conocida en la técnica que se requiere para la unión a la proteína A y/o el resto Fc del anticuerpo de la invención comprende al menos la porción de una molécula Fc conocida en la técnica que se requiere para la unión a la proteína G.

Preferiblemente, la función retenida es la neutralización de la infección por el virus del Zika, que se supone que está mediada por la unión de FcγR. Por consiguiente, un resto Fc preferido comprende al menos la porción conocida en la técnica que se requiere para la unión de FcγR. Como se describió anteriormente, un resto Fc preferido puede, por lo tanto, comprender (i) el sitio de bisagra inferior del Fc nativo de IgG, en particular los residuos de aminoácidos L, L, G, G (234-237, numeración de la UE), y (ii) la región adyacente del dominio CH2 del Fc de la IgG nativa, en particular un bucle y cadenas en el dominio CH2 superior adyacente a la región bisagra inferior, por ejemplo, en una región de P331, por ejemplo, una región de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos consecutivos en el dominio CH2 superior del Fc de la IgG nativa alrededor de P331, por ejemplo, entre los aminoácidos 320 y 340 (numeración de la UE) del Fc de la IgG nativa.

Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende una región Fc. De la manera que se usa en la presente, el término “región Fc” se refiere a la porción de una inmunoglobulina formada por dos o más restos Fc de cadenas pesadas de anticuerpos. Por ejemplo, la región Fc puede ser una región Fc monomérica o “monocatenaria” (es decir, una región “scFc”, por su siglas en inglés). Las regiones Fc monocatenarias están compuestas por restos Fc unidos dentro de una única cadena polipeptídica (por ejemplo, codificada en una única secuencia de ácido nucleico contigua). Las regiones scFc ejemplares se describen en WO 2008/143954 A2. Preferiblemente, la región Fc es una región Fc dimérica. Una “región Fc dimérica” o “dcFc”, por sus siglas en inglés, se refiere al dímero formado por los restos Fc de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina separadas. La región Fc dimérica puede ser un homodímero de dos restos Fc idénticos (por ejemplo, una región Fc de una inmunoglobulina de origen natural) o un heterodímero de dos restos Fc no idénticos.

Los restos Fc de la región Fc pueden ser de la misma o diferente clase y/o subclase. Por ejemplo, los restos Fc pueden derivarse de una inmunoglobulina (por ejemplo, una inmunoglobulina humana) de una subclase de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Preferiblemente, los restos Fc de la región Fc son de la misma clase y subclase. Sin embargo, la región Fc (o uno o más restos Fc de una región Fc) también puede ser quimérica, por lo que una región Fc quimérica puede comprender restos Fc derivados de diferentes clases y/o subclases de inmunoglobulina. Por ejemplo, al menos dos de los restos Fc de una región Fc dimérica o monocatenaria pueden ser de diferentes clases y/o subclases de inmunoglobulina. Adicional o alternativamente, las regiones Fc quiméricas pueden comprender uno o más restos Fc quiméricos. Por ejemplo, la región o resto Fc quimérico puede comprender una o más porciones derivadas de una inmunoglobulina de una primera subclase (por ejemplo, una subclase IgG1, IgG2 o IgG3), mientras que el resto de la región o resto Fc es de una subclase diferente. Por ejemplo, una región Fc o un resto de un polipéptido Fc puede comprender un

dominio CH2 y/o CH3 derivado de una inmunoglobulina de una primera subclase (por ejemplo, una subclase de IgG1, IgG2 o IgG4) y una región bisagra de una inmunoglobulina de una segunda subclase (por ejemplo, una subclase IgG3). Por ejemplo, la región o resto Fc puede comprender un dominio bisagra y/o CH2 derivado de una inmunoglobulina de una primera subclase (por ejemplo, una subclase IgG4) y un dominio CH3 de una inmunoglobulina de una segunda subclase (por ejemplo, una subclase IgG1, IgG2 o IgG3). Por ejemplo, la región Fc quimérica puede comprender un resto Fc (por ejemplo, un resto Fc completo) de una inmunoglobulina para una primera subclase (por ejemplo, una subclase IgG4) y un resto Fc de una inmunoglobulina de una segunda subclase (por ejemplo, una subclase IgG1, IgG2 o IgG3). Por ejemplo, la región o resto Fc puede comprender un dominio CH2 de una inmunoglobulina IgG4 y un dominio CH3 de una inmunoglobulina IgG1. Por ejemplo, la región o resto Fc puede comprender un dominio CH1 y un dominio CH2 de una molécula de IgG4 y un dominio CH3 de una molécula de IgG1. Por ejemplo, la región o resto Fc puede comprender una parte de un dominio CH2 de una subclase particular de anticuerpo, por ejemplo, las posiciones de la UE 292-340 de un dominio CH2. Por ejemplo, una región o resto Fc puede comprender aminoácidos en las posiciones 292-340 de CH2 derivadas de un resto IgG4 y el resto CH2 derivado de un resto IgG1 (alternativamente, 292-340 de CH2 pueden derivarse de un resto IgG1 y el resto CH2 puede derivarse de un resto IgG4).

Además, una región o resto Fc puede (adicionalmente o alternativamente), por ejemplo, comprender una región bisagra quimérica. Por ejemplo, la bisagra quimérica se puede derivar, por ejemplo, en parte, de una molécula IgG1, IgG2 o IgG4 (por ejemplo, una secuencia de bisagra media superior e inferior) y, en parte, de una molécula de IgG3 (por ejemplo, una secuencia de bisagra media). En otro ejemplo, una región o resto Fc puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4. En otro ejemplo, la bisagra quimérica puede comprender dominios de bisagra superior e inferior de una molécula de IgG4 y un dominio de bisagra central de una molécula de IgG1. Una bisagra quimérica de este tipo se puede producir, por ejemplo, al introducir una sustitución de prolina (Ser228Pro) en la posición 228 de la UE en el dominio bisagra medio de una región bisagra de IgG4. En otra modalidad, la bisagra quimérica puede comprender aminoácidos en las posiciones de la UE 233-236 de un anticuerpo IgG2 y/o la mutación Ser228Pro, en donde los aminoácidos restantes de la bisagra son de un anticuerpo IgG4 (por ejemplo, una bisagra quimérica de la secuencia ESKYGPPCPPCPAPPVAGP). Otras bisagras quiméricas que pueden usarse en el resto Fc del anticuerpo de acuerdo con la presente invención se describen en US 2005/0163783 A1.

En la presente invención, se prefiere que el resto Fc, o la región Fc, comprenda o consista en una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de inmunoglobulina humana (por ejemplo, de una región Fc o resto Fc de una molécula de IgG humana). Sin

embargo, los polipéptidos pueden comprender uno o más aminoácidos de otra especie de mamífero. Por ejemplo, se puede incluir un resto Fc de primate o un sitio de unión de primate en los polipéptidos en cuestión. Alternativamente, uno o más aminoácidos murinos pueden estar presentes en el resto Fc o en la región Fc.

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

Las secuencias particularmente preferidas de las regiones constantes son las secuencias de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NOs: 145-148 (secuencias de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NOs: 149-152). Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de IgG1 CH1-CH2-CH3 es de acuerdo con SEQ ID NO: 145 o una variante de secuencia funcional de la misma, como se describe en la presente. Incluso más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de IgG1 CH1-CH2-CH3 es de acuerdo con SEQ ID NO: 146, o una variante de secuencia funcional de la misma, tal como se describe en la presente, en donde se mantiene la mutación “LALA”.

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

Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que la potenciación dependiente de anticuerpos (ADE) de la infección por el virus del Zika se produce mediante la unión del resto Fc del anticuerpo, en particular, el resto Fc de la cadena pesada de una molécula de IgG, a un receptor Fc, por ejemplo, un receptor Fcγ en una célula huésped. Por lo tanto, se prefiere que el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprenda una o más mutaciones en el resto Fc. La mutación o mutaciones pueden ser cualquier mutación que reduzca la unión del anticuerpo a un receptor Fc (FcR), en particular reduce la unión del anticuerpo a un receptor Fcγ (FcγR). Por otra parte, se prefiere

que el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprenda un resto Fc (completo)/región Fc, en donde la interacción/unión con FcRn no está comprometida. Por consiguiente, se prefiere particularmente que el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprenda una o más mutaciones en el resto Fc, que (i) reduzca(n) la unión del anticuerpo a un receptor Fcγ, pero no comprometa(n) la interacción con FcRn. Un ejemplo de tal mutación es la mutación “LALA” que se describe a continuación.

En general, la unión del anticuerpo a un receptor Fc puede evaluarse mediante varios métodos conocidos por los expertos, tales como ELISA (Hessell AJ, Hangartner L, Hunter M, Havenith CEG, Beurskens FJ, Bakker JM, Lanigan CMS, Landucci G, Forthal DN, Parren PWHI, et al.: Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. Nature 2007, 449:101–104; Grevys A, Bern M, Foss S, Bratlie DB, Moen A, Gunnarsen KS, Aase A, Michaelsen TE, Sandlie I, Andersen JT: Fc Engineering of Human IgG1 for Altered Binding to the Neonatal Fc Receptor Affects Fc Effector Functions. 2015, 194:5497-5508) o citometría de flujo (Perez LG, Costa MR, Todd CA, Haynes BF, Montefiori DC: Utilization of immunoglobulin G Fc receptors by human immunodeficiency virus type 1: a specific role for antibodies against the membrane-proximal external region of gp41. J Virol 2009, 83: 7397–7410; Piccoli L, Campo I, Fregni CS, Rodríguez BMF, Minola A, Sallusto F, Luisetti M, Corti D, Lanzavecchia A: Neutralization and clearance of GM-CSF by autoantibodies in pulmonary alveolar proteinosis. Nat Commun 2015, 6:1–9).

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

Además, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede modificarse al introducir mutaciones aleatorias de aminoácidos en una región particular del dominio CH2 o CH3 de la cadena pesada para alterar su afinidad de unión por FcR y/o su vida media en suero en comparación con anticuerpos no modificados. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, sustituciones de al menos un aminoácido de la

región constante de la cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 250, 314 y 428.

De manera particularmente preferida, el resto Fc de un anticuerpo de la invención comprende una sustitución en las posiciones CH2 4, CH2 5, o ambas. En general, el aminoácido en las posiciones 4 y 5 de CH2 de las IgG1 e IgG3 de tipo silvestre es una leucina (“L”). Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende un aminoácido en la posición CH2 4, CH2 5, o ambas, que no es una L. Más preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende una alanina (“A”) en la posición CH2 4, o CH2 5, o ambas. Más preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende tanto una sustitución CH2 L4A como una sustitución CH2 L5A. Dichos anticuerpos se denominan en la presente como una variante de “LALA”. Curiosamente, tal mutación “LALA” en el resto Fc no sólo produce una falta de contribución del anticuerpo respectivo en la potenciación dependiente de anticuerpos (ADE) de la infección por el virus del Zika, sino que también bloquea la potenciación dependiente de anticuerpos (ADE) de la infección por el virus del Zika. Una secuencia de aminoácidos ejemplar de IgG1 CH1-CH2-CH3 que comprende la mutación “LALA” es de acuerdo con SEQ ID NO: 146. Por consiguiente, la secuencia de aminoácidos de IgG1 CH1-CH2-CH3 es preferiblemente de acuerdo con SEQ ID NO: 146, o una variante de secuencia funcional de la misma, tal como se describe en la presente, en donde se mantiene la mutación “LALA”.

Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une al dominio III de la proteína envolvente del virus del Zika (“EDIII”, por sus siglas en inglés, también denominado “DIII”). En otras palabras, se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se una a un epítopo de la proteína envolvente del virus del Zika, que incluye uno o más residuos de aminoácidos del dominio III de la proteína envolvente (EDIII) del virus del Zika. El ZIKV incluye un núcleo de nucleocápside, que comprende ARN monocatenario envuelto por proteínas del núcleo. El núcleo de nucleocápside está encapsulado por una membrana de bicapa lipídica con “proteínas de membrana” y “proteínas envolventes”. La proteína envolvente (proteína E) de ZIKV es el antígeno dominante. El ectodominio de la proteína envolvente comprende tres dominios distintos: El dominio I de la proteína E (“EDI”, por sus siglas en inglés), el dominio II de la proteína E (“EDII”, por sus siglas en inglés) y el dominio III de la proteína E (EDIII). El EDIII está altamente conservado entre diferentes cepas de ZIKV (véase la Figura 12 para una alineación de secuencias de aminoácidos de EDIII de diferentes cepas de ZIKV).

Por consiguiente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une más preferiblemente al dominio III de la proteína envolvente (EDIII) del virus del Zika, en donde el EDIII que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 401):

TAAFTFTKXPAEXXHGTVTVEXQYXGXDGPCKXPXQMAVDXQTLTPVGRLITANPVIT EXTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGXGXKKITHHWHRS

en donde X puede ser cualquier aminoácido (de origen natural). En otras palabras, se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se una a un epítopo de la proteína envolvente del virus del Zika, que incluye uno o más residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 401.

También se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se una al dominio III de la proteína envolvente (EDIII) del virus del Zika, en donde el EDIII tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 407):

$X_1GX_2X_3YSLCTAAFTFTKX_4PAEX_5X_6HGTVTVEX_7QYX_8GX_9DGPCKX_{10}PX_{11}QMAVDX_{12}QTLTPVGRLITANPVITEX_{13}TX_{14}NSKMMLELDPPFGDSYIVIGX_{15}GX_{16}\ X_{17}KITHHWHRSG$

en donde

X1 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente K, A o E;

X2 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente V, F o L;

X3 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente S o F;

X4 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente I o V;

X5 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente T o V;

X6 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente L o D;

X7 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente V o G;

X8 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente A o G;

X9 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), excepto R, preferiblemente T o A;

X10 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente V o I;

X11 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente A o V;

X12 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente M o T;

X13 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente S o G;

X14 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente E o K;

X15 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente V o I;

X16 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente E, A, K o D; y

X17 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente E, A o K, más preferiblemente K o A.

En otras palabras, se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se una a un epítopo de la proteína

envolvente del virus del Zika, que incluye uno o más residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 407.

Por ejemplo, el EDIII se extiende desde el aminoácido 309 hasta el aminoácido 403 de la proteína E de ZIKV de la cepa ZIKV H/PF/2013 (número de acceso de Genbank KJ776791). Por consiguiente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une lo más preferiblemente al dominio III de la proteína envolvente (EDIII) del virus del Zika, en donde el EDIII que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 402):

TAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKVPAQMAVDMQTLTPVGRLITANPVITE STENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHRS.

En otras palabras, se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se una a un epítopo de la proteína envolvente del virus del Zika, que incluye uno o más residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 402.

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que los anticuerpos que se unen al dominio III de la proteína envolvente(EDIII) del virus del Zika muestran (i) una mayor neutralización de ZIKV y (ii) una menor reactividad cruzada con DENV (en particular, esencialmente no hay ninguna reactividad cruzada con DENV) en comparación con los anticuerpos que se unen al dominio I/II de la proteína envolvente (EDI/II) del virus del Zika.

Más preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención se une a un epítopo de la proteína envolvente del virus del Zika, que incluye uno o más residuos de aminoácidos del borde lateral (“LR”, por sus siglas en inglés) de EDIII y/o uno o más residuos de aminoácidos de la región bisagra de EDI-EDIII. El borde lateral de EDIII y la región bisagra EDI-EDIII son conocidas por los expertos y se describen, por ejemplo, en Zhao, H., Fernandez, E., Dowd, K.A., Speer, S.D., Platt, D.J., Gorman, M.J., Govero, J., Nelson, C.A., Pierson, T.C., Diamond, M.S., et al. (2016). Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. Cell 166(4):1016-27 y en Kostyuchenko VA, Lim EX, Zhang S, Fibriansah G, Ng TS, Ooi JS, Shi J, Lok SM. Structure of the thermally stable Zika virus. Nature. 19 de mayo de 2016; 533(7603):425-8. Sin limitarse a ninguna teoría, se supone que (i) la unión al LR puede inhibir la fusión al atrapar un estado de transición de fusión del virus y (ii) la unión a la bisagra de EDI-EDIII y EDIII puede impedir el movimiento de EDIII para formar la estructura de post-fusión trimérica, lo que detiene la fusión de la membrana.

Por consiguiente, se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención (sea capaz de) inhibir un paso posterior a la unión de ZIKV. “Posterior a la unión” generalmente se refiere a cualquier paso de la infección por ZIKV después de la unión de ZIKV a la membrana celular (de la célula a la que se dirige ZIKV). Por ejemplo, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con

la presente invención, preferiblemente (puede) prevenir la fusión de la membrana. Además, también se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención (sea capaz de) causar la agregación de (partículas de) ZIKV. Lo más preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención (es capaz de) (i) inhibir un paso posterior a la unión de ZIKV y (ii) causar la agregación de (partículas de) ZIKV.

También se prefiere que el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se una a un epítopo cuaternario mostrado en un virión infeccioso de ZIKV. A pesar de una considerable actividad neutralizadora, tales anticuerpos generalmente no muestran una unión detectable a la proteína E de ZIKV recombinante o al EDIII de ZIKV en un ensayo ELISA estándar (como se describe anteriormente), es decir, si se analizan *in vitro*, en particular en forma purificada (es decir, proteína E de ZIKV “fuera de/sin” un virión, una partícula similar a virus o similares). Por lo tanto, “ninguna unión detectable” generalmente significa que no se detectó una CE_{50} hasta 10000 ng/ml en un ensayo ELISA estándar. En otras palabras, si la CE_{50} detectable en un ensayo ELISA estándar está por encima de 10000 ng/ml, se lo denomina “unión no detectable”.

Por lo tanto, dichos anticuerpos también se denominan en la presente como anticuerpos “neutralizantes sin unión a E” (“NNB”, por sus siglas en inglés). El epítopo cuaternario mostrado en un virión infeccioso de ZIKV es típicamente un epítopo conformacional. Por ejemplo, el epítopo cuaternario mostrado en un virión infeccioso de ZIKV puede formarse en la interfaz de dos monómeros de proteína envolvente que forman un dímero (“epítopo de dímero de envoltura”; EDE) o puede formarse a través de los dímeros vecinos (“epítopo en forma de V”).

En general, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende preferiblemente (al menos) tres regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) en una cadena pesada y (al menos) tres CDRs en una cadena ligera. En general, las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) son las regiones hipervariables presentes en los dominios variables de la cadena pesada y los dominios variables de la cadena ligera. Típicamente, las CDRs de una cadena pesada y la cadena ligera conectada de un anticuerpo forman en conjunto el receptor de antígeno. Por lo general, las tres CDRs (CDR1, CDR2 y CDR3) están dispuestas de forma no consecutiva en el dominio variable. Dado que los receptores de antígenos están compuestos típicamente de dos dominios variables (en dos cadenas polipeptídicas diferentes, es decir, cadenas pesadas y ligeras), hay seis CDRs para cada receptor de antígeno (cadena pesada: “CDRH1”, “CDRH2” y “CDRH3”, por sus siglas en inglés; cadena ligera: “CDRL1”, “CDRL2” y “CDRL3”, por sus siglas en inglés). Una única molécula de anticuerpo generalmente tiene dos receptores de antígeno y, por lo tanto, contiene doce CDRs. Las CDRs en la cadena pesada

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

Se determinaron las secuencias de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de los anticuerpos ejemplares de la invención, que comprenden tres CDRs diferentes en la cadena pesada y tres CDRs diferentes en la cadena ligera. La posición de los aminoácidos CDR se define de acuerdo con el sistema de numeración IMGT (IMGT: http://www.imgt.org/; cf. Lefranc, M.-P. et al. (2009) Nucleic Acids Res. 37, D1006-D1012).

La **Tabla 1** muestra SEQ ID NOs de las secuencias de aminoácidos de las CDRs de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y de la región variable de la cadena pesada (denominada "V_H") de anticuerpos ejemplares de acuerdo con la presente invención:

Nombre del anticuerpo	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**	**V_H**
ZKA190	1	2	3	8
ZKA185	19	20	21	26
ZKA230	37	38	39	44
ZKA78	55	56	57	62
ZKA64	73	74	75	80
ZKA3	237	238	239	240
ZKA4	241	242	243	244
ZKA5	245	246	247	248
ZKA6	249	250	251	252
ZKA7	253	254	255	256
ZKA8	257	258	259	260
ZKA76	261	262	263	264
ZKA117	265	266	267	268
ZKB27	269	270	271	272
ZKB29	273	274	275	276
ZKB34	277	278	279	280
ZKB39	281	282	283	284
ZKB46	285	286	287	288
ZKB53	289	290	291	292
ZKC26	293	294	295	296
ZKD5	297	298	299	300
ZKD7	301	302	303	304

Nombre del anticuerpo	CDRH1	CDRH2	CDRH3	V_H
ZKD8	305	306	307	308
ZKD15	309	310	311	312
ZKD16	313	314	315	316
ZKD17	317	318	319	320
ZKD20	321	322	323	324
ZKA134	325	326	327	328
ZKA246	329	330	331	332
ZKA256	333	334	335	336
ZKB42	337	338	339	340
ZKB85	341	342	343	344
ZKB47	345	346	347	348
ZKC6	349	350	351	352
ZKA160	353	354	355	356
ZKA172	357	358	359	360
ZKA174	361	362	363	364
ZKA189	365	366	367	368
ZKA195	369	370	371	372
ZKA215	373	374	375	376
ZKA218	377	378	379	380
ZKB75	381	382	383	384
ZKB83	385	386	387	388
ZKC3	389	390	391	392
ZKC18	393	394	395	396
ZKD1	397	398	399	400

La **Tabla 2** a continuación muestra SEQ ID NOs de las secuencias de aminoácidos de las CDRs de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3) y de la región variable de la cadena ligera (denominada "V_L") de anticuerpos ejemplares de acuerdo con la presente invención:

Nombre del anticuerpo	CDRL1	CDRL2	CDRL2 larga	CDRL3	V_L
ZKA190	4	5	6	7	9
ZKA185	22	23	24	25	27
ZKA230	40	41	42	43	45

ZKA78	58	59	60	61	63
ZKA64	76	77	78	79	81

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

Es preferible que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3, y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos un CDRL3, en donde al menos una CDR, preferiblemente al menos una CDRH3 de cadena pesada, comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 3, 75, 39, 21, 57, 239, 243, 247, 251, 255, 259, 263, 267, 271, 275, 279, 283, 287, 291, 295, 299, 303, 307, 311, 315, 319, 323, 327, 331, 335, 339, 343, 347, 351, 355, 359, 363, 367, 371, 375, 379, 383, 387, 391, 395 y 399, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3, y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos un CDRL3, en donde al menos una CDR, preferiblemente al menos una CDRH3 de cadena pesada, comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 3, 21, 39, 57 y 75, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia. Más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3, y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos un CDRL3, en donde al menos una CDR, preferiblemente al menos una CDRH3 de cadena pesada, comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 3, 21,

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

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

(i) al menos una CDRH1 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 19, 37, 55, 73, 237, 241, 245, 249,

253, 257, 261, 265, 269, 273, 277, 281, 285, 289, 293, 297, 301, 305, 309, 313, 317, 321, 325, 329, 333, 337, 341, 345, 349, 353, 357, 361, 365, 369, 373, 377, 381, 385, 389, 393 y 397, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) al menos una CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 20, 38, 56, 74, 238, 242, 246, 250, 254, 258, 262, 266, 270, 274, 278, 282, 286, 290, 294, 298, 302, 306, 310, 314, 318, 322, 326, 330, 334, 338, 342, 346, 350, 354, 358, 362, 366, 370, 374, 378, 382, 386, 390, 394 y 398, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) al menos una CDRH3 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 3, 21, 39, 57, 75, 239, 243, 247, 251, 255, 259, 263, 267, 271, 275, 279, 283, 287, 291, 295, 299, 303, 307, 311, 315, 319, 323, 327, 331, 335, 339, 343, 347, 351, 355, 359, 363, 367, 371, 375, 379, 383, 387, 391, 395 y 399, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

(i) al menos una CDRH1 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 19, 37, 55 y 73, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) al menos una CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 20, 38, 56 y 74, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) al menos una CDRH3 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 3, 21, 39, 57 y 75, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al

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

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

(i) al menos una CDRH1 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 19, 37 y 73 o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) al menos una CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 20, 38 y 74, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) al menos una CDRH3 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 3, 21, 39 y 75, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

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

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

(iii) al menos una CDRH3 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3 o de acuerdo con SEQ ID NO: 75; o una variante

de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(i) al menos una CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 4, 22, 40, 58 y 76, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) al menos una CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 5, 6, 23, 24, 41, 42, 59, 60, 77 y 78, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) al menos una CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs 7, 25, 43, 61 y 79, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

(i) al menos una CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 4, 22, 40 y 76 o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) al menos una CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 5, 6, 23, 24, 41, 42, 77 y 78, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos

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

(iii) al menos una CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs 7, 25, 43 y 79 o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

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

(ii) al menos una CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 5, 6, 77 y 78, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

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

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

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

(ii) al menos una CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 23, 24, 41 y 42, o una variante de secuencia funcional de las

mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) al menos una CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 25 o de acuerdo con SEQ ID NO: 43; o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

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

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

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

Preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3 (i) de acuerdo con SEQ ID NOs: 1-3; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 19-21; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 37-39; o las variantes de secuencia funcional de

las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 55-57; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (v) de acuerdo con SEQ ID NOs: 73-75; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (vi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 237-239; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (vii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 241-243; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (viii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 245-247; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ix) de acuerdo con SEQ ID NOs: 249-251; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (x) de acuerdo con SEQ ID NOs: 253-255; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 257-259; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 261-263; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xiii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 265-267; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al

menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xiv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 269-271; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 273-275; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xvi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 277-279; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xvii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 281-283; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xviii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 285-287; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xix) de acuerdo con SEQ ID NOs: 289-291; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xx) de acuerdo con SEQ ID NOs: 293-295; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 297-299; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 301-303; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxiii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 305-307; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxiv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 309-311; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos

70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 313-315; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxvi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 317-319; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxvii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 321-323; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxviii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 325-327; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxix) de acuerdo con SEQ ID NOs: 329-331; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxx) de acuerdo con SEQ ID NOs: 333-335; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 337-339; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 341-343; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxiii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 345-347; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxiv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 349-351; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%

de identidad de secuencia; (xxxv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 353-355; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxvi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 357-359; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxvii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 361-363; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxviii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 365-367; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxxix) de acuerdo con SEQ ID NOs: 369-371; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xl) de acuerdo con SEQ ID NOs: 373-375; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xli) de acuerdo con SEQ ID NOs: 377-379; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xlii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 381-383; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xliii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 385-387; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xliv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 389-391; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xlv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 393-395; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%,

al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xlvi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 397-399; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Por consiguiente, también es preferible que, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con SEQ ID NOs: 1-5 y 7; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 1-4 y 6-7; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 19-23 y 25; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 19-22 y 24-25; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (v) de acuerdo con SEQ ID NOs: 37-41 y 43; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (vi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 37-40 y 42-43; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (vii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 55-59 y 61; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (viii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 55-58 y 60-61; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos

99% de identidad de secuencia; (ix) de acuerdo con SEQ ID NOs: 73-77 y 79; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (x) de acuerdo con SEQ ID NOs: 73-76 y 78-79; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con SEQ ID NOs: 1-5 y 7; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 1-4 y 6-7; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 19-23 y 25; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 19-22 y 24-25; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (v) de acuerdo con SEQ ID NOs: 37-41 y 43; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (vi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 37-40 y 42-43; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (vii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 73-77 y 79; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (viii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 73-76 y 78-79; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al

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

Incluso más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con SEQ ID NOs: 1-5 y 7; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 1-4 y 6-7; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 73-77 y 79; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (iv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 73-76 y 78-79; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

También es preferible que, de preferencia, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con SEQ ID NOs: 19-23 y 25; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 19-22 y 24-25; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 37-41 y 43; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (vi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 37-40 y 42-43; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Lo más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con SEQ ID NOs: 1-5 y 7; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (ii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 1-4 y 6-7; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Además, también es preferible que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprenda una región variable de la cadena pesada (V_H) y, opcionalmente, una región variable de la cadena ligera (V_L), en donde la región variable de la cadena pesada (V_H) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 8, 26, 44, 62, 80, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268, 272, 276, 280, 284, 288, 292, 296, 300, 304, 308, 312, 316, 320, 324, 328, 332, 336, 340, 344, 348, 352, 356, 360, 364, 368, 372, 376, 380, 384, 388, 392, 396 y 400; o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Además, también es preferible que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprenda (i) una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) de acuerdo con SEQ ID NO: 8, o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de acuerdo con SEQ ID NO: 9, o una variante de la secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) de acuerdo con SEQ ID NO: 26, o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de acuerdo con SEQ ID NO: 27, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos

88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) de acuerdo con SEQ ID NO: 44, o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de acuerdo con SEQ ID NO: 45 o una variante de la secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iv) una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) de acuerdo con SEQ ID NO: 62, o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de acuerdo con SEQ ID NO: 63 o una variante de la secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (v) una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) de acuerdo con SEQ ID NO: 80, o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de acuerdo con SEQ ID NO: 81, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) de acuerdo con SEQ ID NO: 26, o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de acuerdo con SEQ ID NO: 27, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) de acuerdo con SEQ ID NO: 44, o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de acuerdo con SEQ ID NO: 45 o una variante de la secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (iv) una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) de acuerdo con SEQ ID NO: 80, o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de acuerdo con SEQ ID NO: 81, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

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

También es preferible que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprenda (i) una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) de acuerdo con SEQ ID NO: 26, o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de acuerdo con SEQ ID NO: 27, o una variante de la secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (ii) una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) de acuerdo con SEQ ID NO: 44, o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de acuerdo con SEQ ID NO: 45, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

Preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención es gZKA190, gZKA64, gZKA230, gZKA185 o gZKA78; preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, es gZKA190, gZKA64, gZKA230 o gZKA185; más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, es gZKA190 o gZKA64; y, lo más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, es gZKA190.

Los presentes inventores han aislado anticuerpos monoclonales (mAb) de acuerdo con la presente invención, denominados en la presente como ZKA190, ZKA64, ZKA230, ZKA185 y ZKA78 (véanse las Tablas 1 y 2, Ejemplo 1). Con base en esos anticuerpos, en particular en los genes V_H y V_L de esos anticuerpos, los términos “gZKA190”, “gZKA64”, “gZKA230”, “gZKA185” y “gZKA78”, tal como se usan en la presente, se refieren a los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, “genéricos” respectivos..

Específicamente, “gZKA190” se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene una secuencia de aminoácidos de CDRH1 de acuerdo con SEQ ID NO: 1, una secuencia de aminoácidos de CDRH2 de acuerdo con SEQ ID NO: 2, una secuencia de aminoácidos de CDRH3 de acuerdo con SEQ ID NO: 3, una secuencia de aminoácidos de CDRL1 de acuerdo con SEQ ID NO: 4, una secuencia de aminoácidos de CDRL2 de acuerdo con SEQ ID NO: 5 o 6, y una secuencia de aminoácidos de CDRL3 de acuerdo con SEQ ID NO: 7. La región variable de la cadena pesada (V_H) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 8 y la región variable de la cadena ligera (V_L) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 9.

“gZKA64” se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene una secuencia de aminoácidos de CDRH1 de acuerdo con SEQ ID NO: 73, una secuencia de aminoácidos de CDRH2 de acuerdo con SEQ ID NO: 74, una secuencia de aminoácidos de CDRH3 de acuerdo con SEQ ID NO: 75, una secuencia de aminoácidos de CDRL1 de acuerdo con SEQ ID NO: 76, una secuencia de aminoácidos de CDRL2 de acuerdo con SEQ ID NO: 77 o 78, y una secuencia de aminoácidos de CDRL3 de acuerdo con SEQ ID NO: 79. La región variable de la cadena pesada (V_H) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 80 y la región variable de la cadena ligera (V_L) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 81.

“gZKA230” se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene una secuencia de aminoácidos de CDRH1 de acuerdo con SEQ ID NO: 37, una secuencia de aminoácidos de CDRH2 de acuerdo con SEQ ID NO: 38, una secuencia de aminoácidos de CDRH3 de acuerdo con SEQ ID NO: 39, una secuencia de aminoácidos de CDRL1 de acuerdo con SEQ ID NO: 40, una secuencia de aminoácidos de CDRL2 de acuerdo con SEQ ID NO: 41 o 42, y una secuencia de aminoácidos de CDRL3 de acuerdo con SEQ ID

NO: 43. La región variable de la cadena pesada (V_H) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 44 y la región variable de la cadena ligera (V_L) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 45.

"gZKA185" se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene una secuencia de aminoácidos de CDRH1 de acuerdo con SEQ ID NO: 19, una secuencia de aminoácidos de CDRH2 de acuerdo con SEQ ID NO: 20, una secuencia de aminoácidos de CDRH3 de acuerdo con SEQ ID NO: 21, una secuencia de aminoácidos de CDRL1 de acuerdo con SEQ ID NO: 22, una secuencia de aminoácidos de CDRL2 de acuerdo con SEQ ID NO: 23 o 24, y una secuencia de aminoácidos de CDRL3 de acuerdo con SEQ ID NO: 25. La región variable de la cadena pesada (V_H) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 26 y la región variable de la cadena ligera (V_L) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 27.

"gZKA78" se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene una secuencia de aminoácidos de CDRH1 de acuerdo con SEQ ID NO: 55, una secuencia de aminoácidos de CDRH2 de acuerdo con SEQ ID NO: 56, una secuencia de aminoácidos de CDRH3 de acuerdo con SEQ ID NO: 57, una secuencia de aminoácidos de CDRL1 de acuerdo con SEQ ID NO: 58, una secuencia de aminoácidos de CDRL2 de acuerdo con SEQ ID NO: 59 o 60, y una secuencia de aminoácidos de CDRL3 de acuerdo con SEQ ID NO: 61. La región variable de la cadena pesada (V_H) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 62 y la región variable de la cadena ligera (V_L) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 63.

Preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención es para uso como un medicamento. En otras palabras, el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención se puede usar en la preparación de un medicamento. Más preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención es para uso en la prevención y/o tratamiento de la infección por el virus del Zika. En otras palabras, el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención se puede usar en la preparación de un medicamento o en la prevención y/o tratamiento de la infección por el virus del Zika. Este aspecto se describe con más detalle a continuación.

Molécula de ácido nucleico

En otro aspecto, la invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, tal como se describe anteriormente. Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico y/o polinucleótidos incluyen, por ejemplo, un polinucleótido recombinante, un vector, un oligonucleótido, una molécula de ARN tal como un

ARNr, un ARNm, un miARN, un ARNip o un ARNt, o una molécula de ADN, tal como un ADNc. Se prefieren las secuencias de ácido nucleico que codifican parte o la totalidad de las cadenas ligeras y pesadas, así como las CDRs de los anticuerpos de la presente invención. Preferiblemente, en la presente se proporcionan, por lo tanto, secuencias de ácido nucleico que codifican parte o la totalidad de las cadenas ligeras y pesadas, en particular secuencias V_H y V_L y CDRs de los anticuerpos ejemplares de la invención. Las Tablas 1 y 2 proporcionan los números de identificación de secuencias para las secuencias de aminoácidos de las CDRs, V_H y V_L de los anticuerpos ejemplares de acuerdo con la presente invención.

La Tabla 3 a continuación proporciona los números de identificación de secuencias para secuencias de ácido nucleico ejemplares que codifican las CDRs, V_H y V_L de anticuerpos ejemplares de acuerdo con la presente invención. Debido a la redundancia del código genético, la presente invención también comprende variantes de secuencia de estas secuencias de ácido nucleico y, en particular, dichas variantes de secuencia, que codifican las mismas secuencias de aminoácidos.

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

La **Tabla 3** muestra ejemplos de secuencias de ácido nucleico de las CDRs, así como la región variable de la cadena pesada (V_H) y la región variable de la cadena ligera (V_L) de cinco anticuerpos ejemplares de acuerdo con la presente invención (“ZKA190”, “ZKA64”, “ZKA230”, “ZKA185”, “ZKA78”):

ZKA190	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de ácido nucleico**
CDRH1	10	**ggattcaccttcagtaaatatggc**
CDRH2	11	**atatcatatgagggaagtaataaa**
CDRH3	12	**gcgaaatcggggacccaatactatgatactactggttatgagtatagggggtttg gaatactttggctac**
CDRL1	13	**cagagtgttagtagcagttac**

CDRL2	14	**gatgcatcc**
CDRL2 larga	15	ctcatctat**gatgcatcc**agcagggcc
CDRL3	16	**cagcagtatggtaggtcaaggtggaca**
V_H	17	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgag actctcctgtgcagcctct**ggattcaccttcagtaaatatggc**atgcactgggtccgc caggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagtt**atatcatatgagggaagta ataaa**tattatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaa gaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggcagtgtatta ctgt**gcgaaatcggggacccaatactatgatactactggttatgagtataggggt ttggaatactttggctac**tggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcag
V_L	18	gaaattgtgttgacgcagtctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagagcca ccctctcctgcagggccagt**cagagtgttagtagcagttac**ttagcctggtaccagc agaaacgtggccaggctcccaggctcctcatctat**gatgcatcc**agcagggccact ggcatcccagacaggttcagtggcagtgggtctgggacagacttcactctcaccatca gcagactggagcctgaagattttgcagtgtattactgt**cagcagtatggtaggtcaa ggtggaca**ttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaac
ZKA185	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de ácido nucleico**
CDRH1	28	**ggatatagttttaccagttactgg**
CDRH2	29	**tttgatcctagtgactctcaaacc**
CDRH3	30	**gcgagaagatattgtagtagtagtagttgttatgtggacaat**
CDRL1	31	**gcattgccaaataaattt**
CDRL2	32	**gaggacaac**
CDRL2 larga	33	gtcatctat**gaggacaac**aaacgaccc
CDRL3	34	**tactcaacagacagcagttctaatcccctgggagta**
V_H	35	gaagtgcagctggtgcagtccggagcagaggtgaaaaagcccggggagtctctga ggatctcctgtaagggttct**ggatatagttttaccagttactgg**atcacctgggtgcgc cagatgcccgggaaaggcctggagtggatggcgaag**tttgatcctagtgactctc**

		aaaccaactacagcccgtccttccaaggccacgtcaccatctcagttgacaagtcca tcagcactgcctacttgcagtggagcagcctgaaggcctcggacaccgccatgtatta ctgt**gcgagaagatattgtagtagtagtagttgttatgtggacaat**tggggccagg gaaccctggtcaccatcttctcag
V_L	36	tcctatgagctgacacagccaccctcggtgtcagtgtccccaggacaaacggccag gatcacctgctctggagat**gcattgccaaataaattt**gcttattggtaccggcagaag tcaggccaggcccctgttctggtcatctat**gaggacaac**aaacgaccctccgggatc cctgagagattctctggctccagctcagggacaatggccaccttgactatcagtgggg cccaggtggaggatgaagctgactaccactgt**tactcaacagacagcagttctaat cccctgggagta**ttcggcggagggaccaagctgaccgtcctag
ZKA230	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de ácido nucleico**
CDRH1	46	**ggtggctccatcagtagtgactac**
CDRH2	47	**atctattacagtgggagcacc**
CDRH3	48	**gcgaggaggaggaagtatgattccctttgggggagttttgcttttgatatc**
CDRL1	49	**agctccaacatcggaggtaattat**
CDRL2	50	**attaatgat**
CDRL2 larga	51	ctcatctgt**attaatgat**caccggccc
CDRL3	52	**gcaacatgggatgacagcctgggtggccttgta**
V_H	53	caggtgcagctgcaggagtcgggcccaggcctggtgaagccttcggagaccctgtc cctcacctgcgcagtctct**ggtggctccatcagtagtgactac**tggagctggatccg gcagcccccagggaagggactggagtggattgggtat**atctattacagtgggagc acc**aactacaacccctccctcaagagtcgagtcaccatatcagtagacacgtccaa gaaccacttctccctgaagctgaactctgtgaccgctgcggacacggccgtgtattact gt**gcgaggaggaggaagtatgattccctttgggggagttttgcttttgatatc**tgg ggccaagggacaatggtcaccgtctcttcag
V_L	54	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcacc atctcttgttctggaagc**agctccaacatcggaggtaattat**gtatactggtaccagc agctcccaggaacggcccccaaactcctcatctgt**attaatgat**caccggccctcag gggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagt gggctccagtccgaggatgaggctgattattactgt**gcaacatgggatgacagcct**

		gggtggccttgtattcggcggagggaccaagctgaccgtcctag
ZKA78	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de ácido nucleico**
CDRH1	64	**ggcttcacttttagtaactatgca**
CDRH2	65	**atcgggcgcaacggggactctatc**
CDRH3	66	**gtgaaagatctggccatccccgagtcctacagaattgaagctgattat**
CDRL1	67	**cagtccgtgctgtaccgctctaacaacaagaattac**
CDRL2	68	**tgggcttca**
CDRL2 larga	69	ctgatctat**tgggcttca**acccgggaa
CDRL3	70	**cagcagtactattctagtcctcgaact**
V_H	71	gaggtgcagctggcagaatcaggcgggggactggtccagcctggcggcagcctga cactgtcttgcagtggatca**ggcttcacttttagtaactatgca**atggtgtgggcaag gcaggctcctgggaagggactggagtatgtctctggc**atcgggcgcaacgggga ctctatc**tactatactgatagtgtgaagggccggttcaccatcagcagagacaatagc aaatccatggtgtacctgcagatgagctccctgcgaaccgaagacacagcagtgta ctattgc**gtgaaagatctggccatccccgagtcctacagaattgaagctgattat**t ggggacagggcaccctggtcatcgtgagcgccg
V_L	72	gacatcgtgatgacacagtctccagatagtctggcagtcagtctgggggagagggcc actattaactgcaagagctcc**cagtccgtgctgtaccgctctaacaacaagaatta c**ctgtcttggtatcagcagaagcccggacagccccctaaactgctgatctat**tgggct tca**acccgggaaagcggcgtcccagacagattctcaggcagcgggtccggaaca gacttcaccctgacaattagccccctgcaggcagaggacgtggctgtctactattgt**ca gcagtactattctagtcctcgaact**ttcggccaggggaccaaggtggaaatcaaa c
ZKA64	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de ácido nucleico**
CDRH1	82	**ggctacaccttcacagggtatcac**
CDRH2	83	**attaaccctaattctggcgggacc**
CDRH3	84	**gctcggatgagctcctctatttggggcttcgatcat**

CDRL1	85	**cagtctgtgctgattaac**
CDRL2	86	**ggagcatcc**
CDRL2 larga	87	ctgatctat**ggagcatcc**tccagggct
CDRL3	88	**cagcagtacaatgattggccccctatcaca**
V_H	89	caggtgcagctggtccagagcggagcagaggtgaagaaacccggcgcctcagtg aaggtcagctgcaaagcttcc**ggctacaccttcacagggtatcac**atcgactgggt gaggcaggcaagaggacagggactggaatggatgggacgg**attaaccctaattc tggcgggacc**aactacgcccagaagtttcagggccgagtgactatgaccagaga caccagcatctccacagcttatatgcagctgtcccggctgagatctgacgatagtgcc gtctactattgt**gctcggatgagctcctctatttggggcttcgatcat**tgggggcag ggaacactggtgactgtcagttcag
V_L	90	gagatcgtgatgactcagtctccagccaccctgtcagtcagcccaggagaacgggc aaccctgtcttgcagagcctcc**cagtctgtgctgattaac**ctggcttggtaccagcag aagccaggccaggcaccccgactgctgatctat**ggagcatcc**tccagggctaccg gcattcctgcacgcttcagtggatcaggaagcggaacagagtttaccctgacaatctc tagtctgcagtccgaagacttcgctgtctactattgt**cagcagtacaatgattggccc cctatcaca**tttggccaggggactagactggagatcaagc

Preferiblemente, la secuencia de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 10-18, 28-36, 46-54, 64-72 y 82-90; o una variante de secuencia funcional de las mismas.

También se prefiere que las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención incluyan secuencias de ácido nucleico que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con el ácido nucleico que codifica una CDR, una secuencia V_H y/o una secuencia V_L utilizada en un anticuerpo (ejemplar) de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, con las secuencias que se muestran en la Tabla 3.

En general, la molécula de ácido nucleico puede manipularse para insertar, eliminar o alterar ciertas secuencias de ácido nucleico. Los cambios de dicha manipulación incluyen, pero no se limitan a, cambios para introducir sitios de restricción, para modificar el uso del codón, para añadir u optimizar las secuencias reguladoras de la transcripción y/o la

traducción, etc. También es posible cambiar el ácido nucleico para alterar los aminoácidos codificados. Por ejemplo, puede ser útil introducir una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Dichas mutaciones puntuales pueden modificar las funciones efectoras, la afinidad de unión a antígeno, las modificaciones postraduccionales, la inmunogenicidad, etc., pueden introducir aminoácidos para la unión de grupos covalentes (por ejemplo, etiquetas) o pueden introducir etiquetas (por ejemplo, para propósitos de purificación). Las mutaciones se pueden introducir en sitios específicos o se pueden introducir aleatoriamente, seguido de una selección (por ejemplo, evolución molecular). Por ejemplo, uno o más ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las regiones CDR, una secuencia V_H y/o una secuencia V_L de un anticuerpo (ejemplar) de la invención pueden mutarse de manera aleatoria o direccional para introducir diferentes propiedades en los aminoácidos codificados. Dichos cambios pueden ser el resultado de un proceso iterativo en el que los cambios iniciales se retienen y se introducen nuevos cambios en otras posiciones de nucleótidos. Además, los cambios logrados en pasos independientes se pueden combinar. Las diferentes propiedades introducidas en los aminoácidos codificados pueden incluir, pero no se limitan a, afinidad mejorada.

Vector

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

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

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

Células

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona células que expresan el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención; y/o que comprenden el vector de acuerdo con la presente invención.

Los ejemplos de tales células incluyen, pero no se limitan a, células eucariotas, por ejemplo, células de levadura, células animales o células vegetales. Preferiblemente, las células son células de mamífero, más preferiblemente una línea celular de mamífero. Los ejemplos preferidos incluyen células humanas, células de ovario de hámster chino (“CHO”, por sus siglas en inglés), células HEK293T, células PER.C6, células NS0, células hepáticas humanas, células de mieloma o células de hibridoma.

En particular, la célula puede transfectarse con un vector de acuerdo con la presente invención, preferiblemente con un vector de expresión. El término “transfección” se refiere a la introducción de moléculas de ácido nucleico, tales como las moléculas de ADN o ARN (por ejemplo, ARNm), en células, preferiblemente en células eucariotas. En el contexto de la presente invención, el término “transfección” abarca cualquier método conocido por un experto en la técnica para introducir moléculas de ácido nucleico en células, preferiblemente en células eucariotas, tal como en células de mamíferos. Tales métodos abarcan, por ejemplo, la electroporación, la lipofección, por ejemplo, basada en lípidos y/o liposomas catiónicos, precipitación con fosfato de calcio, transfección basada en nanopartículas, transfección basada en virus o transfección basada en polímeros catiónicos, tales como DEAE-dextrano o polietilenimina, etc. Preferiblemente, la introducción no es viral.

Además, las células de la presente invención pueden transfectarse de manera estable o transitoria con el vector de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, para expresar el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, las células se transfectan de manera estable con el vector de acuerdo con la presente invención que codifica el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención. Alternativamente, también se prefiere que las células se transfecten de manera transitoria con el vector de acuerdo con la

presente invención que codifica el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención.

Características adicionales opcionales de los anticuerpos

Los anticuerpos de la invención se pueden acoplar, por ejemplo, a un fármaco para administrar a un sitio de tratamiento o acoplarse a una etiqueta detectable para facilitar la obtención de imágenes de un sitio que comprende células de interés. Los métodos para acoplar anticuerpos a fármacos y etiquetas detectables son bien conocidos en la técnica, ya que son métodos para obtener imágenes usando etiquetas detectables. Los anticuerpos etiquetados pueden emplearse en una amplia variedad de ensayos, empleando una amplia variedad de etiquetas. La detección de la formación de un complejo antígeno-anticuerpo entre un anticuerpo de la invención y un epítopo de interés puede facilitarse al unir una sustancia detectable al anticuerpo. Los medios de detección adecuados incluyen el uso de etiquetas, tales como radionúclidos, enzimas, coenzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, cromógenos, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, complejos de grupos protésicos, radicales libres, partículas, colorantes y similares. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β-galactosidasa o la acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente es el luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen 125I, 131I, 35S o 3H. Dichos reactivos etiquetados pueden usarse en diversos ensayos bien conocidos, tales como radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo, ELISA, inmunoensayos fluorescentes, y similares. Los anticuerpos etiqeutados de acuerdo con la presente invención se pueden usar de etse modo en tales ensayos, por ejemplo, como se describe en US 3,766,162; US 3,791,932; US 3,817,837 y US 4,233,402.

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

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

Alternativamente, un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo del mismo, puede conjugarse con un segundo anticuerpo, o fragmento de anticuerpo del mismo, para formar un heteroconjugado de anticuerpo como se describe en US 4,676,980. Además, se pueden usar enlazadores entre las etiquetas y los anticuerpos de la invención, por ejemplo, como se describe en US 4,831,175. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden etiquetarse directamente con yodo radiactivo, indio, itrio u otra partícula radiactiva conocida en la técnica, por ejemplo, como se describe en US 5,595,721. El tratamiento puede consistir en una combinación de tratamiento con anticuerpos conjugados y no conjugados administrados simultáneamente o posteriormente, por ejemplo, como se describe en WO 00/52031; WO 00/52473.

Los anticuerpos de la invención también pueden unirse a un soporte sólido. Además, los anticuerpos de la invención, o fragmentos de anticuerpos funcionales de los mismos, pueden modificarse químicamente mediante una conjugación covalente a un polímero para, por ejemplo, aumentar su vida media circulante. Los ejemplos de polímeros y métodos para unirlos a péptidos, se muestran en US 4,766,106; US 4,179,337; US 4,495,285 y US 4,609,546. En algunas modalidades, los polímeros pueden seleccionarse entre polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a temperatura ambiente y tiene la fórmula general: $R(O\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_nO\text{-}R$, en donde R puede ser hidrógeno, o un grupo protector, tal como un grupo alquilo o alcanol. Preferiblemente, el grupo protector puede tener entre 1 y 8 carbonos. Por ejemplo, el grupo protector es metilo. El símbolo n es un número entero positivo. En una modalidad, n es entre 1 y 1000. En otra modalidad, n es entre 2 y 500. Preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular promedio entre 1000 y 40000, más preferiblemente el PEG tiene un peso molecular entre 2000 y 20000, incluso más preferiblemente el PEG tiene un peso molecular entre 3000 y 12000. Además, el PEG puede tener al menos un grupo hidroxi, por ejemplo, el PEG puede tener un grupo hidroxi terminal. Por ejemplo, es el grupo hidroxi terminal el que se activa para reaccionar con un grupo amino

libre en el inhibidor. Sin embargo, se entenderá que el tipo y la cantidad de los grupos reactivos se pueden variar para lograr un PEG/anticuerpo conjugado covalentemente de la presente invención.

Los polioles polioxietilados solubles en agua también son útiles en la presente invención. Incluyen sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado ("POG", por sus siglas en inglés) y similares. En una modalidad, se usa POG. Sin limitarse a ninguna teoría, debido a que la cadena principal de glicerol del glicerol polioxietilado es el mismo esqueleto que ocurre naturalmente en, por ejemplo, animales y humanos en monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos, esta ramificación no se verá necesariamente como un agente extraño en el cuerpo. El POG puede tener un peso molecular en el mismo rango que PEG. Otro sistema de administración de fármacos que puede usarse para aumentar la vida media circulatoria es el liposoma. Un experto en la técnica conoce los métodos de preparación de sistemas de administración de liposomas. Otros sistemas de administración de fármacos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Poznansky et al. (1980) y Poznansky (1984).

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

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

Producción de anticuerpos

Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la metodología general para producir anticuerpos monoclonales utilizando tecnología de hibridoma es bien conocida (Kohler, G. & Milstein, C., 1975; Kozbar et al., 1983). En una modalidad, se usa el método alternativo de inmortalización con EBV descrito en WO2004/076677.

Un método preferido se describe en WO 2004/076677. En este método, las células B que producen el anticuerpo de la invención se transforman con EBV y un activador policlonal de células B. Se pueden añadir opcionalmente estimulantes adicionales del crecimiento y la diferenciación celular durante el paso de transformación para mejorar aún más la eficiencia.

Estos estimulantes pueden ser citocinas, tal como IL-2 e IL-15. En un aspecto, se agrega IL-2 durante el paso de inmortalización para mejorar aún más la eficiencia de la inmortalización, pero su uso no es esencial. Las células B inmortalizadas producidas usando estos métodos pueden cultivarse posteriormente utilizando métodos conocidos en la técnica y los anticuerpos aislados de ellas.

Otro método preferido se describe en WO 2010/046775. En este método, las células plasmáticas se cultivan en números limitados, o como células plasmáticas individuales en placas de cultivo de micropocillos. Los anticuerpos pueden aislarse de los cultivos de células plasmáticas. Además, a partir de los cultivos de células plasmáticas, se puede extraer el ARN y se puede llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR", por sus siglas en inglés) utilizando métodos conocidos en la técnica. Las regiones V_H y V_L de los anticuerpos pueden amplificarse mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa ("RT-PCR", por sus siglas en inglés), secuenciarse y clonarse en un vector de expresión que luego se transfecta en células HEK293T u otras células huésped. La clonación del ácido nucleico en vectores de expresión, la transfección de células huésped, el cultivo de las células huésped transfectadas y el aislamiento del anticuerpo producido pueden realizarse utilizando cualquier método conocido por los expertos en la técnica.

Los anticuerpos pueden purificarse adicionalmente, si se desea, utilizando filtración, centrifugación y diversos métodos cromatográficos, tales como cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC", por sus siglas en inglés) o cromatografía por afinidad. Las técnicas para la purificación de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, incluyendo técnicas para producir anticuerpos de calidad farmacéutica, son bien conocidas en la técnica.

Los fragmentos de los anticuerpos de la invención se pueden obtener a partir de los anticuerpos mediante métodos que incluyen la digestión con enzimas, tales como pepsina o papaína, y/o mediante la escisión de enlaces disulfuro por reducción química. Alternativamente, los fragmentos de los anticuerpos pueden obtenerse mediante la clonación y expresión de parte de las secuencias de las cadenas pesadas o ligeras. Los "fragmentos" de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv. La invención también abarca fragmentos Fv monocatenarios (scFv) derivados de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, la invención incluye un scFv que comprende las CDRs de un anticuerpo de la invención. También se incluyen los monómeros y dímeros de cadena pesada o ligera, los anticuerpos de cadena pesada de dominio único, los anticuerpos de cadena ligera de dominio único, así como los anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, Fv monocatenario en el que los dominios variables de cadena ligera y pesada están unidos por un enlazador peptídico.

Los fragmentos de anticuerpos de la invención pueden impartir interacciones monovalentes o multivalentes y estar contenidos en diversas estructuras, tal como se

describió anteriormente. Por ejemplo, las moléculas scFv se pueden sintetizar para crear un “triacuerpo” trivalente o un “tetracuerpo” tetravalente. Las moléculas scFv pueden incluir un dominio de la región Fc que da como resultado minicuerpos bivalentes. Además, las secuencias de la invención pueden ser un componente de moléculas multiespecíficas en las que las secuencias de la invención se dirigen a los epítopos de la invención y otras regiones de la molécula se unen a otros objetivos. Las moléculas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, Fab2 biespecífico, Fab3 triespecífico, scFv biespecífico y diacuerpos (Holliger & Hudson, 2005, *Nature Biotechnology* 9: 1126-1136).

Se pueden usar técnicas estándar de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas pueden sintetizarse completamente o en parte usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Las técnicas de mutagénesis dirigida y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden usar de según corresponda.

Se puede usar cualquier célula huésped/sistema de vectores adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican las moléculas de anticuerpo de la presente invención o fragmentos de las mismas. Se pueden usar sistemas bacterianos, por ejemplo, E. coli, y otros sistemas microbianos, en parte, para la expresión de fragmentos de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y F(ab’)2, y especialmente los fragmentos Fv y los fragmentos de anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, FVs monocatenarios. Se pueden usar sistemas de expresión de células huéspedes eucariotas, por ejemplo, de mamíferos, para la producción de moléculas de anticuerpos más grandes, incluyendo moléculas de anticuerpos completas. Las células huésped de mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, de mieloma o de hibridoma.

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención, el cual comprende cultivar una célula huésped que comprende un vector que codifica un ácido nucleico de la presente invención en condiciones adecuadas para la expresión de proteínas a partir de ADN que codifica la molécula de anticuerpo del presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.

La molécula de anticuerpo puede comprender sólo un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso sólo se necesita usar una secuencia de codificación del polipéptido de cadena pesada o cadena ligera para transfectar las células huésped. Para la producción de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como ligeras, la línea celular puede transfectarse con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede usar un único vector, el vector que incluye secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y cadena pesada.

Alternativamente, los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden producir mediante (i) la expresión de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula huésped, por ejemplo, mediante el uso de un vector de acuerdo con la presente invención, y (ii) aislando el producto de anticuerpo expresado. Además, el método puede incluir (iii) purificar el anticuerpo aislado. Las células B transformadas y las células plasmáticas cultivadas pueden examinarse para detectar aquellas que producen anticuerpos de la especificidad o función deseada.

El paso de cribado puede llevarse a cabo mediante cualquier inmunoensayo, por ejemplo, ELISA, mediante la tinción de tejidos o células (incluyendo las células transfectadas), mediante un ensayo de neutralización o mediante uno de varios otros métodos conocidos en la técnica para identificar la especificidad o función deseadas. El ensayo puede seleccionar basándose en el simple reconocimiento de uno o más antígenos, o puede seleccionar basándose adicionalmente en una función deseada, por ejemplo, para seleccionar anticuerpos neutralizantes en lugar de sólo anticuerpos de unión a antígeno, para seleccionar anticuerpos que puedan cambiar las características de las células, tal como sus cascadas de señalización, su forma, su tasa de crecimiento, su capacidad de influir en otras células, su respuesta a la influencia de otras células o de otros reactivos o por un cambio en las condiciones, su estado de diferenciación, etc.

Los clones de células B transformadas individuales pueden producirse posteriormente a partir del cultivo de células B transformadas y positivas. La etapa de clonación para separar clones individuales de la mezcla de células positivas puede llevarse a cabo utilizando dilución limitante, micromanipulación, deposición de células individuales por clasificación celular u otro método conocido en la técnica.

El ácido nucleico de las células plasmáticas cultivadas se puede aislar, clonar y expresar en células HEK293T u otras células huésped conocidas usando métodos conocidos en la técnica.

Los clones de células B inmortalizadas o las células huésped transfectadas de la invención se pueden usar de varias maneras, por ejemplo, como fuente de anticuerpos monoclonales, como fuente de ácido nucleico (ADN o ARNm) que codifica un anticuerpo monoclonal de interés, para investigación, etc.

La invención también proporciona una composición que comprende células B inmortalizadas de memoria o células huésped transfectadas que producen anticuerpos de acuerdo con la presente invención.

El clon de células B inmortalizadas o las células plasmáticas cultivadas de la invención también se pueden usar como fuente de ácido nucleico para la clonación de genes de anticuerpos para la expresión recombinante posterior. La expresión de fuentes recombinantes

es más común con fines farmacéuticos que la expresión de células B o hibridomas, por ejemplo, por razones de estabilidad, reproducibilidad, facilidad de cultivo, etc.

Por lo tanto, la invención también proporciona un método para preparar una célula recombinante, que comprende los siguientes pasos: (i) obtener uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm de cadena pesada y/o ligera) del clon de células B o de las células plasmáticas cultivadas que codifican el anticuerpo de interés; (ii) insertar el ácido nucleico en un vector de expresión y (iii) transfectar el vector en una célula huésped para permitir la expresión del anticuerpo de interés en esa célula huésped.

De manera similar, la invención proporciona un método para preparar una célula recombinante, que comprende los siguientes pasos: (i) secuenciar el (los) ácido(s) nucleico(s) del clon de células B o de las células plasmáticas cultivadas que codifican el anticuerpo de interés; y (ii) usar la información de secuencia del paso (i) para preparar ácido(s) nucleico(s) para su inserción en una célula huésped con el fin de permitir la expresión del anticuerpo de interés en esa célula huésped. El ácido nucleico puede, pero no necesita, ser manipulado entre los pasos (i) y (ii) para introducir sitios de restricción, para cambiar el uso de codones y/o para optimizar la transcripción y/o las secuencias reguladoras de la traducción.

Además, la invención también proporciona un método para preparar una célula huésped transfectada, que comprende el paso de transfectar una célula huésped con uno o más ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de interés, en donde los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos que se derivaron de un clon de una célula B inmortalizada o una célula plasmática cultivada de la invención. Por lo tanto, los procedimientos para preparar primero el (los) ácido(s) nucleico(s) y posteriormente usarlo(s) para transfectar una célula huésped pueden ser llevados a cabo en diferentes momentos, por diferentes personas y en diferentes lugares (por ejemplo, en diferentes países).

Estas células recombinantes de la invención se pueden usar para fines de expresión y cultivo. Son particularmente útiles para la expresión de anticuerpos para la producción farmacéutica a gran escala. También pueden usarse como el ingrediente activo de una composición farmacéutica. Se puede utilizar cualquier técnica de cultivo adecuada, incluyendo, entre otros, el cultivo estático, cultivo en botella rotatoria, fluido ascítico, cartucho de biorreactor de tipo fibra hueca, minifermentador modular, tanque con agitación, cultivo de microportadores, perfusión del núcleo cerámico, etc.

Los métodos para obtener y secuenciar genes de inmunoglobulina a partir de células B o células plasmáticas son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, consulte el Capítulo 4 de Kuby Immunology, 4a edición, 2000).

La célula huésped transfectada puede ser una célula eucariota, incluyendo células de levadura y animales, particularmente células de mamíferos (por ejemplo, células CHO, células NS0, células humanas, tales como las células PER.C6 o HKB-11, células de mieloma o una

célula hepática humana), así como células vegetales, por lo que se prefieren las células de mamíferos. Los huéspedes de expresión preferidos pueden glicosilar el anticuerpo de la invención, particularmente con estructuras de carbohidratos que no son inmunogénicas en seres humanos. En una modalidad, la célula huésped transfectada puede crecer en medios libres de suero. En una modalidad adicional, la célula huésped transfectada puede crecer en cultivo sin la presencia de productos derivados de animales. La célula huésped transfectada también puede cultivarse para producir una línea celular.

La invención también proporciona un método para preparar una o más moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, genes de cadena pesada y ligera) que codifican un anticuerpo de interés, que comprende los siguientes pasos: (i) preparar un clon de células B inmortalizadas o cultivar células plasmáticas de acuerdo con la invención; (ii) obtener del clon de células B o de las células plasmáticas cultivadas un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de interés. Además, la invención proporciona un método para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de interés, que comprende los siguientes pasos: (i) preparar un clon de células B inmortalizadas o cultivar células plasmáticas de acuerdo con la invención; (ii) secuenciar el ácido nucleico del clon de células B o las células plasmáticas cultivadas que codifica el anticuerpo de interés.

La invención proporciona adicionalmente un método para preparar una o más moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de interés, que comprende el paso de obtener el ácido nucleico que se obtuvo a partir de un clon de células B transformadas o células plasmáticas cultivadas de la invención. Por lo tanto, los procedimientos para obtener primero el clon de células B o las células plasmáticas cultivadas y posteriormente obtener los ácidos nucleicos del clon de células B o las células plasmáticas cultivadas pueden ser llevados a cabo en diferentes momentos, por diferentes personas y en diferentes lugares (por ejemplo, en diferentes países).

La invención también comprende un método para preparar un anticuerpo (por ejemplo, para uso farmacéutico) de acuerdo con la presente invención, que comprende los siguientes pasos: (i) obtener y/o secuenciar uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, genes de cadena pesada y ligera) del clon de células B seleccionado o de las células plasmáticas cultivadas que expresan el anticuerpo de interés; (ii) insertar el (los) ácido(s) nucleico(s) en o usar la(s) secuencia(s) de ácido(s) nucleico(s) para preparar un vector de expresión; (iii) transfectar una célula huésped que puede expresar el anticuerpo de interés; (iv) cultivar o subcultivar las células huésped transfectadas en condiciones en las que se expresa el anticuerpo de interés; y, opcionalmente, (v) purificar el anticuerpo de interés.

La invención también proporciona un método para preparar un anticuerpo que comprende los siguientes pasos: cultivar o subcultivar una población de células huésped transfectadas, por ejemplo, una población de células huésped transfectadas de manera

estable, bajo condiciones en las que se expresa el anticuerpo de interés y, opcionalmente, purificando el anticuerpo de interés, en donde dicha población de células huésped transfectadas se ha preparado (i) proporcionando ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) un anticuerpo de interés seleccionado producido por un clon de células B o células plasmáticas cultivadas preparadas como se describe anteriormente, (ii) insertando el (los) ácido(s) nucleico(s) en un vector de expresión, (iii) transfectando el vector en una célula huésped que puede expresar el anticuerpo de interés y (iv) cultivando o subcultivando la célula huésped transfectada que comprende los ácidos nucleicos insertados para producir el anticuerpo de interés. Por lo tanto, los procedimientos para preparar primero la célula huésped recombinante y posteriormente cultivarla para expresar el anticuerpo pueden ser llevados a cabo en momentos muy diferentes, por personas diferentes y en diferentes lugares (por ejemplo, en diferentes países).

Composición farmacéutica

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

(i) el anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo del mismo, de acuerdo con la presente invención;

(ii) el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, o fragmentos de anticuerpo, de acuerdo con la presente invención;

(iii) el vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención; y/o

(iv) la célula que expresa el anticuerpo de acuerdo con la presente invención o que comprende el vector de acuerdo con la presente invención.

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

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

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

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

Los portadores farmacéuticamente aceptables en una composición farmacéutica pueden contener adicionalmente líquidos, tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Además, en tales composiciones pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias de ajuste del pH. Dichos portadores permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, compuestos acuosos y suspensiones, para la ingestión por parte del sujeto.

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

Se prefiere que el ingrediente activo en la composición sea una molécula de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o variantes y derivados de los mismos, en particular el ingrediente activo en la composición es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o variantes y derivados de los mismos, de acuerdo con la presente invención. Como tal, puede ser susceptible de degradación en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición se va a administrar por una vía que utiliza el tracto gastrointestinal, la composición puede contener agentes que protejan al anticuerpo contra la degradación, pero que liberen el anticuerpo una vez que se haya absorbido del tracto gastrointestinal.

Una discusión completa de los portadores farmacéuticamente aceptables está disponible en Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20a edición, ISBN: 0683306472.

Las composiciones farmacéuticas de la invención generalmente tienen un pH entre 5,5 y 8,5, en algunas modalidades esto puede estar entre 6 y 8, y en otras modalidades es aproximadamente 7. El pH se puede mantener mediante el uso de una solución amortiguadora. La composición puede ser estéril y/o libre de pirógenos. La composición puede ser isotónica con respecto a los humanos. En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la invención se suministran en recipientes herméticamente cerrados.

Dentro del alcance de la invención están las composiciones presentes en varias formas de administración; las formas incluyen, pero no se limitan a, las formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección en bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo aceitoso o acuoso, y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservadores, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para reconstituirse antes de usarla con un líquido estéril adecuado. Se entiende típicamente que un vehículo es un material que es adecuado para almacenar, transportar y/o administrar un compuesto, tal como un compuesto farmacéuticamente activo, en particular los anticuerpos de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, el vehículo puede ser un líquido fisiológicamente aceptable, que es adecuado para almacenar, transportar y/o administrar un compuesto farmacéuticamente activo, en particular los anticuerpos de acuerdo con la presente invención. Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. En una modalidad, las composiciones se adaptan para la administración a mamíferos, por ejemplo, sujetos humanos.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse mediante una gran variedad de vías que incluyen, pero no se limitan a, vía oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea, tópica, subcutánea, intranasal, intranasal, enteral, sublingual, intravaginal o rectal. También se pueden usar hiposprays para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Preferiblemente, la composición farmacéutica se puede preparar para administración oral, por ejemplo, como comprimidos, cápsulas y similares, para administración tópica, o como inyectables, por ejemplo, como soluciones o suspensiones líquidas, por lo que se prefiere particularmente que la composición farmacéutica sea un inyectable. También se prefieren las formas sólidas adecuadas para la solución en, o

suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección, por ejemplo, que la composición farmacéutica esté en forma liofilizada.

Para inyección, por ejemplo, inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el lugar de la aflicción, el ingrediente activo estará preferiblemente en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica pueden preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Se pueden incluir conservadores, estabilizantes, amortiguadores, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera. Con respecto a otro compuesto farmacéuticamente útil de acuerdo con la presente invención que se va a administrar a un individuo, ya sea un polipéptido, un péptido o una molécula de ácido nucleico, la administración es preferiblemente en una “cantidad profilácticamente efectiva” o una “cantidad terapéuticamente efectiva” (según sea el caso), siendo esto suficiente para mostrar un beneficio para el individuo. La cantidad real administrada, así como la velocidad y el tiempo de administración dependerán de la naturaleza y la gravedad de la condición que se trata. En el caso de la inyección, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar, por ejemplo, en una jeringa precargada.

La composición farmacéutica de la invención como se define anteriormente también puede administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral, que incluyen, pero no se limitan a, cápsulas, comprimidos, soluciones o suspensiones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos comúnmente utilizados incluyen lactosa y almidón de maíz. Típicamente, también se añaden agentes lubricantes, tales como el estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo, es decir, la molécula de conjugado de carga transportadora de la invención, tal como se define anteriormente, se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes.

La composición farmacéutica de la invención también puede administrarse por vía tópica, especialmente cuando el objetivo del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles mediante aplicación tópica, por ejemplo, incluyendo enfermedades de la piel o de cualquier otro tejido epitelial accesible. Las formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos. Para aplicaciones tópicas, la composición farmacéutica de la invención se puede formular en una pomada adecuada, que contiene la composición farmacéutica de la invención, particularmente sus componentes como se define anteriormente, suspendida o disuelta en uno o más vehículos. Los portadores para administración tópica incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina

blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, la composición farmacéutica de la invención se puede formular en una loción o crema adecuada. En el contexto de la presente invención, los vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

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

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

En particular, es preferible que para una dosis única, por ejemplo, una dosis diaria, semanal o mensual, preferiblemente para una dosis semanal, la cantidad de anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, en la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, no superior a 1 g, preferiblemente no superior a 500 mg, más

preferiblemente no superior a 200 mg, aún más preferiblemente no superior a 100 mg, y de manera particularmente preferible no superior a 50 mg.

Las composiciones farmacéuticas incluyen típicamente una cantidad “efectiva” de uno o más anticuerpos de la invención, es decir, una cantidad que es suficiente para tratar, mejorar, atenuar o prevenir una enfermedad o afección deseada, o para exhibir un efecto terapéutico detectable. Los efectos terapéuticos también incluyen la reducción o atenuación en la potencia patógena o síntomas físicos. La cantidad efectiva precisa para cualquier sujeto en particular dependerá de su tamaño, peso y salud, la naturaleza y el alcance de la condición, y los productos terapéuticos o combinación de productos terapéuticos seleccionados para la administración. La cantidad efectiva para una situación dada se determina mediante la experimentación de rutina y se encuentra dentro del criterio de un clínico. Para los fines de la presente invención, una dosis efectiva será generalmente de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 100 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,0075 a aproximadamente 50 mg/kg, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 5 mg/kg, del anticuerpo de la presente invención (por ejemplo, la cantidad del anticuerpo en la composición farmacéutica) en relación con el peso corporal (por ejemplo, en kg) del individuo al que se administra.

Además, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención también puede comprender un componente activo adicional, que puede ser un anticuerpo adicional o un componente, que no es un anticuerpo. El componente activo adicional es preferiblemente un inhibidor del punto de control. También se prefiere que un anticuerpo neutralizante de ZIKV, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe en la presente, se combine con un anticuerpo de unión a NS1 de ZIKV, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe en la presente, como un componente activo adicional (co-agente). Por lo tanto, la función patógena de NS1 puede bloquearse además de la neutralización de ZIKV. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede comprender uno o más de los componentes activos adicionales, por ejemplo, tal como se describen a continuación como co-agentes en el contexto de una terapia de combinación.

El anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno, de acuerdo con la presente invención, puede estar presente en la misma composición farmacéutica que el componente activo adicional o, preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno, de acuerdo con la presente invención está compuesto por una primera composición farmacéutica y el componente activo adicional está compuesto por una segunda composición farmacéutica diferente de la primera composición farmacéutica. Por consiguiente, si se contempla más de un componente activo adicional, cada componente activo adicional y el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno, de acuerdo con la presente invención, está preferiblemente

compuesto por una composición farmacéutica diferente. Dichas composiciones farmacéuticas diferentes pueden administrarse combinadas/simultáneamente, o en momentos separados o en ubicaciones separadas (por ejemplo, partes separadas del cuerpo).

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

Se prefiere una composición farmacéutica que comprenda el anticuerpo de acuerdo con gZKA190, gZKA64, gZKA230, gZKA185, gZKA78 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

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

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

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

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

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir un antimicrobiano, en particular si se envasan en un formato de dosis múltiple. Pueden comprender detergente, por ejemplo, un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Los detergentes generalmente están presentes en niveles bajos, por ejemplo, menos de 0,01%. Las composiciones también pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para dar tonicidad. Por ejemplo, una concentración de 10±2 mg/ml de NaCl es típica.

Además, las composiciones farmacéuticas pueden comprender un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o un disacárido (por ejemplo, sacarosa o trehalosa), por ejemplo, a aproximadamente 15-30 mg/ml (por ejemplo, 25 mg/ml), en particular si se liofilizan o si incluyen material que ha sido reconstituido a partir de material liofilizado. El pH de una composición para la liofilización se puede ajustar entre 5 y 8, o entre 5,5 y 7, o a aproximadamente 6,1 antes de la liofilización.

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

Tratamientos médicos, kits y usos

Tratamientos médicos

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso del anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención en (i) la prevención y/o el tratamiento de la infección por el virus del Zika; o en (ii) el diagnóstico de infección por el virus del Zika. De este modo, se prefiere el uso del anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención (y en particular sus modalidades preferidas, tal como se describe anteriormente) en (i) la prevención y/o el tratamiento de la infección por el virus del Zika, tal como se describe en la presente; o en (ii) el diagnóstico de la infección por el virus del Zika, tal como se describe en la presente.

Los métodos de diagnóstico pueden incluir poner en contacto un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con una muestra. Dichas muestras pueden aislarse de un sujeto, por ejemplo, una muestra de tejido aislada tomada de, por ejemplo, fosas nasales, cavidades sinusales, glándulas salivales, pulmón, hígado, páncreas, riñón, oído, placenta, tubo digestivo, corazón, ovarios, pituitaria, suprarrenales, tiroides, cerebro, piel o sangre, preferiblemente plasma o suero. Los métodos de diagnóstico también pueden incluir la detección de un complejo de antígeno/anticuerpo, en particular después de la puesta en contacto de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con una muestra. Tal paso de detección típicamente se lleva a cabo en el banco, es decir, sin ningún contacto con el cuerpo humano o animal. Los

expertos en la técnica conocen bien los ejemplos de métodos de detección e incluyen, por ejemplo, ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

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

Por el contrario, en entornos terapéuticos, el sujeto suele estar infectado por el virus del Zika, diagnosticado con una infección por el virus del Zika y/o muestra síntomas de infección por el virus del Zika. Es de destacar que los términos “tratamiento” y “terapia”/”terapéutico” de la infección por ZIKV incluyen la curación (completa) y la atenuación de la infección por ZIKV.

Los métodos preferidos de diagnóstico de la infección por el virus del Zika son los métodos de diagnóstico que se describen en la presente, por ejemplo, utilizando el anticuerpo neutralizante, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención y/o el anticuerpo de unión a NS1 de ZIKV, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención.

Por consiguiente, el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se usan preferiblemente para el tratamiento de la infección por el virus del Zika en sujetos diagnosticados con la infección por el virus del Zika o en sujetos que muestran síntomas de la infección por Zika.

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

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

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

Alternativamente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención también se puede administrar al espacio extraamniótico.

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

En la PEP, típicamente, la primera administración del anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la

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

También es preferible que el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se utilizan para la prevención y/o el tratamiento de la infección por el virus del Zika, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, el ácido nucleico, el vector, la célula o la composición farmacéutica se administren hasta tres meses antes de (una posible) infección por el virus del Zika, preferiblemente hasta un mes antes de (una posible) infección por el virus del Zika, más preferiblemente hasta dos semanas antes de (una posible) infección por el virus del Zika, incluso más preferiblemente hasta una semana antes de (una posible) infección por el virus del Zika, y lo más preferiblemente hasta un día antes de (una posible) infección por el virus del Zika. Dicho programa de tratamiento se refiere en particular a un entorno profiláctico.

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

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

Preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se administran en una dosis (única) de 0,005 a 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente en una dosis (única) de 0,0075 a 50 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente en una dosis (única) de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal, incluso más preferiblemente en una dosis (única) de 0,05 a 5 mg/kg de peso corporal, y de manera particularmente preferible en una dosis (única) de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal.

El anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención pueden administrarse mediante una gran variedad de vías, tal como la vía oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea, tópica, subcutánea, intranasal, enteral, sublingual, intravaginal o rectal. La administración intravenosa, la administración subcutánea o la administración intramuscular son preferibles, y la administración intravenosa o la administración subcutánea son más preferibles.

En pacientes embarazadas, el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención también puede administrarse de manera intra o extra-amniótica, por ejemplo, mediante una inyección.

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

Terapia de combinación

La administración del anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención en los métodos y usos de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo por sí solos o en combinación con un co-agente (también denominado “componente activo adicional” en la presente), que es particularmente útil para prevenir y/o tratar la infección por ZIKV.

La invención abarca la administración del anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, en donde se administran a un sujeto antes, simultánea o secuencialmente con otros regímenes terapéuticos o co-agentes útiles para tratar y/o prevenir la infección por ZIKV. Dicho anticuerpo, ácido nucleico, vector, célula o composición farmacéutica, que se administra simultáneamente con dichos co-agentes puede administrarse en la misma composición o una diferente, y por la misma vía de administración o una diferente.

Dichos otros regímenes terapéuticos o co-agentes pueden ser, por ejemplo, un inhibidor del punto de control.

Por lo tanto, en otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo neutralizante, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención, o la composición farmacéutica de

acuerdo con la presente invención se administran en combinación con un inhibidor de punto de control para los usos (médicos), tal como se describe en la presente.

Los inhibidores del punto de control preferidos se dirigen a un bloqueo de la proteína de muerte programada 1/ligando 1 de muerte programada (“PD-1/PDL-1”, por sus siglas en inglés) y/o del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (“CTLA4”, por sus siglas en inglés) y, por lo tanto, incluyen anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos anti-CTLA4. Por lo tanto, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede comprender uno o más de los componentes activos adicionales.

También se prefiere que un anticuerpo neutralizante de ZIKV, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe en la presente, se combine con un anticuerpo de unión a NS1 de ZIKV, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe en la presente, como un componente activo adicional (co-agente). Por lo tanto, la función patógena de NS1 puede bloquearse además de la neutralización de ZIKV. Por consiguiente, un anticuerpo de unión a NS1 de ZIKV, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se describe en la presente, es un componente activo adicional preferido (co-agente).

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

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

parámetros) es mayor que la suma de los efectos terapéuticos individuales observados con las terapias individuales respectivas.

Otros usos y kits

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona el uso del anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para controlar la calidad de una vacuna anti-Zika al verificar que el antígeno de dicha vacuna contiene el epítopo específico en la conformación correcta. Los antígenos preferidos comprendidos por tales como la vacuna anti-Zika que se va a verificar incluyen la proteína envolvente de ZIKV o cualquier otra molécula/complejo que comprende o consiste en (i) el dominio III de la proteína E de ZIKV (EDIII) tal como se describe anteriormente, o (ii) un epítopo de ZIKV cuaternario tal como se describe anteriormente.

Además, la presente invención también proporciona el uso del anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención en el diagnóstico de infección por el virus del Zika.

Además, también se proporciona el uso del anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para determinar si una muestra de sangre aislada (por ejemplo, sangre entera, suero y/o plasma) está infectada con el virus del Zika.

Como se describió anteriormente, los métodos de diagnóstico pueden incluir poner en contacto un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con una muestra. Dichas muestras pueden aislarse de un sujeto, por ejemplo, una muestra de tejido aislada tomada de, por ejemplo, fosas nasales, cavidades sinusales, glándulas salivales, pulmón, hígado, páncreas, riñón, oído, placenta, tubo digestivo, corazón, ovarios, pituitaria, suprarrenales, tiroides, cerebro, piel o sangre, preferiblemente suero o plasma. Los métodos de diagnóstico también pueden incluir la detección de un complejo de antígeno/anticuerpo, en particular después de la puesta en contacto de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con una muestra. Tal paso de detección típicamente se lleva a cabo en el banco, es decir, sin ningún contacto con el cuerpo humano o animal. Los expertos en la técnica conocen bien los ejemplos de métodos de detección e incluyen, por ejemplo, ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un kit de partes que comprende al menos un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, al menos un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, al menos un vector de acuerdo con la presente invención, al menos una célula de acuerdo con la presente invención, y/o al menos una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención. Además, el kit puede comprender medios para la administración del anticuerpo neutralizante, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención, o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, tal como una jeringa o un recipiente, un prospecto y/o un co-agente que se administrará tal como se describe anteriormente.

Anticuerpos que se unen específicamente a la proteína NS1 del virus del Zika

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína NS1 del virus del ZIKA (ZIKV).

La proteína NS1 (proteína no estructural 1) de ZIKV se produce de manera intracelular, se secreta y se asocia a la superficie celular y, en particular, la proteína NS1 de ZIKV se encuentra típicamente en fluidos corporales, tales como suero, saliva, orina, etc., de sujetos infectados con ZIKV. Las NS1 secretadas y asociadas a la superficie celular son altamente inmunogénicas y provocan la producción de anticuerpos. Se sabe que NS1 es un biomarcador importante para el diagnóstico temprano de la infección por ZIKV. Por consiguiente, el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención que se une específicamente a la proteína NS1 del virus del ZIKA (ZIKV), es útil por ejemplo, en el diagnóstico de la infección por ZIKV.

En general, la unión puede evaluarse mediante el ensayo ELISA estándar, como saben los expertos y como se describe anteriormente. De este modo, las afinidades relativas de la unión del anticuerpo pueden determinarse midiendo la concentración del anticuerpo (CE_{50}) requerida para lograr una unión máxima del 50% en la saturación. Preferiblemente, la CE_{50} del anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención a la proteína NS1 de ZIKV no es mayor a 50 ng/ml, preferiblemente dicha CE_{50} no es mayor a 25 ng/ml, más preferiblemente dicha CE_{50} no es mayor a 15 ng/ml, incluso más preferiblemente dicha CE_{50} no es mayor a 10 ng/ml, y lo más preferiblemente dicha CE_{50} no es mayor a 5 ng/ml, tal como, por ejemplo, aproximadamente 2 o 3 ng/ml.

Preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, que se une específicamente a la proteína NS1 del virus del ZIKA (ZIKV), no se une esencialmente a la proteína NS1 del virus del dengue (DENV). Por lo

tanto, “esencialmente no vinculante” significa que para el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, ningún valor de CE_{50} de hasta 10^2 ng/ml, preferiblemente hasta 10^3 ng/ml, más preferiblemente hasta $5*10^3$ ng/ml, incluso más preferiblemente hasta $8*10^3$ ng/ml, y lo más preferiblemente hasta 10^4 ng/ml puede determinarse en un ensayo ELISA estándar para la proteína NS1 del virus del dengue (DENV). En otras palabras, la concentración del anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, requerida para lograr una unión máxima del 50% en la saturación (CE_{50}) a la proteína NS1 del virus del Dengue (DENV) en un ensayo ELISA estándar es típicamente más de 10^2ng/ml, preferiblemente más de 10^3 ng/ml, más preferiblemente más de $5*10^3$ ng/ml, incluso más preferiblemente más de $8*10^3$ ng/ml, y lo más preferiblemente más 10^4 ng/ml.

También se prefiere que el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, que se une específicamente a la proteína NS1 del virus del ZIKA (ZIKV), no se una esencialmente a la proteína NS1 del virus de la fiebre amarilla (YFV), la proteína NS1 del virus del Nilo Occidental (WNV), la proteína NS1 del virus de la encefalitis japonesa (JEV) y/o la proteína NS1 del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV). Por lo tanto, “esencialmente no vinculante” significa que para el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, ningún valor de CE_{50} de hasta 10^2 ng/ml, preferiblemente hasta 10^3 ng/ml, más preferiblemente hasta $5*10^3$ ng/ml, incluso más preferiblemente hasta $8*10^3$ ng/ml, y lo más preferiblemente hasta 10^4 ng/ml puede determinarse en un ensayo ELISA estándar para la proteína NS1 del virus de la fiebre amarilla (YFV), la proteína NS1 del virus del Nilo occidental (WNV), la proteína NS1 del virus de la encefalitis japonesa (JEV) y/o la proteína NS1 del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV). En otras palabras, la concentración del anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, requerida para lograr una unión máxima del 50% en la saturación (CE_{50}) a la proteína NS1 del virus de la fiebre amarilla (YFV), la proteína NS1 del virus del Nilo occidental (WNV), la proteína NS1 del virus de la encefalitis japonesa (JEV) y/o la proteína NS1 del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) en un ensayo ELISA estándar es típicamente más de 10^2ng/ml, preferiblemente más de 10^3 ng/ml, más preferiblemente más de $5*10^3$ ng/ml, incluso más preferiblemente más de $8*10^3$ ng/ml, y lo más preferiblemente más 10^4 ng/ml.

Preferiblemente, el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, que se une específicamente a la proteína NS1 del virus del ZIKA (ZIKV), es un anticuerpo humano. También se prefiere que el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, que se une específicamente a la proteína NS1 del virus del ZIKA (ZIKV), sea un anticuerpo monoclonal, preferiblemente un anticuerpo monoclonal humano. Además, también se prefiere que el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente

invención, que se une específicamente a la proteína NS1 del virus del ZIKA (ZIKV), sea un anticuerpo recombinante.

Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína NS1 del virus del ZIKA (ZIKV), comprende un resto Fc. Más preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína NS1 del virus del ZIKA (ZIKV), comprende una mutación CH2 L4A, una mutación CH2 L5A, o ambas. Para una descripción detallada del anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un resto Fc y/o comprende una mutación CH2 L4A, una mutación CH2 L5A, o ambas, se refiere a la descripción detallada del resto Fc y de la mutación CH2 L4A, la mutación CH2 L5A, o ambas en el contexto de los anticuerpos neutralizantes de acuerdo con la presente invención como se indica anteriormente. La correspondiente descripción detallada, así como las modalidades preferidas, se aplican también en consecuencia para el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína NS1 del virus del ZIKA (ZIKV).

Sin embargo, también se prefiere que el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína NS1 del virus del ZIKA (ZIKV), no comprenda un resto Fc. En particular, se prefiere que el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína NS1 del virus del ZIKA (ZIKV), sea un anticuerpo purificado, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab, Fab', F(ab')2, Fv o scFv. Incluso más preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína NS1 del virus del ZIKA (ZIKV), se etiqueta tal como se describe aquí, por ejemplo, biotinilado, tal como un fragmento Fab, Fab' o F(ab')2 biotinilado.

Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína NS1 del virus del ZIKA (ZIKV), se une al sitio antigénico S1 y/o al sitio antigénico S2 de la proteína NS1 del virus del Zika. Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que los anticuerpos anti-NS1 de ZIKV que se unen al sitio antigénico S1 y/o al sitio antigénico S2 de la proteína NS1 de ZIKV no presentan una reactividad cruzada con la proteína NS1 del virus del dengue (NS1 de DENV). Los anticuerpos anti-NS1 de ZIKV, que no se unen al sitio antigénico S1 ni al sitio antigénico S2 de la proteína NS1 de ZIKV, por el contrario, típicamente presentan una reactividad cruzada con la proteína NS1 de DENV. Este sorprendente hallazgo indica que los sitios antigénicos S1 y S2 en la proteína NS1 de ZIKV se pueden usar para distinguir los

anticuerpos específicos de la proteína NS1 de ZIKV de los anticuerpos de reacción cruzada con la proteína NS1 de DENV.

Más preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a la proteína NS1 del virus del ZIKA (ZIKV), se une al sitio antigénico S2 de la proteína NS1 del virus del Zika. El sitio antigénico S2 está altamente conservado en múltiples linajes de ZIKV, pero no es homólogo en secuencia y estructura con el sitio correspondiente en NS1 de otros flavivirus, lo que proporciona una especificidad única para ZIKV.

Los sitios antigénicos S1 y S2 de la proteína NS1 de ZIKV fueron identificados por los presentes inventores, tal como se describe en el Ejemplo 3, Figura 6. Un experto en la materia puede identificar fácilmente si un anticuerpo se une al sitio antigénico S1 y/o S2 mediante el uso de estudios de competencia cruzada, por ejemplo, como se describe a continuación o en el Ejemplo 3, en donde el anticuerpo específico para S1 de acuerdo con gZKA15 (SEQ ID NOs: 91-99) y/o el anticuerpo específico de S2 de acuerdo con gZKA35 (SEQ ID NOs: 127-135) se puede utilizar como “segundo anticuerpo”. En dicho ensayo de competencia, la presencia de cualquier competición (total o parcial) con gZKA15 y/o gZKA35 indica que el anticuerpo a analizar se une al sitio antigénico S1 y/o al sitio antigénico S2, respectivamente.

En general, para un ensayo competitivo, se pueden utilizar sistemas disponibles para la caracterización de la unión proteína-proteína, como, por ejemplo, el “Sistema Octet® RED96” provisto por FortéBio, en particular de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

En un ensayo de competencia ejemplar, por ejemplo, utilizando el “Sistema Octet® RED96” proporcionado por FortéBio, la proteína ZIKV-NS1 (por ejemplo, diluida a 2,5 µg/ml en PBS) puede inmovilizarse (por ejemplo, durante 7-9 minutos) sobre la superficie de un chip sensor recubierto con aminopropilsilano (APS). Los biosensores recubiertos pueden colocarse en pocillos que contienen una solución amortiguadora de bloqueo (por ejemplo, BSA al 0,1% en PBS; por ejemplo, durante 6 minutos) para bloquear los sitios de unión del biosensor libres. Los biosensores recubiertos se pueden incubar (por ejemplo, durante 8 minutos) con el anticuerpo/anticuerpos a analizar (por ejemplo, diluidos en solución amortiguadora de bloqueo, por ejemplo, a 10 µg/ml). Después de la unión de los anticuerpos que se analizaron (paso 1), los biosensores se trasladaron a los pocillos que contenían los “segundos anticuerpos”, por ejemplo, gZKA15 y/o gZKA35 (por ejemplo, durante 8 minutos) (paso 2). Por lo tanto, la competencia, la competencia parcial o la no competencia pueden determinarse en el paso 2, dependiendo de si no se detecta asociación (competencia), asociación baja (competencia parcial) o asociación (fuerte) (no competencia).

Como se describió anteriormente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende preferiblemente (al menos) tres regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) en una cadena pesada y (al menos)

tres CDRs en una cadena ligera. En general, las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) son las regiones hipervariables presentes en los dominios variables de la cadena pesada y los dominios variables de la cadena ligera. Típicamente, las CDRs de una cadena pesada y la cadena ligera conectada de un anticuerpo forman en conjunto el receptor de antígeno. Por lo general, las tres CDRs (CDR1, CDR2 y CDR3) están dispuestas de forma no consecutiva en el dominio variable. Dado que los receptores de antígenos están compuestos típicamente de dos dominios variables (en dos cadenas polipeptídicas diferentes, es decir, cadenas pesadas y ligeras), hay seis CDRs para cada receptor de antígeno (cadena pesada: CDRH1, CDRH2 y CDRH3; cadena ligera: CDRL1, CDRL2 y CDRL3). Una única molécula de anticuerpo generalmente tiene dos receptores de antígeno y, por lo tanto, contiene doce CDRs. Las CDRs en la cadena pesada y/o ligera pueden estar separadas por regiones marco, por lo que una región marco ("FR", por sus siglas en inglés) es una región en el dominio variable que es menos "variable" que la CDR. Por ejemplo, una cadena (o cada cadena, respectivamente) puede estar compuesta por cuatro regiones marco, separadas por tres CDRs.

Se determinaron las secuencias de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de cinco anticuerpos ejemplares de la invención, que comprenden tres CDRs diferentes en la cadena pesada y tres CDRs diferentes en la cadena ligera. La posición de los aminoácidos CDR se define de acuerdo con el sistema de numeración IMGT (IMGT: http://www.imgt.org/; cf. Lefranc, M.-P. et al. (2009) Nucleic Acids Res. 37, D1006-D1012).

La **Tabla 4** muestra SEQ ID NOs de las secuencias de aminoácidos de las CDRs de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y de la región variable de la cadena pesada (denominada "V_H") de anticuerpos ejemplares de acuerdo con la presente invención:

Nombre del anticuerpo	**CDRH1**	**CDRH2**	**CDRH3**	**V_H**
ZKA15	91	92	93	98
ZKA25	109	110	111	116
ZKA35	127	128	129	134
ZKA10	153	154	155	156
ZKA18	157	158	159	160
ZKA28	161	162	163	164
ZKA29	165	166	167	168
ZKA33	169	170	171	172
ZKA39	173	174	175	176
ZKA43	177	178	179	180
ZKA44	181	182	183	184

Nombre del anticuerpo	CDRH1	CDRH2	CDRH3	V_H
ZKA46	185	186	187	188
ZKA50	189	190	191	192
ZKA54	193	194	195	196
ZKB18	197	198	199	200
ZKB20	201	202	203	204
ZKB21	205	206	207	208
ZKB23	209	210	211	212
ZKC29	213	214	215	216
ZKC31	217	218	219	220
ZKC32	221	222	223	224
ZKC33	225	226	227	228
ZKC34	229	230	231	232
ZKD25	233	234	235	236

La **Tabla 5** a continuación muestra SEQ ID NOs de las secuencias de aminoácidos de las CDRs de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3) y de la región variable de la cadena ligera (denominada "V_L") de anticuerpos ejemplares de acuerdo con la presente invención:

Nombre del anticuerpo	CDRL1	CDRL2	CDRL2 larga	CDRL3	V_L
ZKA15	94	95	96	97	99
ZKA25	112	113	114	115	116
ZKA35	130	131	132	133	135

Por lo tanto, se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprenda secuencias de aminoácidos que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%. al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con al menos una de las secuencias de CDR, la secuencia V_H y/o la secuencia V_L que se muestran en la Tabla 4 y/o en la Tabla 5.

Por lo tanto, se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprenda secuencias de aminoácidos que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%. al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos

99% de identidad con al menos una de las secuencias de CDR, la secuencia V_H y/o la secuencia V_L que se muestran en la Tabla 4 y/o en la Tabla 5.

Es preferible que el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3, y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos un CDRL3, en donde al menos una CDR, preferiblemente al menos una CDRH3 de cadena pesada, comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 93, 111, 129, 155, 159, 163, 167, 171, 175, 179, 183, 187, 191, 195, 199, 203, 207, 211, 215, 219, 223, 227, 231 y 235; o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3, y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos un CDRL3, en donde al menos una CDR, preferiblemente al menos una CDRH3 de cadena pesada, comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 93, 111 y 129, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia. Por lo tanto, se prefiere que al menos una CDR, preferiblemente al menos una CDRH3 de cadena pesada, comprenda o consista en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 93, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia. También se prefiere que al menos una CDR, preferiblemente al menos una CDRH3 de cadena pesada, comprenda o consista en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 111, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia. Además, también se prefiere que al menos una CDR, preferiblemente al menos una CDRH3 de cadena pesada, comprenda o consista en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 129, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos

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

Lo más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3, y una cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos un CDRL3, en donde al menos una CDR, preferiblemente al menos una CDRH3 de cadena pesada, comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 129, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

(i) al menos una CDRH1 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 91, 109, 127, 153, 157, 161, 165, 169, 173, 177, 181, 185, 189, 193, 197, 201, 205, 209, 213, 217, 221, 225, 229 y 233; o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) al menos una CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 92, 110, 128, 154, 158, 162, 166, 170, 174, 178, 182, 186, 190, 194, 198, 202, 206, 210, 214, 218, 222, 226, 230 y 234; o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) al menos una CDRH3 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 93, 111, 129, 155, 159, 163, 167, 171, 175, 179, 183, 187, 191, 195, 199, 203, 207, 211, 215, 219, 223, 227, 231 y 235; o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

(i) al menos una CDRH1 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 91, 109 y 127, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) al menos una CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 92, 110 y 128, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) al menos una CDRH3 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 93, 111 y 129, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

(i) al menos una CDRH1 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 91, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

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

(iii) al menos una CDRH3 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NOs: 93, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

También se prefiere incluso más que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprenda una cadena pesada que comprende al menos una CDRH1, al menos una CDRH2 y al menos una CDRH3, y una

cadena ligera que comprende al menos una CDRL1, al menos una CDRL2 y al menos un CDRL3, en donde

(i) al menos una CDRH1 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 109, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) al menos una CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 110, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) al menos una CDRH3 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NOs: 111, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

(i) al menos una CDRH1 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 127, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) al menos una CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 128, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) al menos una CDRH3 de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NOs: 129, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

(i) al menos una CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 94, 112 y 130, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) al menos una CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 95, 96, 113, 114, 131 y 132, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) al menos una CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs 97, 115 y 133, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

(i) al menos una CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 94, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) al menos una CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 95 o 96, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) al menos una CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 97, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos

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

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

(i) al menos una CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 112, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) al menos una CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 113 o 114, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) al menos una CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 115, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

(i) al menos una CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 130, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia;

(ii) al menos una CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 131 o 132, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o

(iii) al menos una CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 133, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Lo más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3 (i) de acuerdo con SEQ ID NOs: 91-93; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 109-111; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 127-129; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 153-155; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (v) de acuerdo con SEQ ID NOs: 157-159; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (vi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 161-163; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (vii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 165-167; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (viii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 169-171; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ix) de acuerdo con SEQ ID NOs: 173-175; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%,

al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (x) de acuerdo con SEQ ID NOs: 177-179; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 181-183; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 185-187; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xiii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 189-191; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xiv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 193-195; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 197-199; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xvi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 201-203; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xvii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 205-207; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xviii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 209-211; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xix) de acuerdo con SEQ ID NOs: 213-215; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xx) de acuerdo con

SEQ ID NOs: 217-219; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 221-223; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 225-227; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (xxiii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 229-231; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (xxiv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 233-235; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

De manera particularmente preferible, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con SEQ ID NOs: 91-95 y 97; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 91-94 y 96-97; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 109-113 y 115; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iv) de acuerdo con SEQ ID NOs: 109-112 y 114-115; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (v) de acuerdo con SEQ ID NOs: 127-131 y 133; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al

menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (vi) de acuerdo con SEQ ID NOs: 127-130 y 132-133; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Lo más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con SEQ ID NOs: 127-131 y 133; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (ii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 127-130 y 132-133; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

También se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprenda una región variable de la cadena pesada (V_H) y, opcionalmente, una región variable de la cadena ligera (V_L), en donde la región variable de la cadena pesada (V_H) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 98, 116, 134, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 216, 220, 224, 228, 232 y 236; o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

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

SEQ ID NO: 116, o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de acuerdo con SEQ ID NO: 117 o una variante de la secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (iii) una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) de acuerdo con SEQ ID NO: 134, o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de acuerdo con SEQ ID NO: 135, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Lo más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (V_H) de acuerdo con SEQ ID NO: 134, o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de acuerdo con SEQ ID NO: 135, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención es gZKA15, gZKA25, o gZKA35; más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, es gZKA25 o gZKA35; incluso más preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es gZKA35.

Los presentes inventores han aislado anticuerpos monoclonales (mAb) de acuerdo con la presente invención, denominados en la presente como ZKA15, ZKA25 y ZKA35 (véanse las Tablas 4 y 5, Ejemplo 1). Con base en esos anticuerpos, en particular en los genes V_H y V_L de esos anticuerpos, los términos “gZKA15”, “gZKA25” y “gZKA35”, tal como se usan en la presente, se refieren a los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, “genéricos” respectivos.

Específicamente, “gZKA15” se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene una secuencia de aminoácidos de CDRH1 de acuerdo con SEQ ID NO: 91, una secuencia de aminoácidos de CDRH2 de acuerdo con SEQ ID NO: 92, una secuencia de aminoácidos de CDRH3 de acuerdo con SEQ ID NO: 93, una secuencia de aminoácidos de CDRL1 de acuerdo con SEQ ID NO: 94, una secuencia de aminoácidos de CDRL2 de acuerdo con SEQ ID NO: 95 o 96, y una secuencia de aminoácidos de CDRL3 de acuerdo con SEQ ID NO: 97. La región variable de la cadena pesada (V_H) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 98 y la región variable de la cadena ligera (V_L) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 99.

“gZKA25” se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene una secuencia de aminoácidos de CDRH1 de acuerdo con SEQ ID NO: 109, una secuencia de aminoácidos de CDRH2 de acuerdo con SEQ ID NO: 110, una secuencia de aminoácidos de CDRH3 de acuerdo con SEQ ID NO: 111, una secuencia de aminoácidos de CDRL1 de acuerdo con SEQ ID NO: 112, una secuencia de aminoácidos de CDRL2 de acuerdo con SEQ ID NO: 113 o 114, y una secuencia de aminoácidos de CDRL3 de acuerdo con SEQ ID NO: 115. La región variable de la cadena pesada (V_H) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 116 y la región variable de la cadena ligera (V_L) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 117.

“gZKA35” se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene una secuencia de aminoácidos de CDRH1 de acuerdo con SEQ ID NO: 127, una secuencia de aminoácidos de CDRH2 de acuerdo con SEQ ID NO: 128, una secuencia de aminoácidos de CDRH3 de acuerdo con SEQ ID NO: 129, una secuencia de aminoácidos de CDRL1 de acuerdo con SEQ ID NO: 130, una secuencia de aminoácidos de CDRL2 de acuerdo con SEQ ID NO: 131 o 132, y una secuencia de aminoácidos de CDRL3 de acuerdo con SEQ ID NO: 133. La región variable de la cadena pesada (V_H) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 134 y la región variable de la cadena ligera (V_L) tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 135.

La descripción detallada anterior que se refiere a la “producción de anticuerpos” (sección anterior “producción de anticuerpos”) y las “características adicionales opcionales de los anticuerpos” (sección anterior “características adicionales opcionales de los anticuerpos”) se aplica a todos los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tal como se describe en la presente solicitud, es decir, esas secciones se aplican no sólo a los anticuerpos neutralizantes, y a los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de acuerdo con la

presente invención, sino también a los anticuerpos de unión a la proteína NS1, y a los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de acuerdo con la presente invención.

En particular, se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención esté etiquetado, por ejemplo, biotinilado.

Preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención está biotinilado.

También se prefiere que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, esté conjugado con una enzima, tal como la peroxidasa de rábano picante ("HRP", por sus siglas en inglés). La conjugación de anticuerpos con HRP se describe, por ejemplo, en Wisdom GB. Conjugation of antibodies to horseradish peroxidase. Methods Mol Biol. 2005;295:127-30, o en Antibodies – a laboratory manual. Editado por Edward A. Greenfield, Segunda edición 2012, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN: 9781936113811.

Por ejemplo, los anticuerpos de la invención, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se pueden acoplar a una etiqueta detectable, por ejemplo para proporcionar mensurabilidad, por ejemplo, para la cuantificación o para facilitar la obtención de imágenes. Los anticuerpos etiquetados pueden emplearse en una amplia variedad de ensayos, en particular en inmunoensayos, empleando una amplia variedad de etiquetas. Las etiquetas preferidas incluyen radionúclidos, enzimas, coenzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, cromógenos, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, complejos de grupos protésicos, radicales libres, partículas, colorantes (por ejemplo, colorantes fluorescentes, colorantes tándem) y similares. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina, la β-galactosidasa o la acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente es el luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen 125I, 131I, 35S o 3H. Dichos reactivos etiquetados pueden usarse en diversos ensayos bien conocidos, tales como radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo, ELISA, inmunoensayos fluorescentes, y similares, preferiblemente en ELISA. Los anticuerpos etiqeutados de acuerdo con la presente invención se pueden usar de etse modo en tales ensayos, por ejemplo, como se describe en US 3,766,162; US 3,791,932; US 3,817,837 y US 4,233,402.

Las etiquetas preferidas incluyen (i) enzimas tal como se describe anteriormente, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP) o fosfatasa alcalina, en particular en el ensayo

de bloqueo de unión, ensayo de Western Blot, ELISA e inmunohistoquímica; (ii) complejos de grupos protésicos, tal como se describe anteriormente, por ejemplo, estreptavidina/biotina y avidina/biotina, en particular en ELISA e inmunohistoquímica; (iii) fluorescentes, tal como se describe anteriormente, tales como colorantes fluorescentes y proteínas fluorescentes (por ejemplo, proteína verde fluorescente mejorada ("EGFP", por sus siglas en inglés); TagBFP, Turquesa (Turquoise), Venus, KO2, Cereza (Cherry), Manzana (Apple), Kate2), en particular en inmunofluorescencia y citometría de flujo ; y (iv) colorantes tándem en citometría de flujo.

Preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, está biotinilado. La biotinilación es rápida, específica y es poco probable que perturbe la función natural de la molécula debido al pequeño tamaño de la biotina (PM = 244,31 g/mol). La biotina se une a la estreptavidina y la avidina con una afinidad extremadamente alta, una tasa de activación rápida y una especificidad alta. La unión de la biotina a la estreptavidina y la avidina es resistente a los extremos de calor, pH y proteólisis, lo que hace posible la captura de moléculas biotiniladas en una amplia variedad de entornos. El anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención puede ser biotinilado químicamente o enzimáticamente. La biotinilación química utiliza varias químicas de conjugación para producir una biotinilación no específica de las aminas (por ejemplo, el acoplamiento con N-hidroxisuccinimida (NHS) proporciona la biotinilación de cualquier amina primaria en el anticuerpo, véase a continuación). La biotinilación enzimática da como resultado la biotinilación de una lisina específica dentro de una secuencia determinada mediante el uso de una biotina ligasa bacteriana.

Además, un segundo anticuerpo, o fragmento de anticuerpo del mismo, también puede usarse como etiqueta. En este caso, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, se conjuga con un segundo anticuerpo, o fragmento de anticuerpo del mismo, para formar un heteroconjugado de anticuerpo tal como se describe, por ejemplo, en US 4,676,980. En este caso, el segundo anticuerpo puede etiquetarse opcionalmente tal como se describe en la presente.

Los métodos para acoplar anticuerpos a etiquetas son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el anticuerpo o en el fragmento de unión a antígeno del mismo, la cadena lateral de lisina, que termina en una amina primaria ($-NH_2$), se puede usar para enlazar etiquetas covalentemente al anticuerpo o en el fragmento de unión a antígeno del mismo. En la literatura se describen muchos procedimientos de etiquetado de variantes. Por ejemplo, el enfoque de etiquetado puede seleccionarse del grupo que consiste en ésteres de NHS, reactivos heterobifuncionales, carbodiimidas y peryodato de sodio.

Los ésteres de NHS se pueden usar en particular en el caso de etiquetas de colorantes fluorescentes. Se puede comprar una etiqueta de tinte fluorescente en una forma activada de la etiqueta con un éster NHS incorporado (también llamado "éster de

succinimidilo”). El colorante activado puede reaccionar en condiciones adecuadas con el anticuerpo o con el fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, a través de un grupo de lisina). El exceso de colorante reactivo se puede eliminar (por ejemplo, mediante cromatografía en columna) antes de que el anticuerpo etiquetado o el fragmento de unión a antígeno del mismo se pueda usar en un inmunoensayo.

Los reactivos heterobifuncionales se pueden usar en particular si el marcador es una molécula de proteína (por ejemplo, HRP, fosfatasa alcalina o ficoeritrina). En este caso, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo y la etiqueta pueden tener múltiples aminas. En esta situación, algunas de las lisinas en una molécula (por ejemplo, en el anticuerpo o en su fragmento de unión al antígeno) pueden modificarse para crear un nuevo grupo reactivo (X) y las lisinas en la etiqueta para crear otro grupo reactivo (Y) (o viceversa). A continuación, se utiliza un “reactivo heterobifuncional” para introducir los grupos Y, que posteriormente reaccionan con los grupos X cuando el anticuerpo y el marcador se mezclan, creando así conjugados heterodiméricos.

Las carbodiimidas, como la N-(3-Dimetilaminopropil)-N’-etilcarbodiimida (EDC), se pueden usar en particular para crear enlaces covalentes entre las moléculas que contienen amina y carboxilo. Las carbodiimidas activan los grupos carboxilo, y el producto intermedio activado es atacado por una amina (por ejemplo, proporcionada por un residuo de lisina en el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo). Las carbodiimidas se pueden usar en particular para conjugar anticuerpos con partículas carboxiladas (por ejemplo, partículas de látex, esferas magnéticas), y con otras superficies carboxiladas, tales como placas de micropocillos o superficies de chips. Las carbodiimidas también pueden usarse para unir etiquetas de colorantes o proteínas a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

El peryodato sódico se puede usar en particular para el etiquetado con peroxidasa de rábano picante (HRP). El peryodato activa las cadenas de carbohidratos en la molécula de HRP para crear grupos aldehído, que son capaces de reaccionar con lisinas en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Dado que la HRP en sí misma tiene muy pocas lisinas, es relativamente fácil crear conjugados de anticuerpo-HRP sin una polimerización de HRP significativa.

Opcionalmente, se pueden usar enlazadores entre las etiquetas y los anticuerpos de la invención, por ejemplo, como se describe en US 4,831,175. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden etiquetarse directamente con yodo radiactivo, indio, itrio u otra partícula radiactiva conocida en la técnica, por ejemplo, como se describe en US 5,595,721.

Por consiguiente, la presente invención también proporciona un complejo que comprende

(i) el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención; y

(ii) una etiqueta tal como se describe anteriormente.

Por consiguiente, dicho complejo es preferiblemente una etiqueta conjugada con el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, la etiqueta y el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención están unidos covalentemente.

Por ejemplo, el complejo de acuerdo con la presente invención puede ser una proteína de fusión que comprende (i) el anticuerpo de acuerdo con la presente invención y (ii) una etiqueta, que es un péptido o una proteína, tal como un péptido o proteína fluorescente, por ejemplo, EGFP.

En otro aspecto, la presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, tal como se describe anteriormente, o el complejo de acuerdo con la presente invención, tal como se describe anteriormente, en particular si el complejo de acuerdo con la presente invención es una proteína de fusión, tal como se describe anteriormente.

Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico y/o polinucleótidos incluyen, por ejemplo, un polinucleótido recombinante, un vector, un oligonucleótido, una molécula de ARN tal como un ARNr, un ARNm, un miARN, un ARNip o un ARNt, o una molécula de ADN, tal como un ADNc.

Se prefieren las secuencias de ácido nucleico que codifican parte o la totalidad de las cadenas ligeras y pesadas, así como las CDRs de los anticuerpos de la presente invención. Preferiblemente, en la presente se proporcionan, por lo tanto, secuencias de ácido nucleico que codifican parte o la totalidad de las cadenas ligeras y pesadas, en particular secuencias V_H y V_L y CDRs de los anticuerpos ejemplares de la invención. Las Tablas 4 y 5 proporcionan los números de identificación de secuencias para las secuencias de aminoácidos de las CDRs, V_H y V_L de los anticuerpos ejemplares de acuerdo con la presente invención.

La Tabla 6 a continuación proporciona los números de identificación de secuencias para secuencias de ácido nucleico ejemplares que codifican las CDRs, V_H y V_L de anticuerpos ejemplares de acuerdo con la presente invención. Debido a la redundancia del código genético, la presente invención también comprende variantes de secuencia de estas secuencias de ácido nucleico y, en particular, dichas variantes de secuencia, que codifican las mismas secuencias de aminoácidos.

Una molécula de ácido nucleico es una molécula que comprende, preferiblemente que consiste en componentes de ácido nucleico. El término molécula de ácido nucleico se refiere preferiblemente a moléculas de ADN o ARN. En particular, se utiliza como sinónimo del

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

La **Tabla 6** muestra ejemplos de secuencias de ácido nucleico de las CDRs, así como la región variable de la cadena pesada (V_H) y la región variable de la cadena ligera (V_L) de tres anticuerpos ejemplares de acuerdo con la presente invención (“ZKA15”, “ZKA25”, “ZKA35”):

ZKA15	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de ácido nucleico**
CDRH1	100	**ggtggcttcatcaatagttactac**
CDRH2	101	**atctataaaagtgggagcacc**
CDRH3	102	**gcgagagatccctacggtgactacgttaaggcttttgatatt**
CDRL1	103	**cagagcctcctgcatagtaatggatacaactat**
CDRL2	104	**ttgggttct**
CDRL2 larga	105	ctgatctat**ttgggttct**aatcgggcc
CDRL3	106	**atgcaagctctacaaactgtcact**
V_H	107	caggtgcagctgcaggagtcggggccaggactggtgaagccttcggagaccctgtcc ctcacctgcactgtctcc**ggtggcttcatcaatagttactac**tggagctggatccggca gcccgccgggaagggactggagtggattgggcgt**atctataaaagtgggagcacc** aactacaacccctccctcaagagtcgagtcaccatgtcactagacacgtccaagtacc agttctccctgaagctgaggtctgtgaccgccgctgacacggccgtgtattactgt**gcga gagatccctacggtgactacgttaaggcttttgatatt**ttggggccaagggacaatgg tcaccgtctcttcag

V_L	108	gatattgtgatgactcagtctccactctccctgcccgtcacccctggagagccggcctcc atctcctgcaggtctagt**cagagcctcctgcatagtaatggatacaactat**ttgaattg gtacctgcagaagccagggcagtctccacagctcctgatctat**ttgggttct**aatcggg cctccggggtccctgacaggttcagtggcagtggatcaggcacagattttacactgaaa atcagcagagtggaggctgaggatgttggggtttattactgc**atgcaagctctacaaac tgtcact**ttcggccctgggaccaaagtggatatcaaac
ZKA25	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de ácido nucleico**
CDRH1	118	**ggattcacctttagaagtcattgg**
CDRH2	119	**ataaaggaagatggatatgagaaa**
CDRH3	120	**gcgagagatttgagggtatatagtgggagaggtttcgacccc**
CDRL1	121	**aaattgggggataaatat**
CDRL2	122	**caagatagc**
CDRL2 larga	123	gtcatctat**caagatagc**aagcggccc
CDRL3	124	**caggcgtgggacagcagcactgtggta**
V_H	125	gaggtgcagttggtggagtctgggggaggcttggtccggcctgggggtccctgagact ctcctgtgcagcctct**ggattcacctttagaagtcattgg**atgagttgggtccgccagg ctccagggaaggggctggagtgggtggccaac**ataaaggaagatggatatgagaa a**tactatgtggactctgtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaact cactgtatctgcaaatgaagagcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgt**gc gagagatttgagggtatatagtgggagaggtttcgacccc**tggggccagggaac cctggtcaccgtctcctcag
V_L	126	tcctatgagctgactcagccaccctcactgtccgtgtccccaggacagacagccagcat cacctgctctggagat**aaattgggggataaatat**gcttgctggtatcagcagaagcca ggccagtcccctgtgttggtcatctat**caagatagc**aagcggccctcagggatccctgc gcgattctctggctccaactctgggaacacagccactctgaccatcagcgggacccag gctatggatgaggctgactattactgt**caggcgtgggacagcagcactgtggta**ttcg gtggagggaccaagctgaccgtcctag

ZKA35	SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
CDRH1	136	**ggtggctccatcagcactggtggttactac**
CDRH2	137	**atctattacagtgggaacacc**
CDRH3	138	**gcgaaaggaggagggagggagcgacccttttgactac**
CDRL1	139	**agctccaacatcggaagaaattat**
CDRL2	140	**aggaataat**
CDRL2 larga	141	ctcatctat**aggaataat**cagcggccc
CDRL3	142	**gtagcatgggatgacagccggagtggttttgtggta**
V_H	143	caggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtcc ctcacctgcactgtctct**ggtggctccatcagcactggtggttactac**tggagctggat ccgccagcacccagggaagggcctggagtggattggttac**atctattacagtgggaa cacc**tactacaacccgtccctcaagagtcgagttaccatatcagttgacacctctaaga agcagttctccctgaagctgagctctgtgactgccgcggacacggccgtgtattactgt**g cgaaaggaggagggagggagcgacccttttgactac**tggggccagggaaccctg gtcaccgtctcctcag
V_L	144	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcacca tctcttgttctggaagc**agctccaacatcggaagaaattat**gtagactggtaccagca actcccaggaacggcccccaaactcctcatctat**aggaataat**cagcggccctcagg ggtccctgagcgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagtgg gctccggtccgaggatgaggctgattattactgt**gtagcatgggatgacagccggag tggttttgtggta**ttcggcggagggaccaaggtgaccgtcctag

Preferiblemente, la secuencia de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NOs: 100-108, 118-126 y 136-144.

También se prefiere que las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención incluyan secuencias de ácido nucleico que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con el ácido nucleico que

codifica una CDR, una secuencia V_H y/o una secuencia V_L utilizada en un anticuerpo (ejemplar) de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, con las secuencias que se muestran en la Tabla 6.

En general, la molécula de ácido nucleico puede manipularse para insertar, eliminar o alterar ciertas secuencias de ácido nucleico. Los cambios de dicha manipulación incluyen, pero no se limitan a, cambios para introducir sitios de restricción, para modificar el uso del codón, para añadir u optimizar las secuencias reguladoras de la transcripción y/o la traducción, etc. También es posible cambiar el ácido nucleico para alterar los aminoácidos codificados. Por ejemplo, puede ser útil introducir una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Dichas mutaciones puntuales pueden modificar las funciones efectoras, la afinidad de unión a antígeno, las modificaciones postraduccionales, la inmunogenicidad, etc., pueden introducir aminoácidos para la unión de grupos covalentes (por ejemplo, etiquetas) o pueden introducir etiquetas (por ejemplo, para propósitos de purificación). Las mutaciones se pueden introducir en sitios específicos o se pueden introducir aleatoriamente, seguido de una selección (por ejemplo, evolución molecular). Por ejemplo, uno o más ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las regiones CDR, una secuencia V_H y/o una secuencia V_L de un anticuerpo (ejemplar) de la invención pueden mutarse de manera aleatoria o direccional para introducir diferentes propiedades en los aminoácidos codificados. Dichos cambios pueden ser el resultado de un proceso iterativo en el que los cambios iniciales se retienen y se introducen nuevos cambios en otras posiciones de nucleótidos. Además, los cambios logrados en pasos independientes se pueden combinar. Las diferentes propiedades introducidas en los aminoácidos codificados pueden incluir, pero no se limitan a, afinidad mejorada.

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

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

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

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona células que expresan el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención; y/o que comprenden el vector de acuerdo con la presente invención.

Los ejemplos de tales células incluyen, pero no se limitan a, células eucariotas, por ejemplo, células de levadura, células animales o células vegetales. Preferiblemente, las células son células de mamífero, más preferiblemente una línea celular de mamífero. Los ejemplos preferidos incluyen células humanas, células de ovario de hámster chino (“CHO”, por sus siglas en inglés), células HEK293T, células PER.C6, células NS0, células hepáticas humanas, células de mieloma o células de hibridoma.

En particular, la célula puede transfectarse con un vector de acuerdo con la presente invención, preferiblemente con un vector de expresión. El término “transfección” se refiere a la introducción de moléculas de ácido nucleico, tales como las moléculas de ADN o ARN (por ejemplo, ARNm), en células, preferiblemente en células eucariotas. En el contexto de la presente invención, el término “transfección” abarca cualquier método conocido por un experto en la técnica para introducir moléculas de ácido nucleico en células, preferiblemente en células eucariotas, tal como en células de mamíferos. Tales métodos abarcan, por ejemplo, la electroporación, la lipofección, por ejemplo, basada en lípidos y/o liposomas catiónicos, precipitación con fosfato de calcio, transfección basada en nanopartículas, transfección basada en virus o transfección basada en polímeros catiónicos, tales como DEAE-dextrano o polietilenimina, etc. Preferiblemente, la introducción no es viral.

Además, las células de la presente invención pueden transfectarse de manera estable o transitoria con el vector de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, para expresar el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente

invención. Preferiblemente, las células se transfectan de manera estable con el vector de acuerdo con la presente invención que codifica el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención. Alternativamente, también se prefiere que las células se transfecten de manera transitoria con el vector de acuerdo con la presente invención que codifica el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona una composición que comprende el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención; el complejo de acuerdo con la presente invención, tal como se describe anteriormente; la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, tal como se describe anteriormente; el vector de acuerdo con la presente invención, tal como se describe anteriormente; o la célula de acuerdo con la presente invención, tal como se describe anteriormente. Se prefiere una composición que comprenda el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención o el complejo de acuerdo con la presente invención, tal como se describe anteriormente.

Dicha composición puede ser una composición farmacéutica, tal como se describe anteriormente, en el contexto de los anticuerpos neutralizantes, por lo que la descripción detallada y las modalidades preferidas de dicha composición farmacéutica, tal como se describe anteriormente, se aplican en consecuencia al anticuerpo, o al fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, que se une a la proteína NS1 de ZIKV. Sin embargo, la composición también se puede utilizar para fines no farmacéuticos, tal como en el diagnóstico (de la infección por ZIKV) o con fines analíticos.

Preferiblemente, la composición está en forma líquida, por ejemplo, para proporcionar el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo en un líquido para uso directo, por ejemplo, en un ensayo de diagnóstico. El líquido (vehículo) se puede elegir de acuerdo con el propósito, por ejemplo, en función del ensayo. Preferiblemente, la composición de acuerdo con la presente invención comprende PBS (solución salina amortiguada con fosfato) u otra solución amortiguadora. Dichos tampones son preferiblemente tampones biológicos, y la composición puede comprender así cualquiera de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), 2,2-bis(hidroximetil)-2,2’,2’’-nitrilotrietanol (BIS-TRIS), ácido 2-[(2-amino-2-oxoetil)-(carboximetil)amino]acético (ADA), piperazina-N,N’-bis(2-ácido etanosulfonico) (PIPES), ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), ácido 2-hidroxi-3-morfolino propanosulfónico (MOPSO), 1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino)propano (BIS-TRIS propano), ácido sulfónico de N,N-bis-(2-hidroxietil)-2-aminoetano (BES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 2-tris(hidroximetil)metilamino-etanosulfónico (TES), ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacinil]-etanosulfónico (HEPES), ácido 2-[bis(2-hidroxietil)amino]etanosulfónico (DIPSO), ácido [tris(hidroximetil)metilamino]propanosulfónico (TAPSO), Trizma, Piperazina-1,4-bis(ácido

2-hidroxipropanosulfónico)dihidrato (POPSO), ácido 3-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]propano-1-sulfónico (HEPPS), N-(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)glicina (TRICINA), Glicilglicina (Gly-Gly), N, N-bis(2-hidroxietil)glicina (BICINA), ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-4-butanosulfónico (HEPBS), ácido [tris(hidroximetil)metilamino]propanosulfónico (TAPS), 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol) (AMPD), ácido 3-([1,1-dimetil-2-hidroxietil]amino)-2-hidroxipropanosulfónico (AMPSO), ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico (CHES), ácido N-ciclohexil-2-hidroxi-3-aminopropanosulfónico (CAPSO), 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), ácido n-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico (CAPS), y ácido 4-(ciclohexilamino)-1-butansulfónico (CABS). También se prefiere que la composición comprenda la solución de Ringer. Además, la composición también puede comprender Tris, por ejemplo, Tris-HCl.

La composición de acuerdo con la presente invención también puede comprender un detergente, por ejemplo, un Tween (polisorbato), tal como Tween 20 o Tween 80. Los detergentes están presentes preferiblemente en niveles bajos, por ejemplo, menos de 0,01%. Las composiciones también pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para dar tonicidad. Por ejemplo, una concentración de 10±2 mg/ml de NaCl es típica.

Además, la composición de acuerdo con la presente invención puede comprender opcionalmente un estabilizador de proteínas, tal como albúmina de suero bovino (BSA) o albúmina de suero humano ("HSA", por sus siglas en inglés). Otros ejemplos de estabilizadores de proteínas, que pueden incluirse opcionalmente en la composición de acuerdo con la presente invención, incluyen soluciones amortiguadoras, por ejemplo, tal como se describió anteriormente; sales, tales como cloruro de sodio; aminoácidos, tales como histidina, glicina y arginina; polioles/disacáridos/polisacáridos, tales como trehalosa y sacarosa (disacáridos), manitol y sorbitol (alcoholes de azúcar); tensioactivos, tales como polisorbato 20, polisorbato 80 y proteínas como HSA o BSA; polímeros, tales como dextrano y polietilenglicol; y antioxidantes.

Además, la composición de acuerdo con la presente invención puede comprender opcionalmente un conservador, tal como azida sódica. Los conservadores se utilizan típicamente para prevenir la contaminación microbiana.

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un kit de partes que comprende el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el complejo de acuerdo con la presente invención, o la composición de acuerdo con la presente invención.

Dicho kit de partes puede además comprender opcionalmente uno o más de los siguientes:

(i) una o más soluciones, por ejemplo, para utilizar en un ensayo de diagnóstico, por ejemplo, para diluir el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo;

(ii) un prospecto, por ejemplo, con instrucciones de uso;

(Iii) una etiqueta tal como se describe anteriormente y, opcionalmente, soluciones y/o componentes adicionales requeridos para el etiquetado; y/o

(iv) recipientes o dispositivos, por ejemplo, útiles en un ensayo de diagnóstico, por ejemplo, una o más placas de ELISA.

Preferiblemente, el kit de acuerdo con la presente invención tal como se describe anteriormente también comprende un sustrato para el desarrollo del color. Los ejemplos de dicho sustrato incluyen p-NPP, en particular en el caso de detección a través de fosfatasa alcalina; o una enzima tal como ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (“ABTS”, por sus siglas en inglés), 3,3’,5,5’-tetrametilbencidina (“TMB”, por sus siglas en inglés) u o-fenilendiamina (“OPD”, por sus siglas en inglés), en particular en el caso de uso de peroxidasa de rábano picante (HRP). Opcionalmente, el sustrato puede diluirse en una solución amortiguadora adecuada, por ejemplo, una solución amortiguadora tal como se describe anteriormente en el contexto de la composición de acuerdo con la presente invención. Alternativamente, el sustrato y la solución amortiguadora pueden proporcionarse como entidades separadas en el kit.

Con respecto a la etiqueta, el kit de acuerdo con la presente invención también puede comprender una estreptavidina conjugada con enzimas, u otro sistema para detectar la unión del anticuerpo sonda. Por ejemplo, el anticuerpo sonda se puede hacer en forma murinizada, y en este caso la unión se puede detectar con un anticuerpo secundario anti-ratón, sin la necesidad de biotinilación. El anticuerpo secundario anti-ratón es típicamente policlonal y/o adsorbido de manera cruzada por no reaccionar con anticuerpos humanos.

Además, el kit de acuerdo con la presente invención comprende preferiblemente una o más placas de ELISA. Más preferiblemente, esas placas de ELISA se recubren previamente con la proteína ZIKV-NS1. Opcionalmente, tales placas ELISA pre-recubiertas pueden pre-bloquearse.

Diagnóstico de la infección por el virus del Zika

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona el uso del anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, que se une a la proteína NS1 de ZIKV, el complejo de acuerdo con la presente invención, la composición de acuerdo con la presente invención, o el kit de partes de acuerdo con la presente invención en el diagnóstico de la infección por el virus del Zika (ZIKV).

El diagnóstico de la infección por el virus del Zika (ZIKV) se realiza típicamente *in vitro*, por ejemplo, en una muestra aislada del sujeto a diagnosticar. Las muestras aisladas preferidas del sujeto incluyen muestras de un fluido corporal y muestras de tejido. Se prefiere más una muestra de un fluido corporal. Los fluidos corporales preferidos para el diagnóstico de infección por ZIKV incluyen sangre (por ejemplo, sangre entera, plasma, suero), saliva y orina. La sangre, en particular plasma o suero, es la más preferida.

En consecuencia, la presente invención también proporciona el uso del anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, que se une a la proteína NS1 de ZIKV, el complejo de acuerdo con la presente invención, la composición de acuerdo con la presente invención, o el kit de partes de acuerdo con la presente invención para determinar si una muestra aislada (de un fluido corporal), tal como una muestra de sangre aislada, está infectada con el virus del Zika. Tal como se describió anteriormente, los fluidos corporales preferidos para el diagnóstico de infección por ZIKV incluyen sangre (por ejemplo, sangre entera, plasma, suero), saliva y orina. La sangre, en particular plasma o suero, es más preferida.

Para el diagnóstico de la infección por el virus del Zika, se pueden usar diferentes ensayos de diagnóstico. Los ensayos de diagnóstico preferidos son inmunoensayos. Los ejemplos preferidos de inmunoensayos incluyen ELISA, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y citometría de flujo. Preferiblemente, el diagnóstico incluye el ensayo ELISA. Por ejemplo, se puede usar un ensayo ELISA estándar, un ensayo ELISA tipo sándwich o un ensayo de bloqueo de unión.

Preferiblemente, el ensayo de diagnóstico detecta:

(i) (la presencia de) la propia proteína NS1 de ZIKV; y/o

(ii) (la presencia de) anticuerpos anti-NS1 de ZIKV

en una muestra (aislada) de un sujeto a diagnosticar.

Preferiblemente, se usa un ensayo de bloqueo de unión. En este ensayo, se añade una muestra aislada de un sujeto a diagnosticar (por ejemplo, una muestra de un fluido corporal, tal como sangre (sangre entera, plasma, suero), saliva y orina) a una placa de ELISA recubierta con proteína NS1 de ZIKV e incubadas (por ejemplo, durante al menos aproximadamente 30 minutos o al menos aproximadamente una hora) para permitir la unión. Subsecuentemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención se añade (como “anticuerpo sonda”), en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención se etiqueta preferiblemente, por ejemplo, se biotinila o conjuga con peroxidasa de rábano picante (HRP). Después de otro tiempo de incubación (por ejemplo, al menos aproximadamente 1 min, preferiblemente al menos aproximadamente 3 min, más preferiblemente al menos aproximadamente 5 min, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 10 min, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 15 min), se puede determinar la inhibición de la unión del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención.

En general, la inhibición de la unión muestra la presencia de anticuerpos anti-NS1 de ZIKV en la muestra del sujeto, lo que indica una infección por ZIKV en el sujeto. Por el contrario, en muestras de sujetos no infectados, típicamente no se espera una inhibición de la

unión. Es importante destacar que un ensayo de este tipo que utiliza los anticuerpos de unión a NS1 de ZIKV de la presente invención no tiene una calificación positiva en sujetos que ya estaban infectados con otros flavivirus. Los flavivirus suelen inducir una gran cantidad de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con ZIKV. En otras palabras, este ensayo es altamente específico y no está afectado por anticuerpos con reactividad cruzada.

Por consiguiente, la presente invención también proporciona un ensayo de bloqueo de unión para el diagnóstico *in vitro* de la infección por el virus del Zika, que comprende los siguientes pasos:

(i) añadir una muestra aislada de un sujeto a diagnosticar a una placa recubierta con proteína NS1 de ZIKV e incubar dicha muestra en dicha placa,

(ii) añadir el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 47-75 o el complejo de conformidad con la reivindicación 76,

(iii) determinar la inhibición de la unión de la unión de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Preferiblemente, la muestra aislada de un sujeto a diagnosticar se selecciona de sangre, saliva y orina; preferiblemente la muestra es una muestra de sangre, tal como sangre entera, plasma o suero.

También es preferible que el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, añadido en el paso (ii), está etiquetado, preferiblemente biotinilado o conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP).

Además, la muestra aislada de un sujeto a diagnosticar se diluye preferiblemente, por ejemplo 1:5-1:50, preferiblemente 1: 5-1: 25, tal como 1: 10.

Preferiblemente, el tiempo de incubación en el paso (i) es de al menos 5 minutos, preferiblemente al menos 15 minutos, más preferiblemente al menos 30 minutos, incluso más preferiblemente al menos 45 minutos, y lo más preferiblemente al menos 60 minutos.

Además, se prefiere que en el paso (ii) después de añadir el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, se incube durante al menos 1 minuto, preferiblemente al menos 3 minutos, más preferiblemente al menos 5 min, incluso más preferiblemente al menos 10 min, y lo más preferiblemente al menos 15 min.

Preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, que se usa como anticuerpo sonda en el bloqueo del ensayo de unión es un anticuerpo preferido, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, puede ser preferiblemente un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención

que se une al sitio antigénico S2 de la proteína NS1 del virus del Zika. Lo más preferiblemente, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, que se usa como anticuerpo sonda en el bloqueo del ensayo de unión es un anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 (i) de acuerdo con SEQ ID NOs: 127-131 y 133; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tengan al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; o (ii) de acuerdo con SEQ ID NOs: 127-130 y 132-133; o las variantes de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia. De manera particularmente preferible, el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, que se usa como anticuerpo sonda en el bloqueo del ensayo de unión es un anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno, que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) de acuerdo con SEQ ID NO: 134, o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de acuerdo con SEQ ID NO: 135, o una variante de secuencia funcional de las mismas que tenga al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

Por ejemplo, la inhibición de la unión de los anticuerpos biotinilados de ejemplo o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos de acuerdo con la presente invención puede evaluarse determinando la concentración óptima del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la presente invención para lograr una unión máxima de 70% a la proteína NS1 de ZIKV. Por ejemplo, las concentraciones óptimas de los anticuerpos ejemplares gZKA15, gZKA25 y gZKA35 para lograr una unión máxima de 70% a la proteína NS1 de ZIKV pueden ser de 38, 17 y 7 ng/ml, respectivamente. Después de realizar el ensayo de bloqueo de unión descrito anteriormente, se puede añadir un sustrato, tal como p-NPP y se puede leer la placa de ELISA a 405 nm, y el porcentaje de inhibición de la unión se puede calcular mediante la siguiente ecuación (I):

(I) % inhib = (1−[(DO muestra−DO ctrl neg)/ (DO ctrl pos−DO ctrl neg)]) × 100

en donde “% inhib” se refiere al porcentaje de inhibición de la unión del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención a la proteína NS1 de ZIKV; “DO muestra” se refiere a la densidad óptica de la muestra; “DO ctrl neg” se refiere a la densidad óptica de un control negativo; y “DO ctrl pos” se refiere a la densidad óptica de un control positivo.

Este ensayo ofrece varias ventajas, tal como la capacidad de detectar infecciones por ZIKV clínicas, subclínicas y asintomáticas a nivel de la población, siendo capaz de distinguirlas de otras infecciones por flavivirus, tal como el DENV. En particular, el ensayo de diagnóstico de acuerdo con la presente invención proporciona una mayor precisión que los ensayos de unión directa de ELISA.

Además, la presente invención también proporciona un método para el diagnóstico (*in vitro*) de la infección por Zika (en una muestra aislada), en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, que se une a la proteína NS1 de ZIKV, el complejo de acuerdo con la presente invención, la composición de acuerdo con la presente invención, o el kit de partes de acuerdo con la presente invención se utilizan para determinar si una muestra aislada (de un fluido corporal), tal como una muestra de sangre aislada, está infectada con el virus del Zika.

Las modalidades preferidas del uso anterior en el diagnóstico se aplican también al método de diagnóstico. Por ejemplo, las muestras aisladas preferidas (del sujeto) incluyen muestras de un fluido corporal y muestras de tejido. Se prefiere más una muestra de un fluido corporal. Los fluidos corporales preferidos para el diagnóstico de infección por ZIKV incluyen sangre (por ejemplo, sangre entera, plasma, suero), saliva y orina. La sangre, en particular plasma o suero, es la más preferida. Además, los ensayos de diagnóstico preferidos son inmunoensayos. Los ejemplos preferidos de inmunoensayos incluyen ELISA, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y citometría de flujo. Preferiblemente, el diagnóstico incluye el ensayo ELISA. Más preferiblemente, se usa un ensayo de bloqueo de unión tal como se describe anteriormente.

Preferiblemente, el método para el diagnóstico (*in vitro*) de la infección por Zika (en una muestra aislada) comprende el siguiente paso:

(i) poner en contacto la muestra aislada con el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, que se une a la proteína NS1 de ZIKV, el complejo de acuerdo con la presente invención, o la composición de acuerdo con la presente invención.

Más preferiblemente, el método para el diagnóstico (*in vitro*) de la infección por Zika (en una muestra aislada) comprende los siguientes pasos:

(0) añadir una muestra aislada de un sujeto a diagnosticar (por ejemplo, una muestra de un fluido corporal, tal como sangre (por ejemplo, sangre entera, plasma, suero), saliva y orina) a una placa de ELISA recubierta con proteína NS1 de ZIKV;

(i') añadir adicionalmente el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención a la placa de ELISA, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención está etiquetado preferiblemente, por ejemplo, biotinilado;

(ii) opcionalmente, lavar la placa de ELISA; y

(iii) determinar la inhibición de la unión del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona el anticuerpo neutralizante, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención, o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para uso de acuerdo con el tratamiento o la prevención de la infección por ZIKV en sujetos diagnosticados con infección por el virus del Zika utilizando el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, que se une a la proteína NS1 de ZIKV, el complejo de acuerdo con la presente invención, la composición de acuerdo con la presente invención, el kit de partes de acuerdo con la presente invención o el método para el diagnóstico de ZIKV de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un método para prevenir y/o tratar la infección por el virus del Zika, comprendiendo el método los siguientes pasos:

(i) diagnosticar la infección por el virus del Zika en un sujeto utilizando el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, que se une a la proteína NS1 de ZIKV, el complejo de acuerdo con la presente invención, la composición de acuerdo con la presente invención, el kit de partes de acuerdo con la presente invención, o el método para el diagnóstico de ZIKV de acuerdo con la presente invención; y

(ii) administrar a dicho sujeto el anticuerpo neutralizante, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención, o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

Preferiblemente, en este método para la prevención y/o tratamiento de la infección por el virus del Zika, el paso (i) de diagnóstico de la infección por el virus del Zika se realiza como

diagnóstico *in vitro* en una muestra aislada (de un fluido corporal), tal como una muestra de sangre aislada.

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un kit de partes que comprende

(i) el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, que se une a la proteína NS1 de ZIKV, el complejo de acuerdo con la presente invención, la composición de acuerdo con la presente invención, o el kit de partes de acuerdo con la presente invención; y

(iii) el anticuerpo neutralizante, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de acuerdo con la presente invención, la célula de acuerdo con la presente invención, o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

Dicho kit de partes es particularmente útil en un método tal como se describe anteriormente. Mediante el uso de un método de este tipo y/o un kit de este tipo, la infección por ZIKV se puede diagnosticar específicamente, así como prevenirse y/o tratarse.

DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la reactividad (ELISA) y la actividad neutralizadora de ZIKV y DENV1 de los anticuerpos derivados de cuatro donantes inmunes a ZIKV (ZKA, ZKB, ZKC y ZKD) para la proteína E de ZIKV y DENV1-4 y el dominio EDIII de la proteína E de ZIKV; NNB, anticuerpos neutralizantes sin unión a la proteína E.

La Figura 2 muestra la reactividad (ELISA) de anticuerpos derivados de cuatro donantes inmunes a ZIKV (ZKA, ZKB, ZKC y ZKD) a la proteína NS1 de ZIKV, DENV1-4 y otros flavivirus. YFV virus de la fiebre amarilla ; WVN virus del Nilo Occidental; JEV virus de la encefalitis japonesa; y TBEV virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (nd, no determinado).

La Figura 3 muestra la unión de los anticuerpos ZKA190, ZKA78 y ZKA64 a la proteína E de ZIKV y DENV1 y a las proteínas de EDIII de ZIKV de acuerdo con lo medido mediante el ensayo ELISA.

La Figura 4 muestra la unión de los anticuerpos ZKA185 y ZKA190 a la proteína E de ZIKV, las proteínas VLP de DENV1 y las proteínas de EDIII de ZIKV de acuerdo con lo medido mediante el ensayo ELISA.

La Figura 5 muestra la unión de los anticuerpos ZKA15, ZKA25 y ZKA35 a las proteínas NS1 de ZIKV y DENV1-4 de acuerdo con lo medido mediante el ensayo ELISA.

La Figura 6A, la Figura 6B y la Figura 6C muestran, para el Ejemplo 3, el mapeo de sitios antigénicos de la proteína NS1 de ZIKV utilizando estudios de unión a octetos de competencia cruzada. (Figura 6A,-Figura 6B) Matriz de competencia cruzada realizada por Octet en 24 mAbs específicos para NS1 de ZIKV (Figura 6A) o con reactividad cruzada para la

NS1 de DENV (Figura 6B). +, falta de unión del anticuerpo secundario; +/-, pérdida parcial de unión del mAb secundario; -, unión del mAb secundario. Celdas tachadas, no analizadas. (Figura 6C) Mapa de los sitios antigénicos seleccionados por los mAbs específicos de NS1 de ZIKV, según se define usando la competencia cruzada de interferometría de biocapa ("BLI", por sus siglas en inglés) (Octet).

La Figura 7 muestra, para el Ejemplo 4, el ensayo de bloqueo de unión utilizando el mAb ZKA35 como una sonda para detectar NS1 de ZIKV en plasma de donantes inmunes a ZIKV (n = 4), inmunes a DENV (n = 5) y de control (n = 48) (1/10 dilución). Las muestras de plasma se analizaron para determinar su capacidad para unirse a NS1 (puntos sin relleno) e inhibir la unión del mAb ZKA35 biotinilado a NS1 (puntos con relleno).

La Figura 8 muestra, para el Ejemplo 5, la actividad neutralizante de los anticuerpos ZKA190, ZKA64, ZKA64-LALA, ZKA230 y ZKA78 contra ZIKV (cepa H/PF/2013) y DENV1 en células Vero de acuerdo con lo medido mediante una citometría de flujo (% de células infectadas).

La Figura 9 muestra, para el Ejemplo 5, la actividad neutralizante de los anticuerpos ZKA190, ZKA64, ZKA185, ZKA230 y ZKA78 contra ZIKV (cepa H/PF/2013) en células Vero, de acuerdo con lo medido con una lectura de viabilidad celular (wst-1, Roche).

La Figura 10 muestra, para el Ejemplo 6, la actividad de potenciación de la infección (ADE, potenciación dependiente de anticuerpos) de los anticuerpos ZKA190, ZKA64, ZKA64-LALA, ZKA185, ZKA230 y ZKA78 para ZIKV (cepa H/PF/2013) en células K562 no permisivas de acuerdo con lo medido mediante una citometría de flujo (% de células infectadas).

La Figura 11 muestra, para el Ejemplo 6, que cuatro plasmas inmune a ZIKV y un plasma inmune a DENV mostraron una capacidad similar para potenciar la infección por ZIKV de células K562 (panel superior). Este efecto de ADE se bloqueó completamente en los cinco plasmas inmunes mediante el anticuerpo ZKA64-LALA específico de EDIII (panel inferior).

La Figura 12 muestra la alineación de aminoácidos de la región EDIII de 39 cepas ZIKV del linaje asiático desde 2013 (incluyendo la cepa prototípica MR766 del linaje africano aislada en 1947).

La Figura 13 muestra, para el Ejemplo 5, la actividad neutralizante del anticuerpo ZKA190 y ZKA190-LALA contra tres cepas de ZIKV (H/PF/2013, MR766 y MRS_OPY_Martinique_PaRi_2015) en células Vero, de acuerdo con lo medido mediante una citometría de flujo (% de células infectadas).

La Figura 14 muestra, para el Ejemplo 7, el análisis de bloqueo de unión de NS1 de residentes europeos. Se muestran los valores del ensayo de bloqueo de unión para las muestras recolectadas en Italia y Suiza. Se muestran los valores del ensayo de bloqueo de unión en muestras de individuos infectados con ZIKV, primarios y secundarios infectados con DENV, WNV y CHIKV, y un panel de muestras de donantes de sangre sanos de Suiza.

La Figura 15A, la Figura 15B y la Figura 15C muestran, para el Ejemplo 8, la neutralización de mAbs ZKA190 y C8 probados contra un panel de cuatro cepas de ZIKV, de acuerdo con lo determinado por el porcentaje de células Vero infectadas en presencia de cantidades crecientes de mAbs (Figura 15A). También se muestran los valores de CI_{50} (Figura 15B) y las estadísticas (Figura 15C). Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes.

La Figura 16A, la Figura 16B, la Figura 16C, la Figura 16D y la Figura 16E muestran, para el Ejemplo 9, la neutralización y la potenciación de la infección por ZIKV por el anticuerpo ZKA190. (Figura 16A) Neutralización de la infección por la cepa ZIKV PRVABC59 de células progenitoras neuronales humanas (“hNPC”, por sus siglas en inglés) por ZKA190, ZKA190-LALA y un mAb de control de acuerdo con lo determinado por el ensayo de placa en células Vero (panel izquierdo) e inmunofluorescencia indirecta de hNPC infectadas usando un anticuerpo anti-E etiquetado con fluoróforo (panel derecho). (Figura 16 B) ADE de infección por ZIKV de células K562 no permisivas por ZKA190 y ZKA190-LALA. (Figura 16C) ADE inducida en células K562 cuando ZIKV se preincuba con diluciones seriadas de suero plasmático de diferentes pacientes positivos a ZIKV (panel izquierdo). Cuando se añade ZKA190 LALA a los complejos de suero ZIKV, se inhibe la ADE (panel derecho). (Figura 16D) ADE inducida en células K562 cuando ZIKV se preincuba con diluciones seriadas de un mAb con reacción cruzada con prM (DV62) derivado de un donante inmune a DENV. ZKA190-LALA inhibe el ADE de ZIKV cuando se acompleja con el anticuerpo DV62 reactivo a prM. (Figura 16 E) Efecto sobre ADE inducida por la dilución de potenciación de pico de un plasma DENV2 (panel izquierdo) o mAb DV62 anti-prM (panel derecho) por diluciones en serie de los mAb indicados.

La Figura 17A, la Figura 17B, la Figura 17C, la Figura 17D y la Figura 17E muestran, para el Ejemplo 10, la identificación del epítopo ZKA190 y el análisis de su conservación en cepas de ZIKV. (Figura 17A) Superposición de espectros de [^{15}N, ^{1}H]-coherencia cuántica simple heteronuclear (“HSQC”, por sus siglas en inglés) de EDIII de ZIKV etiquetado con ^{15}N en ausencia (negro) o presencia (rojo) de Fab de ZKA190 sin etiquetar. Las diferencias identifican los residuos de EDIII afectados por la unión del anticuerpo. (Figura 17B) Mapeo del epítopo de RMN de Fab de ZKA190 en complejo con EDIII de ZKV. La perturbación de desplazamientos químicos (“CSP”, por sus siglas en inglés, eje y) se representa en función del número de residuos de EDIII. Los residuos afectados por la unión del anticuerpo están en rojo. (Figura 17C) Los residuos en el bucle FG identificados por el mapeo del epítopo de RMN están parcialmente ocultos en la proteína E del mol A, pero en gran parte se exponen en los moles B y C. El EDIII de la proteína E se muestra de color azul. Los residuos identificados por el mapeo del epítopo de RMN se muestran de color magenta, excepto los del bucle FG, que se muestran en verde. Las proteínas E adyacentes se muestran como una superficie gris.

(Figura 17D) Nivel de conservación de residuos de aminoácidos en el epítopo ZKA190 calculado mediante el análisis de secuencias de 217 cepas de ZIKV encontradas en las bases de datos de Recursos del ZIKV (NCBI) al 24 de noviembre de 2016. (Figura 17E) Representación de libro abierto que muestra la complementariedad de carga entre el epítopo y el parátope del resultado de acoplamiento. Los límites del epítopo y paratopo están rodeados con un círculo de color verde. Los bordes entre las cadenas pesada y ligera de Fab y su huella correspondiente en EDIII se muestran como líneas punteadas de color amarillo.

La Figura 18A, la Figura 18B y la Figura 18C muestra, para el Ejemplo 10, el epítopo ZKA190 identificado por RMN y acoplamiento. (Figura 18A) Representación de viñeta de las 12 estructuras de RMN de energía más baja de EDIII de ZIKV, con residuos afectados por la unión de ZKA190 en color rojo. La flexibilidad en el extremo N-terminal de la construcción es aparente. (Figura 18B) Modelo del complejo ZKA190:EDIII derivado por acoplamiento computacional y simulación molecular validado por los resultados de RMN. El epítopo identificado por RMN en EDIII (gris) está en rojo. La cadena pesada y ligera de ZKA190 se muestran de color verde oscuro y claro, respectivamente. Los residuos de EDIII que afectan o no a la unión del anticuerpo cuando se mutan se muestran como barras de color naranja y azul, respectivamente. (Figura 18C) El epítopo ZKA190 identificado por RMN (rojo) está accesible en la superficie del virus (blanco).

La Figura 19 muestra, para el Ejemplo 10, la unión de EDIII de tipo silvestre o mutada a IgG de ZKA190. Se muestran datos de la resonancia de plasmones superficiales (“SPR”, por sus siglas en inglés) y cinéticas de unión. Los mutantes de EDIII que afectan (resaltados en rojo) o que no afectan la unión se muestran como se indica en la figura.

La Figura 20 muestra, para el Ejemplo 11, los resultados de los experimentos de microscopía confocal. El ZIKV incubado con una concentración superior a 10’000 veces el valor de CI_{50}de Fab de ZKA190 o IgG completa se añadieron a las células Vero. El complejo ZIKV:anticuerpo se detecta dentro de las células (verde) y se localiza junto con endosomas (superposición de rojo, amarillo). Los endosomas y los orgánulos ácidos están marcados con Lysotracker rojo; el colorante Alexa-488 conjugado con ZKA190 se muestra en color verde. Los núcleos se tiñen con 4 ',6-diamino-2-fenilindol (“DAPI”, por sus siglas en inglés) (azul).

La Figura 21A y la Figura 21B muestran, para el Ejemplo 12, la eficacia profiláctica y terapéutica de ZKA190. (Figura 21A) ZKA190 protege fuertemente contra la infección por ZIKV cuando se administra de forma profiláctica a ratones (A129 en (Figura 21A) y AG129 en (Figura 21B) expuestos a una dosis letal de la cepa MP17451 de ZIKV. Los experimentos usaron N=4-8 ratones por grupo. Se muestran las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Figura 21A). La significación se determinó utilizando la prueba de rangos logarítmicos de Mantel-Cox. Figura 21A, panel superior izquierdo: ZKA190 a 5, 1 y 0,2 mg/kg frente a mAb de control, P = 0,0031; ZKA190 a 0,04 mg/kg frente a mAb de control, P = 0,0116; ZKA190-LALA

a 5, 1, 0,2 y 0,04 mg/kg frente a mAb de control, P = 0,0031. Figura 21A, panel superior derecho: Puntuación de morbilidad de los ratones monitoreados durante un período de 14 a 15 días (se utilizaron dos métodos de calificación diferentes; ver (Dowall, SD, Graham, VA, Rayner, E., Atkinson, B., Hall, G., Watson, RJ, Bosworth, A., Bonney, LC, Kitchen, S., & Hewson, R. (2016). A Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection. PLoS Negl Trop Dis 10, e0004658–13). Figura 21A, paneles inferiores: peso corporal de los ratones. Figura 21B: Se administró ZKA190 o ZKA190-LALA a 15 mg/kg en diferentes intervalos de tiempo después de la infección por ZIKV. Figura 21B, panel superior izquierdo: Se muestra una curva de supervivencia de Kaplan-Meier. Los experimentos usaron N=5 ratones por grupo. La significación se determinó utilizando la prueba de rangos logarítmicos de Mantel-Cox. Se administraron ZKA190 y ZKA190-LALA en los días 1, 2, 3 o 4 frente al control, P = 0,0016. Figura 21B, panel superior derecho: Calificación de morbilidad de los ratones monitoreados durante 14 días de acuerdo con (Dowall et al., 2016). Los ratones fueron monitoreados durante un período de 14 días para detectar la pérdida de peso corporal (Figura 21B, paneles inferiores). El anticuerpo de control es MPE8 específico para la proteína F del virus del sarcoma de Rous ("RSV", por sus siglas en inglés) (Corti, D., et al. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. Nature 501, 439-443 (2013)).

La Figura 22A, la Figura 22B, la Figura 22C y la Figura 22D muestran, para el Ejemplo 12, la eficacia profiláctica del mAb de ZKA190 específico para EDIII anti-ZIKV contra las cepas MP1741 de ZIKV. (Figura 22A) Se muestra la viremia medida como UFP/ml en el día 5 en la sangre de todos los animales. (Figura 22B) La carga viral se midió como copias genómicas/ml mediante PCR cuantitativa ("qPCR", por sus siglas en inglés) en el día 5 en sangre de todos los animales y en tejidos indicados cuando se sacrificaron los animales al final del estudio o cuando se cumplieron los criterios de valoración humanitarios. (Figura 22C) Los ratones fueron monitoreados durante un período de 14 días para determinar la pérdida de peso corporal (Figura 22D) Concentración de IgG en suero humano en las muestras de sangre del día 5. La significación se determinó en comparación con el tratamiento con anticuerpos de control mediante la prueba de U de Mann-Whitney no paramétrica para datos no apareados. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p<0,001.

La Figura 23, la Figura 23B y la Figura 23C muestran, para el Ejemplo 12, la eficacia terapéutica del mAb de ZKA190 específico para EDIII anti-ZIKV. (Figura 23A) Las cargas virales se midieron como UFP en el día 5 en la sangre de todos los animales. (Figura 23B) Las cargas virales se midieron como copias genómicas por qPCR en el día 5 en la sangre de todos los animales, así como en la sangre y los tejidos indicados cuando los animales se sacrificaron al final del estudio o cuando se cumplieron los criterios de valoración humanitarios. La significación se determinó en comparación con el tratamiento con anticuerpos de control mediante la prueba de U de Mann-Whitney no paramétrica para datos

no apareados. *p < 0,05; **p < 0,01. (Figura 23C) Concentración de IgG en suero humano en muestras de sangre del día 5.

EJEMPLOS

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

Ejemplo 1: Aislamiento de anticuerpos específicos contra ZIKV y producción de anticuerpos monoclonales

Se aislaron células B de memoria IgG^+ a partir de células mononucleares de sangre periférica ("PBMC", por sus siglas en inglés) crioconservadas de cuatro donantes infectados con ZIKV (ZKA, ZKB, ZKC y ZKD) utilizando microesferas CD22 (Miltenyi Biotec), seguido de un agotamiento de células que portaban IgM, IgD e IgA mediante clasificación celular Las células B de memoria de los donantes infectados con ZIKV se inmortalizaron posteriormente con EBV (virus de Epstein-Barr) y oligodesoxinucleótido CpG 2006 (CpG) en múltiples pocillos replicados como se describe anteriormente (Traggiai, E. et al., Nat. Med. 10, 871-875, 2004) y los sobrenadantes del cultivo se analizaron posteriormente en un cribado primario utilizando en paralelo un ensayo de micro-neutralización con 384 pocillos y un ensayo de unión (ELISA) para probar su unión a la proteína NS1 de ZIKV o a la proteína E de ZIKV. Los resultados del ensayo de unión se muestran en la Figura 1 (unión a la proteína E de ZIKV) y en la Figura 2 (unión a la proteína NS1 de ZIKV).

Los ensayos de neutralización se realizaron en células Vero. En una placa de 384 pocillos, se incubó ZIKV H/PF/2013 que produjo una tasa de infección (multiplicidad de infección, "MOI", por sus siglas en inglés) de 0,35 con sobrenadantes durante 1 hora al 37% (5% de CO_2) antes de la adición a las 5000 células vero previamente sembradas. Estos se incubaron durante 5 días más, tras lo cual se eliminó el sobrenadante y se añadió el reactivo WST-1 (Roche). Los cultivos positivos se recolectaron y expandieron. De los cultivos positivos, las secuencias V_H y V_L se recuperaron mediante RT-PCR. Los anticuerpos se clonaron en vectores de expresión de IgG1 e Ig kappa o Ig lambda humana (proporcionados amablemente por Michel Nussenzweig, Rockefeller University, Nueva York, EE.UU.) Esencialmente como se describen (Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H (2008) Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. J Immunol Methods 329: 112-124). Se produjeron anticuerpos monoclonales a partir de células B inmortalizadas con EBV o mediante transfección transitoria de células FreeStyle™ 293 (Invitrogen). Se recolectaron los sobrenadantes de células B o células transfectadas, y las IgG se purificaron por afinidad mediante cromatografía de proteína A o proteína G (GE Healthcare) y se desalaron frente a PBS.

La Figura 1 proporciona una visión general sobre los anticuerpos neutralizantes de ZIKV seleccionados (véanse las Tablas 1 y 2 para las secuencias de aminoácidos de sus CDRs y las regiones variables de la cadena pesada/ligera). Las dos últimas columnas de la Figura 1 proporcionan las actividades de neutralización (CI_{50}) de ZIKV y DENV1 (si se analizaron). Las otras columnas proporcionan actividades de unión (CE_{50}) de los anticuerpos contra la proteína E de ZIKV (ZIKV E), la proteína E de DENV1 (DENV1 E), la proteína E de DENV2 (DENV2 E), la proteína E de DENV3 (DENV3 E), la proteína E de DENV4 (DENV4 E), la partícula similar al virus de DENV1 (DENV1 VLP), la partícula similar al virus de DENV2 (DENV2 VLP), la partícula similar al virus de DENV3 (DENV3 VLP), la partícula similar al virus de DENV4 (DENV4 VLP) y al dominio EDIII de la proteína E de ZIKV (DIII ZKA).

Se aislaron anticuerpos adicionales por su capacidad para unirse a la proteína NS1 de ZIKV (véase la Figura 2). Los cultivos positivos se recolectaron y expandieron. De los cultivos positivos, las secuencias V_H y V_L se recuperaron mediante RT-PCR. Los anticuerpos se clonaron en vectores de expresión de IgG1 e Ig kappa o Ig lambda humana (proporcionados amablemente por Michel Nussenzweig, Rockefeller University, Nueva York, EE.UU.) Esencialmente como se describen (Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H (2008) Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. J Immunol Methods 329: 112-124). Se produjeron anticuerpos monoclonales a partir de células B inmortalizadas con EBV o mediante transfección transitoria de células FreeStyle™ 293 (Invitrogen). Se recolectaron los sobrenadantes de células B o células transfectadas, y las IgG se purificaron por afinidad mediante cromatografía de proteína A o proteína G (GE Healthcare) y se desalaron frente a PBS.

La Figura 2 proporciona una visión general sobre los anticuerpos de unión a la proteína NS1 de ZIKV seleccionados (véanse las Tablas 4 y 5 para las secuencias de aminoácidos de sus CDRs y las regiones variables de la cadena pesada/ligera). Específicamente, la Figura 2 proporciona actividades de unión (CE_{50}) de los anticuerpos contra la proteína NS1 de ZIKV (ZIKV NS1), la proteína NS1 de DENV1 (DENV1 NS1), la proteína NS1 de DENV2 (DENV2 NS1), la proteína NS1 de DENV3 (DENV3 NS1), la proteína NS1 de DENV4 (DENV4 NS1), la proteína NS1 del virus de la fiebre amarilla (YFV NS1), la proteína NS1 del virus del Nilo Occidental (WNV NS1), la proteína NS1 del virus de la encefalitis japonesa (JEV NS1) y la proteína NS1 del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV NS1).

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

En el Ejemplo 1, un gran número de anticuerpos neutralizantes de ZIKV se identificaron y se caracterizaron por su especificidad a ZIKV, en particular a la proteína E de

ZIKV y el EDIII de ZIKV, así como por su reactividad cruzada hacia DENV. Los anticuerpos ZKA190 (SEQ ID NOs: 1-18), ZKA185 (SEQ ID NOs: 19-36), ZKA230 (SEQ ID NOs: 37-54), ZKA64 (SEQ ID NOs: 73-90) y ZKA 78 (SEQ ID NOs: 55-72) que se describen en el Ejemplo 1 posteriormente se seleccionaron y analizaron contra la proteína E de ZIKV ("ZIKV"), EDIII de ZIKV ("DIIIZI") y también se analizaron contra la proteína E del virus del dengue (DENV, serotipo número 1) mediante el ensayo ELISA. Para ello, se utilizó un ensayo ELISA estándar. Brevemente, las placas ELISA se recubrieron con proteína E de ZIKV a 1 o 3 µg/ml, se bloquearon con FCS al 10% en PBS, se incubaron con sueros o anticuerpos humanos y se lavaron. Los anticuerpos unidos se detectaron mediante incubación con IgG anti-humana de cabra conjugada con fosfatasa alcalina ("AP", por sus siglas en inglés) (Southern Biotech). A continuación, se lavaron las placas, se añadió sustrato (p-NPP, Sigma) y se leyeron las placas a 405 nm. Las afinidades relativas de la unión del anticuerpo monoclonal se determinaron midiendo la concentración de anticuerpo (CE_{50}) requerida para lograr una unión máxima del 50% en la saturación.

Los resultados se muestran en la Figura 3 y la Figura 4. Cabe destacar que ZKA64 y ZKA190 se unieron a la proteína E de ZIKV y el EDIII de ZIKV ("DIII ZI") con bajos valores de CE_{50}, lo que indica que ZKA64 y ZKA190 se unen al dominio III de la proteína E de ZIKV (EDIII). ZKA78 se unió a la proteína E de ZIKV, pero no al EDIII de ZIKV, lo que indica que ZKA78 se une a la proteína E de ZIKV, pero no se dirige a la región del EDIII. A pesar de su considerable actividad neutralizante de ZIKV (véase la Figura 1), los anticuerpos ZKA185 y ZKA230 no mostraron ninguna unión detectable a la proteína E de ZIKV ni al EDIII de ZIKV (Figura 4). En consecuencia, ZKA185 y ZKA230 se denominaron como anticuerpos "neutralizantes sin unión E" (NNB). Se supone que esos anticuerpos NNB reconocen los epítopos cuaternarios que se muestran en los viriones infecciosos de ZIKV, pero no en las proteínas solubles.

Además, ninguno de ZKA190, ZKA185, ZKA230 y ZKA64 mostró ninguna unión detectable a las proteínas E de DENV (Figura 1, serotipos DENV1-4, y Figuras 3 y 4), lo que indica que ZKA190, ZKA185, ZKA230 y ZKA64 son específicos para ZIKV y no tienen una reacción cruzada al virus del dengue. Por el contrario, ZKA78, que se supone que se une al EDI/II de ZIKV, pero no al EDIII de ZIKV (véase la Figura 3), se unió a proteínas E de DENV (Figuras 1 y 3), lo que indica que ZKA78 es un anticuerpo con reacción cruzada vinculante tanto a ZIKV como a DENV.

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

ZKA78, se unió a DENV1-4 E, lo que confirma que ZKA78 es un anticuerpo con reactividad cruzada que se une a la proteína E de ZIKV y DENV (véase la Figura 1).

Ejemplo 3: Caracterización de los anticuerpos específicos contra la proteína NS1 de ZIKV para el diagnóstico serológico

En el Ejemplo 1, se identificó un gran número de anticuerpos reactivos contra NS1 y posteriormente se caracterizaron por su especificidad a NS1 de ZIKV y reactividad cruzada hacia otras proteínas NS1 de flavivirus (Figura 2). Los anticuerpos ZKA15 (SEQ ID NOs: 91-108), ZKA25 (SEQ ID NOs: 109-126) y ZKA35 (SEQ ID NOs: 127-144) se caracterizaron adicionalmente por la unión a las proteínas NS1 de ZIKV y NS1 de DENV1, NS1 de DENV2, NS1 de DENV3 y NS1 de DENV4. Para ello, se utilizó un ensayo ELISA estándar. Brevemente, las placas de ELISA se recubrieron con proteína NS1 de ZIKV a 1 µg/ml, se bloquearon con FCS al 10% en PBS, se incubaron con sueros o anticuerpos humanos y se lavaron. Los anticuerpos unidos se detectaron mediante incubación con IgG anti-humana de cabra conjugada con fosfatasa alcalina ("AP", por sus siglas en inglés) (Southern Biotech). A continuación, se lavaron las placas, se añadió sustrato (p-NPP, Sigma) y se leyeron las placas a 405 nm. Las afinidades relativas de la unión del anticuerpo monoclonal se determinaron midiendo la concentración de anticuerpo (CE_{50}) requerida para lograr una unión máxima del 50% en la saturación.

Los resultados se muestran en la Figura 5. Los tres anticuerpos (ZKA15, ZKA25 y ZKA35) se unieron con alta afinidad a la proteína NS1 de ZIKV, pero no a los antígenos de NS1 de DENV1-4 (Figura 5).

Para investigar más a fondo la unión de los anticuerpos a la proteína NS1 de ZIKV, se utilizaron ensayos de competencia de interferometría de biomasa. Se generó una matriz de competencia cruzada utilizando la interferometría de biocapa (BLI; Octet) en 13 anticuerpos específicos para NS1 de ZIKV (es decir, sin reactividad cruzada con NS1 de DENV), específicamente, anticuerpos ZKA24, ZKA15, ZKA32, ZKA19, ZKA50, ZKA37, ZKA46, ZKA10, ZKA48, ZKA35, ZKA25, ZKA44 y ZKA30 (véase la Figura 6A). Como se puede inferir a partir de la Figura 2, ninguno de esos 13 anticuerpos mostró una unión detectable a la proteína NS1 de DENV.

Los ensayos de competencia y la determinación de los sitios antigénicos se determinaron a 37°C con un sistema Octet RED96, FortéBio. La proteína ZIKV-NS1 diluida a 2,5 µg/ml en PBS se inmovilizó durante 7-9 minutos sobre la superficie de un chip sensor recubierto con APS. Los biosensores recubiertos se colocaron en pocillos que contenían una solución amortiguadora de bloqueo (BSA al 0,1% en PBS) durante 6 minutos para bloquear los sitios de unión del biosensor libres. A continuación, los biosensores recubiertos se incubaron durante 8 minutos con un conjunto de mAbs purificados únicos específicos para ZIKV-NS1 diluidos en solución amortiguadora de bloqueo a 10 µg/ml. Después de la unión del

primer conjunto de mAbs (paso 1), los biosensores se movieron a pocillos que contenían diferentes mAbs durante 8 minutos (paso 2). La asociación del segundo mAb dio como resultado el reconocimiento de un sitio antigénico diferente en comparación con el primer mAb (por ejemplo, no competencia). La competencia o la competencia parcial se determinaron en el paso 2 cuando no se detectó asociación o se detectó una asociación baja, respectivamente. Se creó una matriz de competencia cruzada mediante varias ejecuciones de competiciones para predecir el mapeo de sitios antigénicos en la proteína NS1 de ZIKV.

Los resultados se muestran en la Figura 6A y la Figura 6C. En primer lugar, todos los anticuerpos específicos contra la proteína NS1 de ZIKV analizados se unieron a los sitios antigénicos S1 y/o S2 (Figura 6A). Sin embargo, algunos de los anticuerpos no compitieron con otros. Por ejemplo, ZKA15 no compitió por la unión con ZKA25 y ZKA35 y viceversa (Figura 6A). En consecuencia, el anticuerpo ZKA15 se asignó al sitio antigénico S1, mientras que los anticuerpos ZKA25 y ZKA35 se asignaron al sitio antigénico S2 (Figura 6C). En resumen, en función de los anticuerpos utilizados, se identificaron los sitios antigénicos (S1 y S2) en la proteína NS1 de ZIKV (Figura 6C).

Además, se investigó la unión de 10 anticuerpos de reacción cruzada a la proteína NS1 de ZIKV y a la proteína NS1 de DENV (específicamente, ZKA18, ZKA29, ZKA39, ZKA53, ZKA54, ZKB19, ZKB23, ZKC29, ZKC33 y ZKC34; Figura 6B) a los sitios antigénicos S1 y/o S2 en la proteína NS1 de ZIKV. Como se puede inferir a partir de la Figura 2, los 10 anticuerpos mostraron unión a la proteína NS1 de DENV. Dichos 10 anticuerpos con reactividad cruzada se analizaron en un ensayo de competencia cruzada tal como se describió anteriormente (para los anticuerpos específicos de NS1 de ZIKV) contra el anticuerpo específico del S1 de NS1 de ZIKV, ZKA15, y contra el anticuerpo específico del S2 de NS1 de ZIKV, ZKA35.

Los resultados se muestran en la Figura 6B. Curiosamente, ninguno de los diez anticuerpos reactivos cruzados analizados compitió con ZKA15 y/o ZKA35 por la unión a los sitios antigénicos S1 y/o S2 en NS1 de ZIKV (Figura 6B). Estos resultados muestran que el sitio antigénico de ZKA15 y ZKA35 no está dirigido por anticuerpos con reacción cruzada con NS1. Por lo tanto, los sitios antigénicos S1 y S2 de NS1 fueron el blanco de ZIKV específicos, pero no de anticuerpos de reacción cruzada.

Ejemplo 4: Uso de anticuerpos específicos contra la proteína NS1 de ZIKV en el diagnóstico de la infección por ZIKV

En el presente Ejemplo, se investigó la utilidad de los anticuerpos específicos contra la proteína NS1 de ZIKV de la presente invención en el diagnóstico de la infección por ZIKV. Más específicamente, se determinó el uso de anticuerpos específicos contra la proteína NS1 de ZIKV de la presente invención para detectar específicamente la presencia o ausencia de anticuerpos contra la proteína NS1 de ZIKV en muestras de plasma de donantes infectados con ZIKV o DENV.

Para este fin, se utilizó un ensayo de “bloqueo de unión”. En particular, se midió la capacidad de los anticuerpos contra el plasma reactivos con la proteína NS1 de ZIKV para inhibir la unión del anticuerpo biotinilado ZKA35 a la proteína NS1 de ZIKV. Con este fin, el anticuerpo ZKAK específico para ZIKV ZKA35 se biotiniló utilizando el kit de biotinilación en fase sólida EZ-Link NHS-PEO (Pierce). El anticuerpo ZKA35 etiquetado se analizó para determinar la unión a la proteína NS1 de ZIKV a fin de determinar la concentración óptima de ZKA35 para lograr una unión máxima de 70%. Las muestras de plasma de los donantes inmunes a ZIKV- (n=4), DENV (n=5) y el plasma de control (n=48) (dilución 1/10) se añadieron a las placas de ELISA recubiertas con NS1 de ZIKV. Después de 1 h, se añadió el anticuerpo anti-NS1 de ZIKV biotinilado, ZKA35, a la concentración, con lo que se consiguió una unión máxima de 70% y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se lavaron las placas, se añadió sustrato (p-NPP, Sigma) y se leyeron las placas a 405 nm. El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera: ((1−[(DO muestra−DO ctrl neg)/(DO ctrl pos−DO ctrl neg)]) × 100

Los resultados se muestran en la Figura 7. Cabe destacar que la unión del anticuerpo ZKA35 al sitio antigénico S2 en NS1 fue inhibida sólo por muestras de plasma de donantes inmunes a ZIKV, pero no por donantes inmunes a DENV, y su unión tampoco fue inhibida por 48 muestras de control de plasma (Figura 7). En consecuencia, este ensayo puede usarse para detectar específicamente infecciones por ZIKV clínicas y subclínicas a nivel de la población.

Ejemplo 5: Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención neutralizan potentemente la infección por ZIKV

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

La neutralización de la infección por DENV y ZIKV mediante anticuerpos se midió utilizando un ensayo basado en la citometría de flujo de micro-neutralización. Se mezclaron diferentes diluciones de anticuerpos con ZIKV (MOI de 0,35) o DENV1 atenuado (todos a MOI de 0,04) durante 1 hora a 37°C y se añadieron a 5000 células Vero/pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos. Después de cuatro días para ZIKV y cinco días para DENV, las células se fijaron con formaldehído al 2%, se permeabilizaron en PBS al 1% de FCS al 0,5% de saponina y se tiñeron con el mAb 4G2 de ratón. Las células se incubaron con una IgG anti-ratón de cabra conjugada con Alexa Fluor488 (Jackson Immuno-Research, 115485164) y se analizaron mediante citometría de flujo. En otros casos, los datos de neutralización de ZIKV también se determinan al medir la viabilidad celular utilizando el reactivo WST-1 (Roche). El título de neutralización (concentración inhibitoria del 50% [CI_{50}]) se expresó como la concentración de anticuerpos que redujo la infección en un 50% en comparación con los pocillos de control de sólo células.

Los resultados se muestran en la Figura 8, la Figura 9 y la Figura 13. Los mAbs ZKA64 y ZKA190 específicos de EDIII y el mAb ZKA230 de NNB fueron altamente potentes en la neutralización de ZIKV (cepa H/PF/2013), con valores de CI_{50} de 93, 9 y 10 ng/ml, respectivamente (Figura 8, panel superior). Por el contrario, el anticuerpo ZKA78 con reactividad cruzada sólo neutralizó parcialmente la infectividad por ZIKV y la infectividad por DENV1 neutralizada de forma cruzada (Figura 8, paneles inferiores). Se obtuvieron datos similares al medir el efecto citopático inducido por ZIKV de acuerdo con lo medido con el reactivo WST-1 (Figura 9). En este segundo ensayo, el anticuerpo NNB ZKA185 también se incluyó en el panel de anticuerpos analizados y mostró una CI_{50} similar a la de los anticuerpos ZKA190 más potentes (específicos para EDIII) y ZKA230 (NNB).

Es importante tener en cuenta que los anticuerpos ultra potentes ZKA64 y ZKA190, además de su capacidad para neutralizar la cepa ZIKV H/PH/2013 (presente ejemplo), también se unen a la proteína E y al EDIII derivados de las cepas MR766 y SPH2015 de ZIKV, respectivamente (Figura 1 y Figura 3). También se confirmó que ZKA190 y ZKA190-LALA neutralizan efectivamente dos cepas de ZIKV adicionales (MR766 y MRS_OPY_Martinique_PaRi_2015) (Figura 13). En conjunto, los resultados indican que los anticuerpos ultra potentes ZKA64 y ZKA190 reaccionan de forma cruzada con múltiples cepas de ZIKV que pertenecen a diferentes genotipos y orígenes (África oriental y asiática de Uganda, Polinesia francesa, Martinica y Brasil).

Ejemplo 6: La mutación “LALA” inhibe la potenciación dependiente de anticuerpos de la infección por ZIKV mediante anticuerpos séricos

Los anticuerpos neutralizantes también se analizaron para determinar su capacidad para mejorar la infección por ZIKV en las células K562 no permisivas (ensayo de potenciación dependiente de anticuerpos, ensayo ADE). La ADE se midió mediante un ensayo basado en flujo utilizando células K562. Los anticuerpos y ZIKV H/PF/2013 (MOI de 0,175) se mezclaron durante 1 hora a 37°C y se añadieron a 5000 células K562 /pocillo. Después de cuatro días, las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con m4G2. El número de células infectadas se determinó mediante citometría de flujo.

Los resultados se muestran en la Figura 10. Todos los anticuerpos potenciaron la infección de ZIKV en las células K562 no permisivas en un amplio rango de concentraciones, incluyendo aquellos que neutralizaron completamente la infección por ZIKV en las células Vero (Figura 10). Es de destacar que, mientras que los anticuerpos ZKA64 y ZKA190 específicos de EDIII neutralizaron completamente las infecciones por ZIKV de células K562 por encima de 1 µg/ml, el anticuerpo NNB ZKA230 no pudo hacerlo, un resultado que podría deberse a los diferentes mecanismos de neutralización de virus libres frente a virus internalizados en el receptor Fc gamma. Por el contrario, el ZKA78 con reactividad cruzada que sólo neutralizó parcialmente la infectividad por ZIKV, potenció efectivamente la infección

por ZIKV de las células K562. Estos resultados muestran que los anticuerpos reactivos cruzados provocados por la infección por ZIKV o DENV pueden mediar la ADE heteróloga.

En vista de ello, se investigó si la ADE también podía ser inducida por sueros inmunes y si esto podía ser bloqueado mediante anticuerpos neutralizantes administrados como una "variante de LALA". Para obtener la variante de LALA, cada una de las cadenas pesadas se mutó en los aminoácidos 4 y 5 del dominio CH2 sustituyendo una alanina en lugar de la leucina natural utilizando mutagénesis dirigida. Como se describió anteriormente, las variantes de LALA (de los anticuerpos IgG1 humanos) no se unen a los receptores Fc-gamma ni al complemento.

Para investigar el efecto del anticuerpo ZKA64-LALA en la ADE de ZIKV, se utilizó un ensayo de inhibición de ADE. Dado que se observó ADE de ZIKV al utilizar plasma inmune a ZIKV o DENV, se mezcló ZIKV (MOI de 0,175) con plasma de donantes primarios infectados con ZIKV o DENV durante 30 minutos a 37°C. El anticuerpo ZKA64-LALA se añadió a 50 µg/ml, se mezcló con 5000 células K562/pocillo y se incubó durante tres días. A continuación, las células se tiñeron con 4G2 y se analizaron mediante citometría de flujo.

Los resultados se muestran en la Figura 11. En un entorno homólogo, cuatro plasmas inmune a ZIKV recolectados de pacientes convalecientes y un plasma inmune a DENV mostraron una capacidad similar para potenciar la infección por ZIKV de células K562 (Figura 11, panel superior), y este efecto ADE fue completamente bloqueado por el anticuerpo ZKA64-LALA específico para EDIII (Figura 11, panel inferior).

Cabe destacar que el efecto ADE del plasma inmune a ZIKV y DENV fue completamente bloqueado por el anticuerpo ZKA64-LALA específico para EDIII. La capacidad de bloqueo de ADE de un único anticuerpo LALA específico para EDIII podría estar relacionada no sólo con su capacidad para superar a los anticuerpos potenciadores del suero, sino también para neutralizar el virus una vez internalizado en los endosomas.

Estos resultados indican que un anticuerpo potencialmente neutralizante, tal como ZKA190, ZKA230, ZKA185 o ZKA64, desarrollado en forma "LALA", tiene un gran potencial para ser utilizado en entornos profilácticos o terapéuticos para prevenir la infección congénita por ZIKV, por ejemplo, en mujeres embarazadas y/o en personas que viven en zonas de alto riesgo. El uso de la forma LALA evita el riesgo de ADE de ZIKV y, como se muestra anteriormente, también podría bloquear la ADE de los anticuerpos de reacción cruzada preexistentes, como en el caso de pacientes que ya son inmunes a DENV.

Ejemplo 7: Análisis de muestras de residentes europeos utilizando anticuerpos específicos contra la proteína NS1 de ZIKV para el diagnóstico de la infección por ZIKV

El presente ejemplo se basa en el ensayo de bloqueo de unión descrito en el Ejemplo 4. Para evaluar más a fondo la especificidad del ensayo BOB de la proteína NS1 de ZIKV, se

analizó un gran conjunto de muestras obtenidas de pacientes infectados con virus DENV, WNV o del Chikungunya (“CHIKV”, por sus siglas en inglés).

Para este fin, se utilizó un ensayo de “bloqueo de unión”. Las placas de poliestireno se recubrieron durante la noche con 1 µg/ml de NS1 de ZIKV y se bloquearon durante 1 hora con PBS que contenía BSA al 1%. Se añadió plasma o suero (dilución 1:10) a placas de ELISA recubiertas con NS1. Posteriormente, por ejemplo, después de 1 hora, se añadió un volumen igual de anti-NS1 ZKA35 biotinilado y la mezcla se incubó, por ejemplo, a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las placas se lavaron y se añadió estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina, por ejemplo, durante 30 minutos. Las placas se lavaron de nuevo y se añadió el sustrato. El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera: ((1−[(DO muestra−DO ctrl neg)/(DO ctrl pos−DO ctrl neg)]) × 100

Los resultados se muestran en la Figura 14. Treinta y una de las 32 muestras (96,9%) de pacientes con WNV se recolectaron más de 10 días después de que el inicio de los síntomas fuera negativo. Cabe destacar que el único positivo se obtuvo a partir de una muestra recolectada en 2016. Dos de las 27 muestras de pacientes con DENV recolectadas más de 10 días después de la aparición de los síntomas tuvieron una calificación positiva, y las dos muestras positivas se derivaron de infecciones secundarias por DENV. Además, ninguna de las muestras derivadas de pacientes con chikungunya o de pacientes vacunados contra YFV obtuvo una calificación positiva. También se probó un gran número de muestras de plasma de donantes de sangre suizos (n=116) recolectadas entre 2010 y 2016. Ninguna de esas muestras obtuvo un resultado positivo. Los resultados obtenidos confirmaron y reforzaron la alta sensibilidad y especificidad del ensayo ELISA de bloqueo de unión de NS1.

Ejemplo 8: Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención neutraliza ZIKV más potentemente que el anticuerpo mAb C8 de EDE1 de la técnica anterior.

Para comparar los anticuerpos neutralizantes de acuerdo con la presente invención con anticuerpos anti-ZIKV altamente neutralizantes de la técnica anterior, se comparó el rendimiento de neutralización de ZKA190 con el mAb C8 del epítopo de dímero envolvente 1 (EDE1) altamente neutralizante de la técnica anterior (Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney MC, Medits I, Sharma A, Simon-Lorière E, Sakuntabhai A, Cao-Lormeau VM, Haouz A, England P, Stiasny K, Mongkolsapaya J, Heinz FX, Screaton GR, Rey FA. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. Nature. 4 de agosto de 2016; 536(7614):48-53). La neutralización de ambos anticuerpos se analizó contra un panel de cuatro cepas distintas de ZIKV (H/PF/2013; MR766, MRS-OPY y PV10552).

Brevemente, la neutralización de la infección por ZIKV mediante mAbs se midió utilizando un ensayo basado en citometría de flujo de micro-neutralización. Diferentes diluciones de mAbs se mezclaron con ZIKV (MOI de 0,35) durante 1 hora a 37°C y se añadieron a 5000 células Vero/pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos. Después de

cuatro días para ZIKV, las células se fijaron con formaldehído al 2%, se permeabilizaron en PBS que contenía suero de ternera fetal al 1% (Hyclone) y saponina al 0,5%, y se tiñeron con el mAb 4G2 de ratón. Las células se incubaron con una IgG anti-ratón de cabra conjugada con Alexa Fluor488 (Jackson Immuno-Research, 115485164) y se analizaron mediante citometría de flujo. El título de neutralización (concentración inhibitoria del 50% [CI_{50}]) se expresa como la concentración de anticuerpos que redujo la infección en un 50% en comparación con los pocillos de control de sólo virus.

Los resultados se muestran en la Figura 15. El mAb ZKA190 neutralizó potentemente las cepas africanas, asiáticas y americanas con una CI_{50} que oscilaba entre 0,6 y 8 ng/ml. En comparación, el anticuerpo C8 de la técnica anterior era aproximadamente 24 veces menos potente.

Ejemplo 9: Caracterización adicional del anticuerpo ZKA190

La potencia del anticuerpo ZKA190 se investigó adicionalmente *in vitro* e *in vivo*. Para este fin, el mAb se sintetizó en formato de tipo silvestre ("wt", por sus siglas en inglés) de IgG1 y en un formato de Fc-LALA de IgG1. Brevemente, las secuencias V_H y V_L se clonaron en vectores de expresión humanos de Igγ1, Igκ e Igλ (amablemente proporcionados por Michel Nussenzweig, Rockefeller University, Nueva York, NY, EE.UU.), esencialmente tal como se describe (Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H: Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. J Immunol Methods 2008, 329:112–124). Los mAb recombinantes se produjeron mediante transfección transitoria de células EXPI293 (Invitrogen), se purificaron mediante cromatografía de proteína A (GE Healthcare) y se desalaron frente a PBS. Para obtener la variante de LALA, cada una de las cadenas pesadas se mutó en los aminoácidos 4 y 5 del dominio CH2 sustituyendo una alanina en lugar de la leucina natural utilizando mutagénesis dirigida. Como se describió anteriormente, las variantes de LALA (de los anticuerpos IgG1 humanos) no se unen a los receptores Fc-gamma ni al complemento.

Como se muestra en la Figura 15A y se describe en el Ejemplo 8, ZKA190 se analizó contra un panel de cuatro cepas de ZIKV. El mAb ZKA190 neutralizó potentemente las cepas africanas, asiáticas y americanas con una CI_{50} que oscilaba entre 0,004 y 0,05 nM (Figura 15A; 0,6 a 8 ng/ml).

Dado que se ha demostrado que ZIKV infecta células progenitoras neuronales humanas (hNPC), lo que conduce a un aumento de la toxicidad celular, la desregulación del ciclo celular y la disminución del crecimiento celular, ZKA190 y ZKA190-LALA se analizaron en hNPC. Con este fin, se reprogramaron fibroblastos masculinos adultos obtenidos en el Bio-Banco de Trastornos del Movimiento (Unidad de Neurogenética del Instituto Neurológico "Carlo Besta", Milán) utilizando el kit CytoTune-iPS 2.0 Sendai (Life Technologies). Las hPSCs se mantuvieron en condiciones libres de alimentador en mTeSR1 (STEMCELL Technologies).

Para generar cuerpos embrioides (“EBs”, por sus siglas en inglés), las hiPSCs disociadas se colocaron en placas de baja adhesión en mTeSR1 suplementado con N2 (0,5x) (ThermoFisher Scientific), nogina humana (0,5 mg/ml, R&D System), SB431542 (5 µM, Sigma), Y27632 (10 µM, Miltenyi Biotec) y penicilina/estreptomicina (1%, Sigma) (tal como se describe en Marchetto MCN, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR: A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. Cell 2010, 143:527–539). Para obtener rosetas, los EBs se sembraron después de 10 días en placas recubiertas con matrigel (1:100, factor de crecimiento de matrigel reducido, Corning) en medio de Eagle modificado de Dulbecco (“DMEM”, por sus siglas en inglés)/F12 (Sigma) con N2 (1:100), aminoácidos no esenciales (1%, ThermoFisher Scientific) y penicilina/estreptomicina. Después de 10 días, las células se pasaron con Accutase (Sigma) y se sembraron en matraces recubiertos con matrigel en medios NPC que contenían DMEM/F12, N2 (0,25%), B27 (0,5%, ThermoFisher Scientific), penicilina/estreptomicina y factor de crecimiento de fibroblastos 2 (“FGF2”, por sus siglas en inglés) (20 ng/ml, ThermoFisher Scientific). Las hNPCs (3x104) se colocaron en cubreobjetos en placas de 24 pocillos 3 días antes de la infección con la cepa PRVABC59. El stock de virus se incubó con los mAbs 1 h antes de la adición a las hNPC para obtener una MOI de 0,5. Después de 4 h de adsorción del virus, se eliminó el sobrenadante del cultivo y se volvió a añadir medio fresco que contenía los mAbs. El sobrenadante se recolectó 96 h después de la infección para medir los títulos de virus mediante el ensayo de placa en células Vero. Las células se fijaron en solución de paraformaldehído al 4% (PFA, Sigma) en solución salina amortiguada con fosfato (PBS, Euroclone) durante 30 minutos para la inmunofluorescencia indirecta. Las células fijas se permeabilizaron durante 30 minutos (min) en una solución de bloqueo, que contenía Triton X-100 (Sigma) al 0,2% y suero de burro (Sigma) al 10%, y se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios en la solución de bloqueo. Se usó el siguiente anticuerpo para la detección: anti-envolvente (1:200, Millipore, MAB10216). A continuación, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 hora con Hoechst y anticuerpos secundarios anti-ratón Alexa Fluor-488 (1:1000 en solución de bloqueo, ThermoFisher Scientific). Después de los lavados con PBS, las células se lavaron de nuevo y se montaron. Los resultados se muestran en la Figura 16A. Tanto ZKA190 como ZKA190-LALA eliminaron completamente la infección y la replicación de ZIKV en las hNPCs.

A continuación, se analizó la capacidad de ZKA190 y ZKA190-LALA para causar ADE en la línea celular K562, tal como se describe en el Ejemplo 6. Brevemente, la ADE se midió mediante un ensayo basado en flujo utilizando células K562. Brevemente, para ZKA190, ZKA190 y ZIKV H/PF/2013 (MOI de 0,175) se mezclaron durante 1 hora a 37°C y se añadieron a 5000 células K562/pocillo. Después de cuatro días, las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con mAb m4G2. El número de células infectadas se determinó

mediante citometría de flujo. Para ZKA190-LALA, se mezcló ZIKV (MOI de 0,175) con plasma de donantes primarios infectados con ZIKV durante 30 minutos a 37°C. ZKA190-LALA se añadió a 50 µg/ml, se mezcló con 5000 células K562/pocillo y se incubó durante tres días. A continuación, las células se tiñeron con 4G2 y se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 16B. ZKA190 permite la ADE de 0,0001 a 1 nM; como se esperaba, ZKA190-LALA no mostró ninguna actividad de ADE. También se probó la capacidad de ZKA190-LALA para inhibir la ADE inducida por el plasma de cuatro donantes inmunes a ZIKV en células K562. Los resultados se muestran en la Figura 16C. Se encontró que ZKA190-LALA inhibía completamente la ADE inducida por los anticuerpos plasmáticos (Figura 16C).

Los anticuerpos anti-prM forman parte de los anticuerpos predominantes provocados durante la respuesta inmune humana contra los flavivirus y se ha demostrado que potencian la infección del virus *in vitro* (Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirisakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., Puttikhunt, C., Edwards, C., Duangchinda, T., Supasa, S., et al. (2010). Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. Science 328, 745–748). Las células K562 se preincubaron con diluciones seriadas del anticuerpo DV62 con reactividad cruzada con prM (Beltramello, M., Williams, KL, Simmons, CP, Macagno, A., Simonelli, L., Quyen, NTH, Sukupolvi-Petty, S., Navarro-Sanchez, E., Young, PR, de Silva, AM, et al. (2010). The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. Cell Host Microbe 8, 271–283) derivado de un donante inmune a DENV. Los resultados se muestran en la Figura 16D. DV62 reaccionó de forma cruzada con la proteína prM de ZIKV y causó ADE en un amplio rango de concentraciones (Figura 16D). ZKA190-LALA puede bloquear completamente la ADE inducida por el mAb DV62 anti-prM de partículas de ZIKV inmaduras o parcialmente inmaduras (Figura 16D).

Finalmente, se analizó la capacidad de diferentes concentraciones de ZKA190, ZKA190-LALA y Fab de ZKA190 para causar o bloquear la ADE de ZIKV en presencia de concentraciones elevadas de plasma anti-DENV2 humano o DV62. Los resultados se muestran en la Figura 16E. A bajas concentraciones, ZKA190 incrementó la ADE mediada por DV62 de prM de la infección por ZIKV, en concordancia con su capacidad para promover la entrada de viriones maduros e inmaduros, mientras que, a concentraciones por encima de 1,3 nM (es decir, 200 ng/ml), ZKA190 bloqueó la ADE inducida tanto por plasma de DENV como mAb DV62. ZKA190-LALA, así como su fragmento Fab, redujeron la ADE a concentraciones por encima de 0,06 nM, lo que indica que ambos inhibieron la infección del virus en un paso posterior a la unión, tal como la fusión.

Ejemplo 10: ZKA190 se une a una región conservada y altamente accesible de EDIII

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

Brevemente, los espectros se registraron en un espectrómetro de RMN de 700 MHz Bruker Avance a 300 K. Para las asignaciones de resonancias de la cadena principal se utilizaron experimentos de resonancia triple estándar (HNCO, HN(CA)CO, HN(CO)CACB, HNCACB), mientras que las cadenas laterales se anotaron usando experimentos de HCCH-TOCSY y HBHA(CO)NH. Todos los experimentos de RMN se procesaron con el software Topspin 2.1 (Bruker Biospin) y se analizaron con la aplicación de software CARA. Los picos cruzados de NOESY se asignaron automáticamente utilizando la macro de CYANA “noeassign” basada en los desplazamientos químicos asignados manualmente. Las restricciones de distancia superior utilizadas para los cálculos de estructura en CYANA utilizando el protocolo de apareamiento simulado estándar se derivaron de los espectros NOESY de 70 ms resueltos con ^{15}N y ^{13}C. La dinámica de la cadena principal del EDIII de ZIKV se derivó de mediciones de relajación de ^{15}N registradas en espectrómetros de 600 y 700 MHz. Se utilizaron versiones detectadas por protones de la tasa de relajación (R2) de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), inversión-recuperación (R1) y efecto nuclear Overhauser (“NOE”, por sus siglas en inglés) de estado estable de $^{15}N\{^{1}H\}$. Los ajustes de retardo para la serie T2 estaban en el rango de 0 a 0,25 segundos y para la serie T1 entre 0,02 y 2 segundos. El experimento NOE de $^{15}N\{^{1}H\}$ utilizó un retraso de relajación de 5 s. Las tasas de relajación de R1 y R2 se derivaron de ajustes de mínimos cuadrados de las funciones exponenciales correspondientes a los datos medidos utilizando scripts de escritura propia. Los datos de relajación se analizaron en un enfoque sin modelo utilizando el paquete de software DYNAMICS. El programa ROTDIF se utilizó para calcular el tiempo de correlación global a partir de los datos de relajación (8,5 ns). El mapeo del epítopo de RMN se realizó tal como se describe anteriormente (Bardelli et al., 2015; Simonelli et al., 2010; 2013). Brevemente, la superposición de los espectros $^{15}NHSQC$ de EDIII etiquetado libres o unidos al Fab de ZKA190 permitió la identificación de residuos de EDIII cuya señal de RMN cambió durante la formación del complejo, lo que indica que se vieron afectados por la unión de ZKA190. Los cambios se identificaron mediante una inspección manual y mediante la perturbación de

desplazamientos químicos (CSP) $((\Delta\delta_H)^2+(\Delta\delta_N/10)^2)^{1/2}$. Las muestras de RMN fueron típicamente 800 μM de EDIII etiquetado con [^{15}N, ^{13}C] en fosfato sódico 20 mM, NaCl 50 mM, pH 6,0. Se usaron muestras de EDIII ^{2}H,^{15}N perdeuteradas (nominalmente 70%) para el mapeo del epítopo de RMN con una relación EDIII:Fab de ZKA190 de 1:1,1; la concentración de EDIII fue típicamente de 0,4 mM.

Dado que la señal de RMN depende en gran medida del entorno químico local, los cambios en la formación del complejo identifican los residuos de antígenos que se ven afectados por la unión del anticuerpo, ya sea directamente o mediante efectos alostéricos. Al comparar los espectros de RMN de EDIII libre y unido (Figura 17A), los residuos afectados por ZKA190 se asignaron al LR de EDIII, en particular a los bucles BC, DE y FG, así como a parte de la bisagra de EDI-EDIII (Figura 18A). Estos residuos son casi idénticos entre las 217 cepas conocidas de ZIKV, con la excepción de las sustituciones en V341I y E393D en el aislado de Uganda de 1947 (Figura 17D). Estas mutaciones también están presentes en la cepa MR766 que fue neutralizada eficientemente por ZKA190 (Figura 15A). El análisis del epítopo ZKA190 en la estructura de ZIKV no compleja mostró que el epítopo es altamente accesible, excepto por el bucle FG en el vértice de 5 veces (Figura 18B y Figura 17C, molécula A).

El acoplamiento computacional seguido de la simulación de dinámica molecular, guiado y validado por la información del epítopo derivado de la RMN, así como la mutagénesis por EDIII, mostró que ZKA190 se une a través de una interfaz caracterizada por la complementariedad de carga y forma (Figura 18B y Figura 17E). El acoplamiento indica que no hay contactos directos entre ZKA190 y el bucle FG en EDIII, lo que sugiere que los cambios en sus señales de RMN al unirse al anticuerpo se derivan de los efectos alostéricos. Esta noción está respaldada por el hecho de que las mutaciones de los residuos del bucle FG en EDIII recombinante, pero no en otras regiones del epítopo, no afectaron la afinidad de unión de ZKA190 para EDIII (Figura 18B y Figura 19).

Ejemplo 11: Mecanismos de neutralización de ZKA190

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

El Fab de ZKA190 puede neutralizar el ZIKV, aunque de manera menos eficiente que la IgG correspondiente. Al unirse al enlazador de EDI-EDIII, ZKA190 (tanto Fab como IgG) podría inhibir la rotación de ~70 grados de DIII requerida para la fusión viral a la membrana de la célula huésped (Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S.L., Stura, E.A., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F.X., and Rey, F.A. (2004). Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. Embo J 23, 728–738; Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., and Harrison, S.C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after

membrane fusion. Nature 427, 313–319). Alternativamente, ZKA190 podría evitar la conexión de ZIKV a las células objetivo.

La capacidad de ZKA190 para inhibir la fusión de la membrana está respaldada por el análisis de microscopía confocal. Para este fin, las células Vero se colocaron en placas a 7500 células/pocillo, en cubreobjetos de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos, y se incubaron durante la noche. Las células se infectaron con ZIKV H/PF/2013 (MOI de 100) en presencia o ausencia de concentraciones neutralizantes de mAbs conjugados con Alexa-488 (0,7 µM) a 37°C durante 3 h, se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. El endosoma acidificado se identificó con Lysotracker rojo (Invitrogen) mediante la adición del tinte (50 nM) a las células durante los últimos 30 minutos de la incubación antes de la fijación. La fijación fue seguida por lavados extensos en PBS y glicina 50 mM y, finalmente, se prepararon los cubreobjetos para el análisis microscópico utilizando un medio de montaje Vectashield para fluorescencia con DAPI (Vector Laboratories). Las muestras se analizaron mediante microscopía confocal utilizando un microscopio Leica TCS SP5 con un objetivo de 63 ×/1,4 N.A. El análisis y procesamiento de imágenes se realizó con el software FIJI.

Los resultados se muestran en la Figura 20. El análisis de microscopía confocal muestra que ZKA190 (Fab o IgG) puede ingresar a las células Vero sólo cuando se complejan con ZIKV, a concentraciones neutralizantes que exceden la CI_{50} 10000 veces (Figura 20).

<u>Ejemplo 12: Caracterización *in vivo* del mAb ZKA190 específico de EDIII</u>

Para evaluar sus propiedades profilácticas y terapéuticas, ZKA190 y ZKA190-LALA se analizaron en ratones A129 expuestos a una dosis letal de ZIKV, cepa MP1751 (linaje africano).

Para analizar sus potencias profilácticas, ZKA190 y ZKA190-LALA se administraron un día antes de la exposición al virus.

A ratones A129 hembra (receptor IFN-alfa/beta -/-) y ratones 129Sv/Ev de tipo silvestre, de 5-8 semanas, se les administraron mAbs (ZKA190, ZKA190-LALA y el anticuerpo de control MPE8 (Corti, D., et al. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. Nature 501, 439-443 (2013)) se diluyó en PBS a diferentes dosis a través de la vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 500 µl. Los MAb se administraron 1 día antes o 1, 2, 3 o 4 días después de la exposición al virus. Los animales se estimularon subcutáneamente con 102 UFP de ZIKV (cepa MP1751) y se les dio seguimiento durante 14 días. Los pesos y las temperaturas se monitorearon diariamente y las observaciones clínicas se registraron al menos dos veces por día. En el día 5 posterior a la exposición, se recolectaron 50 µl de sangre de cada animal en un tubo RNAprotect (Qiagen, Reino Unido) y se congelaron a -80°C. Al final del estudio (14 días después de la exposición) o cuando los animales cumplieron con los criterios de valoración humanitarios, se realizaron necropsias y

se extrajeron muestras de sangre, cerebro, bazo, hígado, riñón y ovario para el análisis virológico.

Se pesaron muestras de tejido de ratones A129 y se homogeneizaron en PBS utilizando bolas de cerámica y un homogeneizador automático (Precellys, Reino Unido) utilizando seis ciclos de 5 segundos de 6500 rpm con un espacio de 30 segundos. Se transfirieron 200 µl de homogeneizado de tejido o solución de sangre a 600 µl de solución amortiguadora RLT (Qiagen, Reino Unido) para la extracción de ARN utilizando el kit de extracción RNeasy Mini (Qiagen, Reino Unido); las muestras se pasaron a través de un homogeneizador QIAshredder (Qiagen, Reino Unido) como paso inicial. Se utilizó un ensayo de RT-PCR en tiempo real específico de ZIKV para la detección del ARN viral de los animales en cuestión. Las secuencias de cebador y sonda se adoptaron de Quick et al., 2017 (Quick, J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, Oliveira G, Robles-Sikisaka R, Rogers TF, Beutler NA, et al.: Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. Nat Protoc 2017, 12: 1261-1276) con optimización y validación internas realizadas para proporcionar una mezcla óptima y condiciones de ciclado. La RT-PCR en tiempo real se realizó con el kit qRT-PCR SuperScript III Platinum One-step (Life Technologies, Reino Unido). La mezcla maestra final (15 µl) estaba compuesta por 10 µl de 2x mezcla de reacción, 1,2 µl de agua de grado de PCR, 0,2 µl de $MgSO_4$ 50 mM, 1 µl de cada cebador (ZIKV 1086 y ZIKV 1162c, ambos a una concentración de trabajo de 18 µM), 0,8 µl de sonda (ZIKV 1107-FAM a una concentración de trabajo de 25 µM) y 0,8 µl de mezcla de enzimas SSIII. Se añadieron cinco µl de ARN de plantilla a la mezcla maestra, produciendo un volumen de reacción final de 20 µl. Las condiciones de ciclado utilizadas fueron 50°C durante 10 minutos, 95°C durante 2 minutos, seguidas de 45 ciclos de 95°C durante 10 segundos y 60°C durante 40 segundos, más un paso de enfriamiento final de 40°C durante 30 segundos. El análisis de cuantificación con fluorescencia se realizó al final de cada paso de 60°C. Las reacciones se ejecutaron y analizaron en la plataforma 7500 FAST (Life Technologies, Reino Unido) utilizando la versión de software 7500 2.0.6. La cuantificación de la carga viral en muestras se realizó utilizando una serie de diluciones de oligonucleótido de ARN cuantificado (Integrated DNA Technologies). El oligonucleótido comprendía las 77 bases del ARN de ZIKV que era el blanco del ensayo, con base en el número de acceso de GenBank AY632535.2 y se sintetizó a una escala de 250 nmoles con purificación por HPLC.

Los resultados se muestran en la Figura 21, la Figura 22 y la Figura 23. ZKA190 y ZKA190-LALA protegieron a los ratones de la mortalidad y la morbilidad a concentraciones de 5,1 o 0,2 mg/kg (Figura 21A-Figura 21B). ZKA190-LALA, y en menor medida ZKA190, retrasó la morbilidad y la mortalidad en comparación con el grupo de control a 0,04 mg/kg. Los títulos víricos en sangre y órganos se redujeron significativamente en comparación con los animales

de control tratados con anticuerpos, incluso en presencia de niveles de anticuerpos séricos por debajo de 1 µg/ml (Figura 22A, Figura 22B, Figura 22C, Figura 22D).

Para evaluar el potencial terapéutico de ZKA190, administramos ZKA190 y ZKA190-LALA en diferentes intervalos de tiempo después de la infección por ZIKV. Con una dosis de 15 mg/kg, se consiguieron tasas de supervivencia del 80% al 100%, y la morbilidad se redujo considerablemente incluso cuando el tratamiento se administró cuatro días después de la infección (Figura 21E, Figura 21F, Figura 21G). El tratamiento con ZKA190 y ZKA190-LALA en todos los intervalos de tiempo posteriores a la infección dio lugar a títulos virales significativamente reducidos, en comparación con los animales tratados con el anticuerpo de control, con una clara tendencia a una mayor reducción con el tratamiento más temprano (Figura 23A, Figura 23B, Figura 23C). Cabe destacar que ZKA190-LALA mostró una actividad antiviral significativamente reducida en la muestra de sangre del día 5 en comparación con ZKA190 cuando se administraron mAb cuatro días después de la infección, un resultado que podría estar relacionado con la capacidad alterada de la variante de LALA para facilitar la eliminación rápida de viriones recubiertos.

Tablas de secuencias y números de identificación de secuencias

AAAAA

ZKA190	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	1	**GFTFSKYG**
CDRH2	2	**ISYEGSNK**
CDRH3	3	**AKSGTQYYDTTGYEYRGLEYFGY**
CDRL1	4	**QSVSSSY**
CDRL2	5	**DAS**
CDRL2 larga	6	LIY**DAS**SRA
CDRL3	7	**QQYGRSRWT**
V_H	8	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSKYG**MHWVRQA PGKGLEWVAV**ISYEGSNK**YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYC**AKSGTQYYDTTGYEYRGLEYFGY**WGQ GTLVTVSS
V_L	9	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS**QSVSSSY**LAWYQQKR GQAPRLLIY**DAS**SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYC**QQYGRSRWT**FGQGTKVEIK

ZKA190	SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
CDRH1	10	**ggattcaccttcagtaaatatggc**
CDRH2	11	**atatcatatgagggaagtaataaa**
CDRH3	12	**gcgaaatcggggacccaatactatgatactactggttatgagtatagggggtttg gaatactttggctac**
CDRL1	13	**cagagtgttagtagcagttac**
CDRL2	14	**gatgcatcc**
CDRL2 larga	15	ctcatctat**gatgcatcc**agcagggcc
CDRL3	16	**cagcagtatggtaggtcaaggtggaca**
V_H	17	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgag actctcctgtgcagcctct**ggattcaccttcagtaaatatggc**atgcactgggtccg ccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagtt**atatcatatgagggaagt aataaa**tattatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattcc aagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggcagtgt attactgt**gcgaaatcggggacccaatactatgatactactggttatgagtatag gggtttggaatactttggctac**tggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcag
V_L	18	gaaattgtgttgacgcagtctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagagcca ccctctcctgcagggccagt**cagagtgttagtagcagttac**ttagcctggtaccagc agaaacgtggccaggctcccaggctcctcatctat**gatgcatcc**agcagggccact ggcatcccagacaggttcagtggcagtgggtctgggacagacttcactctcaccatc agcagactggagcctgaagattttgcagtgtattactgt**cagcagtatggtaggtca aggtggaca**ttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaac

ZKA185	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
CDRH1	19	**GYSFTSYW**
CDRH2	20	**FDPSDSQT**

CDRH3	21	**ARRYCSSSSCYVDN**
CDRL1	22	**ALPNKF**
CDRL2	23	**EDN**
CDRL2 larga	24	VIY**EDN**KRP
CDRL3	25	**YSTDSSSNPLGV**
V_H	26	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGS**GYSFTSYW**ITWVRQMPGKGLEWMAK**FDPSDSQT**NYSPSFQGHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC**ARRYCSSSSCYVDN**WGQGTLVTIFS
V_L	27	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGD**ALPNKF**AYWYRQKSGQAPVLVIY**EDN**KRPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYHC**YSTDSSSNPLGV**FGGGTKLTVL

ZKA185	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de ácido nucleico**
CDRH1	28	**ggatatagttttaccagttactgg**
CDRH2	29	**tttgatcctagtgactctcaaacc**
CDRH3	30	**gcgagaagatattgtagtagtagtagttgttatgtggacaat**
CDRL1	31	**gcattgccaaataaattt**
CDRL2	32	**gaggacaac**
CDRL2 larga	33	gtcatctat**gaggacaac**aaacgaccc
CDRL3	34	**tactcaacagacagcagttctaatcccctgggagta**
V_H	35	gaagtgcagctggtgcagtccggagcagaggtgaaaaagcccggggagtctctg aggatctcctgtaagggttct**ggatatagttttaccagttactgg**atcacctgggtgc gccagatgcccgggaaaggcctggagtggatggcgaag**tttgatcctagtgact ctcaaacc**aactacagcccgtccttccaaggccacgtcaccatctcagttgacaag tccatcagcactgcctacttgcagtggagcagcctgaaggcctcggacaccgccat gtattactgt**gcgagaagatattgtagtagtagtagttgttatgtggacaat**tggg gccagggaaccctggtcaccatcttctcag

V_L	36	tcctatgagctgacacagccaccctcggtgtcagtgtccccaggacaaacggcca ggatcacctgctctggagat**gcattgccaaataaattt**gcttattggtaccggcaga agtcaggccaggcccctgttctggtcatctat**gaggacaac**aaacgaccctccgg gatccctgagagattctctggctccagctcagggacaatggccaccttgactatcagt ggggcccaggtggaggatgaagctgactaccactgt**tactcaacagacagcagt tctaatcccctgggagta**ttcggcggagggaccaagctgaccgtcctag

ZKA230	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
CDRH1	37	**GGSISSDY**
CDRH2	38	**IYYSGST**
CDRH3	39	**ARRRKYDSLWGSFAFDI**
CDRL1	40	**SSNIGGNY**
CDRL2	41	**IND**
CDRL2 larga	42	LIC**IND**HRP
CDRL3	43	**ATWDDSLGGLV**
V_H	44	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVS**GGSISSDY**WSWIRQPP GKGLEWIGY**IYYSGST**NYNPSLKSRVTISVDTSKNHFSLKLNS VTAADTAVYYC**ARRRKYDSLWGSFAFDI**WGQGTMVTVSS
V_L	45	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS**SSNIGGNY**VYWYQQLP GTAPKLLIC**IND**HRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDE ADYYC**ATWDDSLGGLV**FGGGTKLTVL

ZKA230	SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
CDRH1	46	**ggtggctccatcagtagtgactac**
CDRH2	47	**atctattacagtgggagcacc**
CDRH3	48	**gcgaggaggaggaagtatgattccctttgggggagttttgcttttgatatc**
CDRL1	49	**agctccaacatcggaggtaattat**

CDRL2	50	**attaatgat**
CDRL2 larga	51	ctcatctgt**attaatgat**caccggccc
CDRL3	52	**gcaacatgggatgacagcctgggtggccttgta**
V_H	53	caggtgcagctgcaggagtcgggcccaggcctggtgaagccttcggagaccctgtc cctcacctgcgcagtctct**ggtggctccatcagtagtgactac**tggagctggatccg gcagcccccagggaagggactggagtggattgggtat**atctattacagtgggagc acc**aactacaacccctccctcaagagtcgagtcaccatatcagtagacacgtccaag aaccacttctccctgaagctgaactctgtgaccgctgcggacacggccgtgtattactgt **gcgaggaggaggaagtatgattccctttgggggagttttgcttttgatatc**tgggg ccaagggacaatggtcaccgtctcttcag
V_L	54	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcacc atctcttgttctggaagc**agctccaacatcggaggtaattat**gtatactggtaccagc agctcccaggaacggcccccaaactcctcatctgt**attaatgat**caccggccctcag gggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagt gggctccagtccgaggatgaggctgattattactgt**gcaacatgggatgacagcct gggtggccttgta**ttcggcggagggaccaagctgaccgtcctag

ZKA78	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
CDRH1	55	**GFTFSNYA**
CDRH2	56	**IGRNGDSI**
CDRH3	57	**VKDLAIPESYRIEADY**
CDRL1	58	**QSVLYRSNNKNY**
CDRL2	59	**WAS**
CDRL2 larga	60	LIY**WAS**TRE
CDRL3	61	**QQYYSSPRT**
V_H	62	EVQLAESGGGLVQPGGSLTLSCSGS**GFTFSNYA**MVWARQA PGKGLEYVSG**IGRNGDSI**YYTDSVKGRFTISRDNSKSMVYLQ MSSLRTEDTAVYYC**VKDLAIPESYRIEADY**WGQGTLVIVSA

V_L	63	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS**QSVLYRSNNKNY**LSWY QQKPGQPPKLLIY**WAS**TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISPL QAEDVAVYYC**QQYYSSPRT**FGQGTKVEIK

ZKA78	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de ácido nucleico**
CDRH1	64	**ggcttcacttttagtaactatgca**
CDRH2	65	**atcgggcgcaacggggactctatc**
CDRH3	66	**gtgaaagatctggccatccccgagtcctacagaattgaagctgattat**
CDRL1	67	**cagtccgtgctgtaccgctctaacaacaagaattac**
CDRL2	68	**tgggcttca**
CDRL2 larga	69	ctgatctat**tgggcttca**acccgggaa
CDRL3	70	**cagcagtactattctagtcctcgaact**
V_H	71	gaggtgcagctggcagaatcaggcgggggactggtccagcctggcggcagcctga cactgtcttgcagtggatca**ggcttcacttttagtaactatgca**atggtgtgggcaag gcaggctcctgggaagggactggagtatgtctctggc**atcgggcgcaacggggac tctatc**tactatactgatagtgtgaagggccggttcaccatcagcagagacaatagca aatccatggtgtacctgcagatgagctccctgcgaaccgaagacacagcagtgtact attgc**gtgaaagatctggccatccccgagtcctacagaattgaagctgattat**tg gggacagggcaccctggtcatcgtgagcgccg
V_L	72	gacatcgtgatgacacagtctccagatagtctggcagtcagtctgggggagagggcc actattaactgcaagagctcc**cagtccgtgctgtaccgctctaacaacaagaatta c**ctgtcttggtatcagcagaagcccggacagccccctaaactgctgatctat**tgggctt ca**acccgggaaagcggcgtcccagacagattctcaggcagcgggtccggaacag acttcaccctgacaattagccccctgcaggcagaggacgtggctgtctactattgt**cag cagtactattctagtcctcgaact**ttcggccaggggaccaaggtggaaatcaaac

ZKA64	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	73	**GYTFTGYH**

CDRH2	74	**INPNSGGT**
CDRH3	75	**ARMSSSIWGFDH**
CDRL1	76	**QSVLIN**
CDRL2	77	**GAS**
CDRL2 larga	78	LIY**GAS**SRA
CDRL3	79	**QQYNDWPPIT**
V_H	80	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTGYH**IDWVRQAR GQGLEWMGR**INPNSGGT**NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYM QLSRLRSDDSAVYYC**ARMSSSIWGFDH**WGQGTLVTVSS
V_L	81	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS**QSVLIN**LAWYQQKPGQ APRLLIY**GAS**SRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAV YYC**QQYNDWPPIT**FGQGTRLEIK

ZKA64	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de ácido nucleico**
CDRH1	82	**ggctacaccttcacagggtatcac**
CDRH2	83	**attaaccctaattctggcgggacc**
CDRH3	84	**gctcggatgagctcctctatttggggcttcgatcat**
CDRL1	85	**cagtctgtgctgattaac**
CDRL2	86	**ggagcatcc**
CDRL2 larga	87	ctgatctat**ggagcatcc**tccagggct
CDRL3	88	**cagcagtacaatgattggccccctatcaca**
V_H	89	caggtgcagctggtccagagcggagcagaggtgaagaaacccggcgcctcagtg aaggtcagctgcaaagcttcc**ggctacaccttcacagggtatcac**atcgactgggt gaggcaggcaagaggacagggactggaatggatgggacgg**attaaccctaattc tggcgggacc**aactacgcccagaagtttcagggccgagtgactatgaccagagac accagcatctccacagcttatatgcagctgtcccggctgagatctgacgatagtgccgt ctactattgt**gctcggatgagctcctctatttggggcttcgatcat**tgggggcaggg aacactggtgactgtcagttcag

V_L	90	gagatcgtgatgactcagtctccagccaccctgtcagtcagcccaggagaacgggc aaccctgtcttgcagagcctcc**cagtctgtgctgattaac**ctggcttggtaccagcag aagccaggccaggcaccccgactgctgatctat**ggagcatcc**tccagggctaccg gcattcctgcacgcttcagtggatcaggaagcggaacagagtttaccctgacaatctct agtctgcagtccgaagacttcgctgtctactattgt**cagcagtacaatgattggcccc ctatcaca**tttggccaggggactagactggagatcaagc

ZKA15	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
CDRH1	91	**GGFINSYY**
CDRH2	92	**IYKSGST**
CDRH3	93	**ARDPYGDYVKAFDI**
CDRL1	94	**QSLLHSNGYNY**
CDRL2	95	**LGS**
CDRL2 larga	96	LIY**LGS**NRA
CDRL3	97	**MQALQTVT**
V_H	98	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS**GGFINSYY**WSWIRQPA GKGLEWIGR**IYKSGST**NYNPSLKSRVTMSLDTSKYQFSLKLR SVTAADTAVYYC**ARDPYGDYVKAFDI**WGQGTMVTVSS
V_L	99	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSS**QSLLHSNGYNY**LNWYL QKPGQSPQLLIY**LGS**NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYC**MQALQTVT**FGPGTKVDIK

ZKA15	SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
CDRH1	100	**ggtggcttcatcaatagttactac**
CDRH2	101	**atctataaaagtgggagcacc**
CDRH3	102	**gcgagagatccctacggtgactacgttaaggcttttgatatt**

CDRL1	103	**cagagcctcctgcatagtaatggatacaactat**
CDRL2	104	**ttgggttct**
CDRL2 larga	105	ctgatctat**ttgggttct**aatcgggcc
CDRL3	106	**atgcaagctctacaaactgtcact**
V_H	107	caggtgcagctgcaggagtcggggccaggactggtgaagccttcggagaccctgtc cctcacctgcactgtctcc**ggtggcttcatcaatagttactac**tggagctggatccgg cagcccgccgggaagggactggagtggattgggcgt**atctataaaagtgggagca cc**aactacaacccctccctcaagagtcgagtcaccatgtcactagacacgtccaagt accagttctccctgaagctgaggtctgtgaccgccgctgacacggccgtgtattactgt **gcgagagatccctacggtgactacgttaaggcttttgatatt**tggggccaaggga caatggtcaccgtctcttcag
V_L	108	gatattgtgatgactcagtctccactctccctgcccgtcacccctggagagccggcctcc atctcctgcaggtctagt**cagagcctcctgcatagtaatggatacaactat**ttgaatt ggtacctgcagaagccagggcagtctccacagctcctgatctat**ttgggttct**aatcg ggcctccggggtccctgacaggttcagtggcagtggatcaggcacagattttacactg aaaatcagcagagtggaggctgaggatgttggggtttattactgc**atgcaagctctac aaactgtcact**ttcggccctgggaccaaagtggatatcaaac

ZKA25	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	109	**GFTFRSHW**
CDRH2	110	**IKEDGYEK**
CDRH3	111	**ARDLRVYSGRGFDP**
CDRL1	112	**KLGDKY**
CDRL2	113	**QDS**
CDRL2 larga	114	VIY**QDS**KRP

CDRL3	115	**QAWDSSTVV**
V_H	116	EVQLVESGGGLVRPGGSLRLSCAAS**GFTFRSHW**MSWVRQA PGKGLEWVAN**IKEDGYEK**YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMKSLRAEDTAVYYC**ARDLRVYSGRGFDP**WGQGTLVTVSS
V_L	117	SYELTQPPSLSVSPGQTASITCSGD**KLGDKY**ACWYQQKPGQ SPVLVIY**QDS**KRPSGIPARFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA DYYC**QAWDSSTVV**FGGGTKLTVL

ZKA25	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de ácido nucleico**
CDRH1	118	**ggattcacctttagaagtcattgg**
CDRH2	119	**ataaaggaagatggatatgagaaa**
CDRH3	120	**gcgagagatttgagggtatatagtgggagaggtttcgacccc**
CDRL1	121	**aaattgggggataaatat**
CDRL2	122	**caagatagc**
CDRL2 larga	123	gtcatctat**caagatagc**aagcggccc
CDRL3	124	**caggcgtgggacagcagcactgtggta**
V_H	125	gaggtgcagttggtggagtctgggggaggcttggtccggcctgggggtccctgaga ctctcctgtgcagcctct**ggattcacctttagaagtcattgg**atgagttgggtccgcca ggctccagggaaggggctggagtgggtggccaac**ataaaggaagatggatatga gaaa**tactatgtggactctgtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaa gaactcactgtatctgcaaatgaagagcctgagagccgaggacacggccgtgtatta ctgt**gcgagagatttgagggtatatagtgggagaggtttcgacccc**tggggcca gggaaccctggtcaccgtctcctcag

V_L	126	tcctatgagctgactcagccaccctcactgtccgtgtccccaggacagacagccagc atcacctgctctggagat**aaattgggggataaatat**gcttgctggtatcagcagaagc caggccagtcccctgtgttggtcatctat**caagatagc**aagcggccctcagggatccc tgcgcgattctctggctccaactctgggaacacagccactctgaccatcagcgggacc caggctatggatgaggctgactattactgt**caggcgtgggacagcagcactgtggt a**ttcggtggagggaccaagctgaccgtcctag

ZKA35	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
CDRH1	127	**GGSIS<u>T</u>GGYY**
CDRH2	128	**IYYSG<u>N</u>T**
CDRH3	129	**A<u>K</u>GGG<u>R</u>ERPFDY**
CDRL1	130	**SSNIG<u>R</u>NY**
CDRL2	131	**RNN**
CDRL2 larga	132	LIY**RNN**QRP
CDRL3	133	**<u>V</u>AWDDS<u>R</u>SGFVV**
V_H	134	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GGSIS<u>T</u>GGYY**WSWIRQ HPGKGLEWIGY**IYYSG<u>N</u>T**YYNPSLKSRVTISVDTSK<u>K</u>QFSLKL SSVTAADTAVYYC**A<u>K</u>GGG<u>R</u>ERPFDY**WGQGTLVTVSS
V_L	135	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS**SSNIG<u>R</u>NY**V<u>D</u>WYQQLP GTAPKLLIY**RNN**QRPSGVP<u>E</u>RFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYC**<u>V</u>AWDDS<u>R</u>SGFVV**FGGGTK<u>V</u>TVL

ZKA35	SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
CDRH1	136	**ggtggctccatcagcactggtggttactac**
CDRH2	137	**atctattacagtgggaacacc**

CDRH3	138	**gcgaaaggaggagggagggagcgacccttttgactac**
CDRL1	139	**agctccaacatcggaagaaattat**
CDRL2	140	**aggaataat**
CDRL2 larga	141	ctcatctat**aggaataat**cagcggccc
CDRL3	142	**gtagcatgggatgacagccggagtggttttgtggta**
V_H	143	caggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtc cctcacctgcactgtctct**ggtggctccatcagcactggtggttactac**tggagctg gatccgccagcacccagggaagggcctggagtggattggttac**atctattacagtg ggaacacc**tactacaacccgtccctcaagagtcgagttaccatatcagttgacacctc taagaagcagttctccctgaagctgagctctgtgactgccgcggacacggccgtgtatt actgt**gcgaaaggaggagggagggagcgacccttttgactac**tggggccaggg aaccctggtcaccgtctcctcag
V_L	144	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcacc atctcttgttctggaagc**agctccaacatcggaagaaattat**gtagactggtaccagc aactcccaggaacggcccccaaactcctcatctat**aggaataat**cagcggccctca ggggtccctgagcgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcag tgggctccggtccgaggatgaggctgattattactgt**gtagcatgggatgacagccg gagtggttttgtggta**ttcggcggagggaccaaggtgaccgtcctag

Regiones constantes	SEQ ID NO.	Secuencia
IgG1 CH1-CH2-CH3 aa	145	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG1 CH1-	146	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV

CH2-CH3 LALA aa		SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP E**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG CK aa	147	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
IgG CL aa	148	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
IgG1 CH1-CH2-CH3 nucl	149	gcgtcgaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcac ctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaac ctgtgacggtctcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttc ccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtg ccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagc ccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaa ctcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagt cttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctga ggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaAgaCcctgaggtcaagttc aactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgg gaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgc accaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaag ccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccc gagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaag aaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgc cgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacg cctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtgg acaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatga ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa
IgG1 CH1-CH2-CH3 LALA nucl	150	gcgtcgaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcac ctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaac ctgtgacggtctcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttc

		ccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtg ccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagc ccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaa ctcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaaGCCGCGgggggaccgt cagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccc ctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaa gttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccg cgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcc tgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaaca aagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcag ccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgacc aagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacat cgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacc acgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgt ggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcat gaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggta aa
IgG CK nucl	151	cgTacGgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttga aatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggcc aaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggag agtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcac cctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcga agtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacagggg agagtgt
IgG CL nucl	152	ggtcagcccaaggctgccccctcggtcactctgttcccgccctcctctgaggag cttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgacttctacccggga gccgtgacagtggcttggaaagcagatagcagccccgtcaaggcgggagtg gagaccaccacaccctccaaacaaagcaacaacaagtacgcggccagca gctatctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctg ccaggtcacgcatgaagggagcaccgtggagaagacagtggcccctacag aatgttca

ZKA10	SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
CDRH1	153	**GFTFSDSY**

CDRH2	154	**ISSSSPFT**
CDRH3	155	**ARGLVRDGYKWLYFFDY**
V_H	156	QVQLVESGGGLVEPRGSLRLSCAAS**GFTFSDSY**MSWIRQAP GKGLEWISY**ISSSSPFT**NYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYC**ARGLVRDGYKWLYFFDY**WGQGTLVTVSS
ZKA18	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	157	**GFTFSSYG**
CDRH2	158	**IWYDGSNK**
CDRH3	159	**ARDDSGYSEPFDY**
V_H	160	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSYG**MHWVRQA PGKGLEWVAV**IWYDGSNK**YYADSVKGRFTITRDNSKNTLYLQ MNSLRPEDTAVYYC**ARDDSGYSEPFDY**WGQGTLVTVSS
ZKA28	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	161	**GFTVSRNY**
CDRH2	162	**IYSGGST**
CDRH3	163	**ARWINDAFDI**
V_H	164	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAAS**GFTVSRNY**MSWVRQAP GKGLEWVSV**IYSGGST**YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC**ARWINDAFDI**WGQGTMVTVSS
ZKA29	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	165	**GFTFSRYS**
CDRH2	166	**ISPRSTTI**
CDRH3	167	**AREDCTNGVCYRVDY**
V_H	168	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVS**GFTFSRYS**MNWVRQAP GKGLEWVSY**ISPRSTTI**YYADSVEGRFTVSRDNAKNSLYLQLN SLRAEDTAVYYC**AREDCTNGVCYRVDY**WGQGTLVTVSS
ZKA33	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**

CDRH1	169	**GFTFSRNW**
CDRH2	170	**IKEDGNEK**
CDRH3	171	**ARPFHQGGYAYGLAY**
V_H	172	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSRNW**MTWVRQA PGKGLEWVAN**IKEDGNEK**YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYC**ARPFHQGGYAYGLAY**WGQGTLVTVSS
ZKA39	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	173	**GFTFSTYS**
CDRH2	174	**ISPSSSTI**
CDRH3	175	**AREYCSGGSCYLLDY**
V_H	176	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSTYS**MNWVRQAP GKGLEWVSY**ISPSSSTI**YYPDSLKGRFTISRDNAKNSLYLQMD SLRAEDTAQYYC**AREYCSGGSCYLLDY**WGQGTLVTVSS
ZKA43	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	177	**GGSITSYY**
CDRH2	178	**SHYSGST**
CDRH3	179	**ARGIYSGKNWFDP**
V_H	180	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVY**GGSITSYY**WTWIRQPPG KGLEWIGY**SHYSGST**NYNPSLKSRVTISIDTSKSQFSLNLNSVT AADTAVYYC**ARGIYSGKNWFDP**WGQGTLVTVSS
ZKA44	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	181	**GFTVSTSY**
CDRH2	182	**IYSSGST**
CDRH3	183	**ARVSLGGLDP**
V_H	184	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCVAS**GFTVSTSY**MNWVRQAP GKGLEWVSV**IYSSGST**YYADSVKGRFTISRNTSKNTLYLQMNS

		LRAEDTAVYYC**ARVSLGGLDP**WGQGTPVTVSS
ZKA46	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	185	**GFSLSNGRMG**
CDRH2	186	**IFSNDEK**
CDRH3	187	**ARVEFRAGNYLDS**
V_H	188	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVS**GFSLSNGRMG**VSWIRQP PGKALEWLAH**IFSNDEK**YYSTSLKNRLTISKDTSKSQVVLTMT NMDPVDTATYYC**ARVEFRAGNYLDS**WGQGTLVTVSS
ZKA50	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	189	**GYTFTNSW**
CDRH2	190	**IYPGDSDT**
CDRH3	191	**ARQPFFDY**
V_H	192	EVQLVQSGAQVKKPGESLKISCKAS**GYTFTNSW**IGWVRQMP GKGLEWMGI**IYPGDSDT**RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWS SLKASDTAMYYC**ARQPFFDY**WGQGTLVTVSS
ZKA54	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	193	**GYTFTGYY**
CDRH2	194	**INANSGGT**
CDRH3	195	**AHSDIVVVPSDDYYALDV**
V_H	196	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTS**GYTFTGYY**MHWVRQAP GQGLEWMGW**INANSGGT**NFAQRFQGRVTMTWDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYC**AHSDIVVVPSDDYYALDV**WGQGTTVTV SS
ZKB18	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	197	**GYSFTSYW**
CDRH2	198	**IYPGDSDT**
CDRH3	199	**ARQTPGDY**

V_H	200	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKTF**GYSFTSYW**IGWVRQMPG KGLEWMGM**IYPGDSDT**RYSPSFQGQVTISADMSISTAYLQWS SLKASDTAMYYC**ARQTPGDY**WGQGTLVTVSS
ZKB20	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	201	**GYFFTRYV**
CDRH2	202	**INTDNGST**
CDRH3	203	**ARGTGRDGYNSFFAN**
V_H	204	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKAS**GYFFTRYV**ILWVRQAPG QRPEWMGW**INTDNGST**RYSQKFQGRVTITKDTSATTAYMDLS SLKSDDTAVYYC**ARGTGRDGYNSFFAN**WGQGTLVTVSP
ZKB21	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	205	**GYTFTGYS**
CDRH2	206	**IDTNSGDT**
CDRH3	207	**ARDRERHPFSY**
V_H	208	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTGYS**IHWVRQAP GQGLAWMGR**IDTNSGDT**NYAERFQGRVTMTRDTSISTAYME VRRLRSDDTAVYYC**ARDRERHPFSY**WGQGTLVTVSS
ZKB23	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	209	**GGSISSGDYS**
CDRH2	210	**ITHSGTT**
CDRH3	211	**ARHFGWFDP**
V_H	212	QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVS**GGSISSGDYS**WSWIRQP PGKGLEWIGY**ITHSGTT**YFNPSLKSRVTISVDRSRNQFSLKVT SVTAADTAVYYC**ARHFGWFDP**WGQGTLVTVSS
ZKC29	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	213	**GGSISSGEYF**

CDRH2	214	**IHNRGNT**
CDRH3	215	**ARGGGDLVVVPDSIWDYYGMDV**
V_H	216	QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVS**GGSISSGEYF**WTWIRQH PKKGLEWIGY**IHNRGNT**YYNPSLKSRLSISLDTSKNHLSLRLSS VTAADTAVYYC**ARGGGDLVVVPDSIWDYYGMDV**WGQGTTVT VSS
ZKC31	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	217	**GGSISSGGYH**
CDRH2	218	**IYYSGST**
CDRH3	219	**ARDRSEPGEYHYYYYAMDV**
V_H	220	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GGSISSGGYH**WSWIRQH PGKGLEWIGY**IYYSGST**YYNPSLKRRVTISVDTSKNQFSLKLSS VSAADTAVYYC**ARDRSEPGEYHYYYYAMDV**WGQGTTVTVSS
ZKC32	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	221	**GFTVSSNY**
CDRH2	222	**IYSSGST**
CDRH3	223	**ARGKKGNAFDI**
V_H	224	EVQLVESGGDLIQPGGSLRLSCAAS**GFTVSSNY**MSWVRQAP GKGLEWVSV**IYSSGST**YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAGDTAVYYC**ARGKKGNAFDI**WGQGTVVTVSS
ZKC33	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	225	**GDSISSRTFS**
CDRH2	226	**IYYSGST**
CDRH3	227	**ARRNAEFFSFWSYYGMDV**
V_H	228	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GDSISSRTFS**WSWIRQP PGKGLEWVGH**IYYSGST**DYNPSLKSRISISIDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYC**ARRNAEFFSFWSYYGMDV**WGHGTAVIVSS

ZKA10	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	153	**GFTFSDSY**
CDRH2	154	**ISSSSPFT**
CDRH3	155	**ARGLVRDGYKWLYFFDY**
V_H	156	QVQLVESGGGLVEPRGSLRLSCAAS**GFTFSDSY**MSWIRQAP GKGLEWISY**ISSSSPFT**NYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYC**ARGLVRDGYKWLYFFDY**WGQGTLVTVSS
ZKA18	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	157	**GFTFSSYG**
CDRH2	158	**IWYDGSNK**
CDRH3	159	**ARDDSGYSEPFDY**
V_H	160	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSYG**MHWVRQA PGKGLEWVAV**IWYDGSNK**YYADSVKGRFTITRDNSKNTLYLQ MNSLRPEDTAVYYC**ARDDSGYSEPFDY**WGQGTLVTVSS
ZKA28	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	161	**GFTVSRNY**
CDRH2	162	**IYSGGST**
CDRH3	163	**ARWINDAFDI**
V_H	164	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAAS**GFTVSRNY**MSWVRQAP GKGLEWVSV**IYSGGST**YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC**ARWINDAFDI**WGQGTMVTVSS
ZKA29	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	165	**GFTFSRYS**
CDRH2	166	**ISPRSTTI**
CDRH3	167	**AREDCTNGVCYRVDY**
V_H	168	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVS**GFTFSRYS**MNWVRQAP GKGLEWVSY**ISPRSTTI**YYADSVEGRFTVSRDNAKNSLYLQLN

		SLRAEDTAVYYC**AREDCTNGVCYRVDY**WGQGTLVTVSS
ZKA33	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	169	**GFTFSRNW**
CDRH2	170	**IKEDGNEK**
CDRH3	171	**ARPFHQGGYAYGLAY**
V_H	172	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSRNW**MTWVRQA PGKGLEWVAN**IKEDGNEK**YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYC**ARPFHQGGYAYGLAY**WGQGTLVTVSS
ZKA39	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	173	**GFTFSTYS**
CDRH2	174	**ISPSSSTI**
CDRH3	175	**AREYCSGGSCYLLDY**
V_H	176	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSTYS**MNWVRQAP GKGLEWVSY**ISPSSSTI**YYPDSLKGRFTISRDNAKNSLYLQMD SLRAEDTAQYYC**AREYCSGGSCYLLDY**WGQGTLVTVSS
ZKA43	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	177	**GGSITSYY**
CDRH2	178	**SHYSGST**
CDRH3	179	**ARGIYSGKNWFDP**
V_H	180	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVY**GGSITSYY**WTWIRQPPG KGLEWIGY**SHYSGST**NYNPSLKSRVTISIDTSKSQFSLNLNSVT AADTAVYYC**ARGIYSGKNWFDP**WGQGTLVTVSS
ZKA44	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	181	**GFTVSTSY**
CDRH2	182	**IYSSGST**
CDRH3	183	**ARVSLGGLDP**

V_H	184	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCVAS**GFTVSTSY**MNWVRQAP GKGLEWVSV**IYSSGST**YYADSVKGRFTISRNTSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYC**ARVSLGGLDP**WGQGTPVTVSS
ZKA46	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	185	**GFSLSNGRMG**
CDRH2	186	**IFSNDEK**
CDRH3	187	**ARVEFRAGNYLDS**
V_H	188	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVS**GFSLSNGRMG**VSWIRQP PGKALEWLAH**IFSNDEK**YYSTSLKNRLTISKDTSKSQVVLTMT NMDPVDTATYYC**ARVEFRAGNYLDS**WGQGTLVTVSS
ZKA50	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	189	**GYTFTNSW**
CDRH2	190	**IYPGDSDT**
CDRH3	191	**ARQPFFDY**
V_H	192	EVQLVQSGAQVKKPGESLKISCKAS**GYTFTNSW**IGWVRQMP GKGLEWMGI**IYPGDSDT**RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWS SLKASDTAMYYC**ARQPFFDY**WGQGTLVTVSS
ZKA54	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	193	**GYTFTGYY**
CDRH2	194	**INANSGGT**
CDRH3	195	**AHSDIVVVPSDDYYALDV**
V_H	196	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTS**GYTFTGYY**MHWVRQAP GQGLEWMGW**INANSGGT**NFAQRFQGRVTMTWDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYC**AHSDIVVVPSDDYYALDV**WGQGTTVTV SS
ZKB18	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	197	**GYSFTSYW**

CDRH2	198	**IYPGDSDT**
CDRH3	199	**ARQTPGDY**
V_H	200	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKTF**GYSFTSYW**IGWVRQMPG KGLEWMGM**IYPGDSDT**RYSPSFQGQVTISADMSISTAYLQWS SLKASDTAMYYC**ARQTPGDY**WGQGTLVTVSS
ZKB20	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	201	**GYFFTRYV**
CDRH2	202	**INTDNGST**
CDRH3	203	**ARGTGRDGYNSFFAN**
V_H	204	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKAS**GYFFTRYV**ILWVRQAPG QRPEWMGW**INTDNGST**RYSQKFQGRVTITKDTSATTAYMDLS SLKSDDTAVYYC**ARGTGRDGYNSFFAN**WGQGTLVTVSP
ZKB21	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	205	**GYTFTGYS**
CDRH2	206	**IDTNSGDT**
CDRH3	207	**ARDRERHPFSY**
V_H	208	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTGYS**IHWVRQAP GQGLAWMGR**IDTNSGDT**NYAERFQGRVTMTRDTSISTAYME VRRLRSDDTAVYYC**ARDRERHPFSY**WGQGTLVTVSS
ZKB23	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	209	**GGSISSGDYS**
CDRH2	210	**ITHSGTT**
CDRH3	211	**ARHFGWFDP**
V_H	212	QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVS**GGSISSGDYS**WSWIRQP PGKGLEWIGY**ITHSGTT**YFNPSLKSRVTISVDRSRNQFSLKVT SVTAADTAVYYC**ARHFGWFDP**WGQGTLVTVSS

ZKC29	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	213	**GGSISSGEYF**
CDRH2	214	**IHNRGNT**
CDRH3	215	**ARGGGDLVVVPDSIWDYYGMDV**
V_H	216	QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVS**GGSISSGEYF**WTWIRQH PKKGLEWIGY**IHNRGNT**YYNPSLKSRLSISLDTSKNHLSLRLSS VTAADTAVYYC**ARGGGDLVVVPDSIWDYYGMDV**WGQGTTVT VSS
ZKC31	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	217	**GGSISSGGYH**
CDRH2	218	**IYYSGST**
CDRH3	219	**ARDRSEPGEYHYYYYAMDV**
V_H	220	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GGSISSGGYH**WSWIRQH PGKGLEWIGY**IYYSGST**YYNPSLKRRVTISVDTSKNQFSLKLSS VSAADTAVYYC**ARDRSEPGEYHYYYYAMDV**WGQGTTVTVSS
ZKC32	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	221	**GFTVSSNY**
CDRH2	222	**IYSSGST**
CDRH3	223	**ARGKKGNAFDI**
V_H	224	EVQLVESGGDLIQPGGSLRLSCAAS**GFTVSSNY**MSWVRQAP GKGLEWVSV**IYSSGST**YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAGDTAVYYC**ARGKKGNAFDI**WGQGTVVTVSS
ZKC33	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	225	**GDSISSRTFS**
CDRH2	226	**IYYSGST**
CDRH3	227	**ARRNAEFFSFWSYYGMDV**

V_H	228	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GDSISSRTFS**WSWIRQP PGKGLEWVGH**IYYSGST**DYNPSLKSRISISIDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYC**ARRNAEFFSFWSYYGMDV**WGHGTAVIVSS
ZKC34	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	229	**GGSINSGGYY**
CDRH2	230	**ILHSGNT**
CDRH3	231	**ARAGDYYSGYVPPEY**
V_H	232	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVS**GGSINSGGYY**WSWVRQ HPGKGLEWIGY**ILHSGNT**NYNPSLKSRVNIFVDTSENQFSLKL RSVTAADTAIYFC**ARAGDYYSGYVPPEY**WGPGTLVTVSS
ZKD25	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	233	**GFTVSSNY**
CDRH2	234	**IYSGGST**
CDRH3	235	**ARFGGNPSFDY**
V_H	236	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTVSSNY**MSWVRQAP GKGLEWVSV**IYSGGST**YYANSVKGRFTISRDKSKNTLYLQMN NLRAEDTAVYFC**ARFGGNPSFDY**WGQGTLVTVSS

ZKA3	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	237	**GFIFSNYA**
CDRH2	238	**IGGKGDSI**
CDRH3	239	**VKDLAVLESDRLEVDQ**
V_H	240	EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCSGS**GFIFSNYA**MVWARQA PGKGLEYVSG**IGGKGDSI**YHIDSVKGRFTISRDNSKRTVYLQ MSRLRTEDTAVYYC**VKDLAVLESDRLEVDQ**WGQGTLVIVSA
ZKA4	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	241	**GFTFSSYV**

CDRH2	242	**TSYDGSNK**
CDRH3	243	**ARGPVPYWSGESYSGAYFDF**
V_H	244	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSYV**MHWVRQAPGKGLEWVTV**TSYDGSNK**YYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRGEDTAIYYC**ARGPVPYWSGESYSGAYFDF**WGQGILVTVSS
ZKA5	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	245	**GFTFSNYY**
CDRH2	246	**MSSSETIK**
CDRH3	247	**ARSGIETVAGSIDYYGMDV**
V_H	248	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAGS**GFTFSNYY**MTWIRQAPGKGLELVSY**MSSSETIK**YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRADDTARYYC**ARSGIETVAGSIDYYGMDV**WGHGTPVTVSS
ZKA6	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	249	**DFTVSNYA**
CDRH2	250	**VSYDGSNK**
CDRH3	251	**ATGVTMFQGAQTNAEYLHY**
V_H	252	QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCEAS**DFTVSNYA**MHWVRQAPGKGLEWVAV**VSYDGSNK**YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTALYYC**ATGVTMFQGAQTNAEYLHY**WGQGSLVTISS
ZKA7	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	253	**GFTFSRYG**
CDRH2	254	**VSGDGSST**
CDRH3	255	**VKDFWSGDQSLESDF**
V_H	256	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSAS**GFTFSRYG**MVWARQAPGKGLEYLSG**VSGDGSST**YYANSVKGRFTISRDNSKNTLYLH

		MSRLRDEDTAMYYC**VKDFWSGDQSLESDF**WGQGALVTVSS
ZKA8	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	257	**GFTFSAHA**
CDRH2	258	**ISRNEDYT**
CDRH3	259	**VKDFGTSPQTDF**
V_H	260	DERLVESGGGLVQPGGSLRLVCSAS**GFTFSAHA**MHWVRQP PGKGLEYVST**ISRNEDYT**YYADSVKGRFTISRDNSKNSLYLQ MRRLRPEDTAIYYC**VKDFGTSPQTDF**WGQGTLVAVSS
ZKA76	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	261	**GFTFSTYF**
CDRH2	262	**ISSTGSYK**
CDRH3	263	**ARPFHSEYTYGLDAFDI**
V_H	264	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSTYF**MHWVRQA PGKGLEWVAS**ISSTGSYK**FYADSVKGRFTISRDNTKNSLFLQ MNSLRAEDTAVFYC**ARPFHSEYTYGLDAFDI**WGQGTMLTVS S
ZKA117	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	265	**GGSIRRTNSY**
CDRH2	266	**ISYSGST**
CDRH3	267	**ARLNDGSTVTTSSYFDY**
V_H	268	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS**GGSIRRTNSY**WGWIRQ TTGKGLQWIGS**ISYSGST**FYNPSLKSRVTISLDTSKDHFSLEL SSVTAADTAIYYC**ARLNDGSTVTTSSYFDY**WGQGTLVTVSS
ZKB27	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	269	**GYSFTSSW**
CDRH2	270	**IDPSDSYT**
CDRH3	271	**ARHDYSVSENGMDV**

V_H	272	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKAS**GYSFTSSW**INWVRQMP GKGLEWMGR**IDPSDSYT**TYNPSFQGHVTISVDKSIGTAYLQ WNSLRASDTAMYYC**ARHDYSVSENGMDV**WGQGTTVTVSS
ZKB29	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	273	**GFTFSSYT**
CDRH2	274	**ISYDGSHK**
CDRH3	275	**ARRSYSISCFDY**
V_H	276	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSYT**MHWVRQA PGKGLEWVAV**ISYDGSHK**FYADSVKGRFTISRDNSKDTLYLQ MNSLRAEDTALYYC**ARRSYSISCFDY**WGQGTLVTISS
ZKB34	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	277	**GFTFSRSG**
CDRH2	278	**VSYDGSNK**
CDRH3	279	**AKDLTMVRGVHYYYYVMDV**
V_H	280	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSRSG**MHWVRQA PGKGLEWVAV**VSYDGSNK**YYSDSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRVEDTAVYYC**AKDLTMVRGVHYYYYVMDV**WGQGT TVTVSS
ZKB39	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	281	**GYTFDDYY**
CDRH2	282	**INPHRGGT**
CDRH3	283	**VRDQYCDGGNCYGIHQPHYGMDV**
V_H	284	QVQLVQSGAEVKKPGASLKVSCKAS**GYTFDDYY**IHWVRQAP GQGLEWLGR**INPHRGGT**NYAQKFQGRVIMTLDMSISTTYME LRRITSDDAAVYYC**VRDQYCDGGNCYGIHQPHYGMDV**WGQ GTTVTVSS
ZKB46	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	285	**GYSFTSYW**

CDRH2	286	**IDPSDSYT**
CDRH3	287	**ARREYSSSSGQEDWFDP**
V_H	288	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGS**GYSFTSYW**ISWVRQMPGKGLEWMGR**IDPSDSYT**NYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC**ARREYSSSSGQEDWFDP**WGQGTLVTVSS
ZKB53	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	289	**GFTFSSYA**
CDRH2	290	**ISYDGSNR**
CDRH3	291	**ARHVEQLPSSGYFQH**
V_H	292	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSYA**MHWVRQTPGKGLEWVTV**ISYDGSNR**YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYC**ARHVEQLPSSGYFQH**WGQGTLVTVSS
ZKC26	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	293	**GFIFSDFY**
CDRH2	294	**IGHDGSYI**
CDRH3	295	**ARAHGGFRH**
V_H	296	QVQVVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFIFSDFY**MSWMRQAPGKGLEWVAY**IGHDGSYI**LYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLRMNSLRVEDTAVYYC**ARAHGGFRH**WGQGTVVAVSP
ZKD5	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	297	**GFTFTSYG**
CDRH2	298	**ISYDGSNK**
CDRH3	299	**ARDRDHYDLWNAYTFDY**
V_H	300	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFTSYG**MHWVRQTPGKGLDWVAV**ISYDGSNK**YYADSVKGRFTISRDNSKDTLYLQMNSLRAADTALYYC**ARDRDHYDLWNAYTFDY**WGQGTLVTVSS

ZKD7	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	301	**GFTFSNYA**
CDRH2	302	**ISYDVSDK**
CDRH3	303	**AGGPLGVVVIKPSNAEHFHH**
V_H	304	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSNYA**MHWVRQAPGKGLEWVAV**ISYDVSDK**YYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAAYYC**AGGPLGVVVIKPSNAEHFHH**WGQGTLVTVSS
ZKD8	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	305	**GFTFINYA**
CDRH2	306	**ISYDGSNK**
CDRH3	307	**ATDADAYGDSGANFHY**
V_H	308	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAAS**GFTFINYA**IHWVRQAPGKGLEWVAV**ISYDGSNK**FYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRADDTAVYYC**ATDADAYGDSGANFHY**WGQGTLVTVSS
ZKD15	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	309	**DASISSGGFS**
CDRH2	310	**IYSSGDT**
CDRH3	311	**ARAHTPTSKFYYYYAMDV**
V_H	312	QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCTVS**DASISSGGFS**WSWIRQPLGKGLEWLGY**IYSSGDT**FYNPSLQGRVTMSVDIFRSQFSLKLTSVTAADTAMYYC**ARAHTPTSKFYYYYAMDV**WGQGTTVTVSS
ZKD16	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	313	**GFTFSDHF**
CDRH2	314	**SRNKPNSYTT**
CDRH3	315	**AKVGGCYGGDCHVENDY**

V_H	316	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCVAS**GFTFSDHF**MDWVRQA PGKGLEWVGR**SRNKPNSYTT**EYAASVKGRFSISRDDSKKAL YLQMNSLQTEDTAVYYC**AKVGGCYGGDCHVENDY**WGQGT LVTVSS
ZKD17	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	317	**GFIFSDYA**
CDRH2	318	**ISYDGSSR**
CDRH3	319	**ARGYCSSGTCFSTNAEYFHP**
V_H	320	QVQMVESGGGVVQPGTSLRLSCATS**GFIFSDYA**MHWVRQA PGKGLEWVAV**ISYDGSSR**LYADSVKGRFTVSRDNSKNTLYL QMHSLRAGDTAVYYC**ARGYCSSGTCFSTNAEYFHP**WGQGT LATISS
ZKD20	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	321	**GFTFSDHF**
CDRH2	322	**SRNKPNSYTT**
CDRH3	323	**ARVGGCNGGDCHVENDY**
V_H	324	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS**GFTFSDHF**MDWVRQA PGKGLEWVGR**SRNKPNSYTT**EYAASVKGRFTISRDDSKNSL YLQMNSLQTEDTAVYYC**ARVGGCNGGDCHVENDY**WGQGT LVTVSS
ZKA134	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	325	**GGTFSAYA**
CDRH2	326	**IIPFFGTA**
CDRH3	327	**ARSDIVSTTRGYHHYGMDV**
V_H	328	QVHLVQSGAEVKKPGSSVNVSCKAS**GGTFSAYA**ISWVRQAP GQGLEWMGG**IIPFFGTA**YYAQKFKGRVTVTADKSTSTVYME MTSLRSEDTAVYYC**ARSDIVSTTRGYHHYGMDV**WGQGTTV TVSS
ZKA246	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**

CDRH1	329	**GYTFSDYY**
CDRH2	330	**INPYSGGT**
CDRH3	331	**ARGFTMISDREFDP**
V_H	332	QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS**GYTFSDYY**MHWVRQA PGQGLEWMGR**INPYSGGT**NYAQKFHGRVTVTRDTSISTVYM ELRGLRSDDTAVYYC**ARGFTMISDREFDP**WGQGTLVTVSS
ZKA256	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	333	**GFTFSTYW**
CDRH2	334	**IKQDGSEK**
CDRH3	335	**ARDPGYDDFWSGSYSGSFDI**
V_H	336	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSTYW**MTWVRQA PGKGLEWVAN**IKQDGSEK**YYVDSVKGRFTISRDNTKNSLYL QVNSLRAEDTAIYYC**ARDPGYDDFWSGSYSGSFDI**WGQGT MVTVSS
ZKB42	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	337	**GFTFNNYG**
CDRH2	338	**ISYDGNKK**
CDRH3	339	**VKYGERINGYSDPFDH**
V_H	340	QVQVVESGGGVVQPGRSLRLFCAAS**GFTFNNYG**MHWVRQ APGKGLEWVAL**ISYDGNKK**YYADSVKGRFSISRDNSKNTLYL QMNRLRSGDTAVYHC**VKYGERINGYSDPFDH**WGQGTLVTV SS
ZKB85	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	341	**GYTFTTYA**
CDRH2	342	**INTNTGNP**
CDRH3	343	**ARVIVPYAFDI**
V_H	344	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKAS**GYTFTTYA**MNWVRQA

		PGQGPEWVGW**INTNTGNP**TYAQGFTGRFVLSLDTSVSTAFL QISSLKAEDTAVYYC**ARVIVPYAFDI**WGQGTMVTVSS
ZKB47	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	345	**GYTFTNYY**
CDRH2	346	**INPSGGPT**
CDRH3	347	**ARDQYGGYARYGMDV**
V_H	348	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQAS**GYTFTNYY**MHWVRQA PGQGLEWMGI**INPSGGPT**SYAQKFQGRVTMTTDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYC**ARDQYGGYARYGMDV**WGQGTTVTVS S
ZKC6	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	349	**GYTFTGYY**
CDRH2	350	**INPNSGGT**
CDRH3	351	**ARVSDWGFAFDI**
V_H	352	QVQLVQSGTEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTGYY**MHWVRQA PGQGLEWMGR**INPNSGGT**NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAY MELSGLRSDDTAVYYC**ARVSDWGFAFDI**WGQGTMVTVSQ
ZKA160	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	353	**GGSITSYS**
CDRH2	354	**IFYSGST**
CDRH3	355	**ARDQTMPVWVGGMDV**
V_H	356	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS**GGSITSYS**WSWIRQPP GKGLEWIGY**IFYSGST**DYNPSLKSRVTISVDTSKDQFSLRLRS VTAADTAVYYC**ARDQTMPVWVGGMDV**WGQGTTVTVSS
ZKA172	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	357	**GYIFTRYW**
CDRH2	358	**IDPSDSYT**

CDRH3	359	**ARQETAREDGMAV**
V_H	360	EVQLVQSGAEVKKPGKSLRISCKGS**GYIFTRYW**ISWVRQMPGKGLEWMGR**IDPSDSYT**NYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC**ARQETAREDGMAV**WGQGTTVTVSS
ZKA174	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	361	**GGSMSNSYYH**
CDRH2	362	**IYYSGST**
CDRH3	363	**ARNPVFNPLTLTHDAFDI**
V_H	364	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS**GGSMSNSYYH**WGWIRQPPGKGLEWIGS**IYYSGST**YYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYC**ARNPVFNPLTLTHDAFDI**WGQGTMVTVSS
ZKA189	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	365	**GFTFSSYA**
CDRH2	366	**ISGSGDNT**
CDRH3	367	**AKWPYYDFWSGSESYFDP**
V_H	368	GVQLLESGGALVQPGKSLRLSCAAS**GFTFSSYA**LTWVRQAPGKGLQWVSA**ISGSGDNT**YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**AKWPYYDFWSGSESYFDP**WGQGTLVTVSS
ZKA195	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	369	**GYNFPSYW**
CDRH2	370	**IDPSDSYT**
CDRH3	371	**ARADCRSTSCYLVFE**
V_H	372	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKDS**GYNFPSYW**IHWVRQMPGKGLEWMGT**IDPSDSYT**NYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC**ARADCRSTSCYLVFE**GQGTLVTVSS
ZKA215	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**

CDRH1	373	**GYTFTSYW**
CDRH2	374	**IDPSDSHT**
CDRH3	375	**ARHALPNYFDS**
V_H	376	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGS**GYTFTSYW**ISWVRQMPGKGLEWMGR**IDPSDSHT**DYSPSFQGHVTISADKSISAAYLQWSSLKASDTAMYYC**ARHALPNYFDS**WGQGTLVTVSS
ZKA218	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	377	**GFPFSSYW**
CDRH2	378	**INSDGRNT**
CDRH3	379	**ARGGYDYDSSGCFDY**
V_H	380	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFPFSSYW**MHWVRQAPGKGLVWVSR**INSDGRNT**NYADSVKGRFTISRDNAENTVYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARGGYDYDSSGCFDY**WGQGTLVTVSS
ZKB75	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	381	**GFTFSNYA**
CDRH2	382	**ISGTGGST**
CDRH3	383	**AKDSASRGGYCSGGVCYLNPGHHDY**
V_H	384	EVQVLESGGGLLQPGGSLRLSCAAS**GFTFSNYA**MSWVRQAPGKGLEWVST**ISGTGGST**YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**AKDSASRGGYCSGGVCYLNPGHHDY**WGQGTLVTVSS
ZKB83	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	385	**GYSFTNYW**
CDRH2	386	**IDPSDSYT**
CDRH3	387	**ARLRGSLYCSGGRCYSVPGETPNWFDP**

V_H	388	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGS**GYSFTNYW**ITWVRQMP GKGLEWMGS**IDPSDSYT**NYSPSFQGHVTISADWSINTAYLQ WSSLKASDTAKYYC**ARLRGSLYCSGGRCYSVPGETPNWFD P**WGQGTLVTVSS
ZKC3	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	389	**GGSITSYY**
CDRH2	390	**IYYSGST**
CDRH3	391	**ARVGGAPYYYYGMDV**
V_H	392	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS**GGSITSYY**WSWIRQPP GKGLEWIGY**IYYSGST**NYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYC**ARVGGAPYYYYGMDV**WGQGTTVTVSS
ZKC18	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	393	**GFTFGDYA**
CDRH2	394	**IRSKAYGGTT**
CDRH3	395	**SRDHTGTTYAFDI**
V_H	396	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTAS**GFTFGDYA**MSWFRQA PGKGLEWVGF**IRSKAYGGTT**EYAASVKGRFTISRDDSKSIAY LQMNSLKTEDTAVYYC**SRDHTGTTYAFDI**WGQGTMVTVSQ
ZKD1	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
CDRH1	397	**GFTFSSYG**
CDRH2	398	**IWYDGSNK**
CDRH3	399	**ARDRRGYGDYVGYYYGMDV**
V_H	400	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFSSYG**MHWVRQA PGKGLEWVAV**IWYDGSNK**YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYC**ARDRRGYGDYVGYYYGMDV**WGQGT TVTVSS

Nombre	**SEQ ID NO.**	**Secuencia de aminoácidos**
EDIII genérico de ZIKV	401	TAAFTFTKXPAEXXHGTVTVEXQYXGXDGPCKXPXQM AVDXQTLTPVGRLITANPVITEXTENSKMMLELDPPFGD

		SYIVIGXGXKKITHHWHRS
ZIKV H/PF/2013 EDIII	402	TAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKVPAQMA VDMQTLTPVGRLITANPVITESTENSKMMLELDPPFGD SYIVIGVGEKKITHHWHRS
Cebador directo de ZIKV-NS1	403	TGGAGTTCAACTGACGGTCG
Cebador inverso de ZIKV-NS1	404	TACCCCGAACCCATGATCCT
Cebador directo de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (“Gapdh”, por sus siglas en inglés)	405	GGCAAGTTCAAAGGCACAGTC
Cebador inverso de Gapdh	406	CACCAGCATCACCCCATTT
EDIII genérico de ZIKV	407	$X_1GX_2X_3YSLCTAAFTFTKX_4PAEX_5X_6HGTVTVEX_7QYX_8$ $GX_9DGPCKX_{10}PX_{11}QMAVDX_{12}QTLTPVGRLITANPVITE$ $X_{13}TX_{14}NSKMMLELDPPFGDSYIVIGX_{15}GX_{16}X_{17}KITHHW$ HRSG en donde X1 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente K, A o E; X2 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente V, F o L; X3 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente S o F; X4 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente I o V; X5 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente T o V; X6 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente L o D; X7 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente V o G; X8 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente A o G; X9 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), excepto R, preferiblemente T o A; X10 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente V o I; X11 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente A o V; X12 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente M o T; X13 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural),

		preferiblemente S o G; X14 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente E o K; X15 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente V o I; X16 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente E, A, K o D; y X17 puede ser cualquier aminoácido (de origen natural), preferiblemente E, A o K, más preferiblemente K o A

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