MINISTERIO DE INDUSTRIA, ENERGIA Y MINERIA

DIRECCION NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

PATENTES

- PATENTE DE INVENCION ✔
- MODELO DE UTILIDAD
- MODELO INDUSTRIAL

ESPACIO RESERVADO PARA LA ADMINISTRACIÓN

Clas. Int.	
Fecha solicitud	**Número solicitud**
Fecha resolución	**Número resolución**

INVENTOR/ES

	NOMBRE	NACIONALIDAD
1	KARA CARTER	US
2	CENDRINE LEMOINE	FR
3	MARIE MANDRON	FR
4	SUNG-HAE PARK	KR
5	HUAWEI QIU	US
6	JONATHAN ROTHBLATT	US
7		
8		
9		
10		

TITULO DE LA SOLICITUD

ANTICUERPOS ANTI-CHIKV Y USOS DE ÉSTOS

SOLICITANTE

		País
Nombre	**SANOFI**	**FR**
Domicilio	54 rue La Boétie, 75008 PARIS	

AGENTE

		Código
Nombre	**Nora Morgade**	165
Domicilio	Rincón 528 - Piso 6, Montevideo - URUGUAY	

DATOS DE LA PRIORIDAD

País: **EP** Fecha: **20/10/2016**

Número: **16306374.6**

DIRECCIÓN NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

SOLICITUD DE:	
PATENTE DE INVENCIÓN	✔
MODELO DE UTILIDAD	
DISEÑO INDUSTRIAL	

Reservado para la Administración

NÚMERO:

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN:

FIRMA DEL FUNCIONARIO

SOLICITANTE

Nombre	SANOFI	Nacionalidad	
Domicilio	54 rue La Boétie, 75008 PARIS	Documento de Identidad	
		País	FR

INVENTOR/ES

	NOMBRE	NACIONALIDAD
1	KARA CARTER	US
2	CENDRINE LEMOINE	FR
3	MARIE MANDRON	FR
4	SUNG-HAE PARK	KR
5	HUAWEI QIU	US
6	JONATHAN ROTHBLATT	US
7		
8		
9		
10		

TÍTULO DE LA SOLICITUD

ANTICUERPOS ANTI-CHIKV Y USOS DE ÉSTOS

AGENTE

Nombre	**Nora Morgade**	Código
Domicilio	**Rincón 528 - Piso 6, Montevideo - URUGUAY**	**165**

DECLARACIÓN DE DEPÓSITO DE MICROORGANISMO

NÚMERO	FECHA	DEPOSITARIO

DECLARACIÓN DE PRIORIDAD

NÚMERO	FECHA	PAÍS	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL
16306374.6	20/10/2016	EP	

DECLARO QUE LA INFORMACIÓN QUE ANTECEDE ES COMPLETA, EXACTA Y CORRECTA.

Sello y Firmo:

ANTICUERPOS ANTI-CHIKV Y USOS DE ÉSTOS

La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos que se unen específicamente a y neutralizan el virus Chikungunya (CHIKV) y que se preparan por ingeniería para desarrollar soluciones profilácticas y terapéuticas para prevenir y tratar la enfermedad CHIKV. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos neutralizantes de CHIKV y al uso de los anticuerpos para la prevención y tratamiento de la enfermedad CHIKV.

CHIKV es un patógeno transportado por insectos reemergente. CHIKV es endémico en África, India y sureste asiático, pero también aparece en brotes impredecibles y grandes con altas tasas de ataque más allá de estas regiones, infectando a millones de personas (Powers AM, Logue CH, 2007, J. Gen. Virol. 88:2363-2377). Una mutación en la glicoproteína 1 de cubierta (E1) de CHIKV permitió la transmisión viral a través de mosquitos Aedes albopictus, además de mosquitos Aedes aegypti y resultó en 2005 en epidemias diseminadas y graves en La Reunión, India e Indonesia, con brotes iniciados por viajeros posteriores que aparecieron en Italia, Francia y China (Tsetsarkin KA et al 2007, PLoS Pathog. 3:e201; Schuffenecker I et al 2006, PLoS Med. 3:e263; Wu D, Zhang Y et al 2013, Virol. J. 10:174; Rezza G et al 2007, Lancet 370:1840–1846; Burt FJ 2012, Lancet 379:662–671). Debido al rango geográfico extendido de los mosquitos Aedes albopictus, se espera que el virus se disemine a nuevas áreas y ahora se sabe que Europa y el continente americano están en riesgo de brotes de CHIKV.

CHIKV es un virus con ARN de cadena positiva con cubierta del género de alfavirus de la familia Togaviridae. Es un miembro del complejo del virus del Bosque de Semliki y está relacionado de cerca con el virus del Río Ross y virus O'nyong'nyong (ONNV); como se transmite por artrópodos, concretamente mosquitos, también puede referirse como un arbovirus (virus transportado por artrópodos).

CHIKV entra en las células a través de internalización mediada por receptor y un evento de fusión de membranas de tipo II desencadenado por pH bajo en endosomas tempranos. La enfermedad CHIKV se caracteriza por fases de poliartritis/poliartralgia aguda, post-aguda y crónica, la última de las cuales es habitualmente simétrica y frecuentemente incapacitante y puede durar durante meses o años. Otros síntomas, tal como fiebre, sarpullido, mialgia y/o fatiga también están presentes durante la fase aguda. La epidemia reciente también estuvo

asociada con formas clínicas atípicas y graves de la enfermedad CHIKV y algunas muertes, que parecían estar restringidas a los pacientes muy jóvenes y ancianos con comorbilidades.

Actualmente, no hay tratamiento profilácticos o terapéuticos específicos para la enfermedad CHIKV. CHIKV se trata sintomáticamente, habitualmente con reposo en cama, fluidos y medicinas para aliviar los síntomas de fiebre y dolor tal como analgésicos simples y/o fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID). Aunque un candidato de vacuna frente a CHIKV se propuso en primer lugar hace 45 años, muchos candidatos de vacuna ensayados hasta la fecha han fracasado incluso para inducir anticuerpos protectores o demostraron problemas de seguridad significativos.

Todavía existe una necesidad de tratamientos que muestren eficacias terapéuticas incrementadas frente a CHIKV, incluyendo el uso de anticuerpos monoclonales específicos dirigidos a CHIKV.

Existe una necesidad en la técnica de anticuerpos neutralizantes de CHIKV adecuados para usos profilácticos y terapéuticos. En particular, es necesario que dichos anticuerpos neutralicen apropiadamente diferentes cepas del virus CHIK con una alta afinidad de unión para la diana, que presenten parámetros farmacocinéticos apropiados, que presenten una vida media apropiada después de la administración, y que permitan una fabricación eficiente a gran escala, a la vez que retienen su unión a FcγRIIIa que está asociado con funciones efectoras.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Como se describe en la presente invención, los inventores de la presente solicitud fueron capaces de seleccionar y de preparar por ingeniería anticuerpos neutralizantes de CHIKV específicos mejorados en sus farmacocinéticas relacionadas con la exposición y manteniendo su unión a FcγRIIIa que está asociado con funciones efectoras, haciéndolos compatibles con un desarrollo de terapéuticos para prevenir y tratar la enfermedad CHIKV y abordar la necesidad en la técnica de terapias efectivas frente a CHIKV.

Los anticuerpos de la invención tienen una alta afinidad de unión (en el rango nanomolar) frente a diferentes cepas de CHIKV. Por lo tanto, presentan actividades neutralizantes amplias y ultrapotentes frente a diferentes cepas de CHIKV. Además, los anticuerpos de la presente invención tienen una unión mejorada al receptor FcRn humano mientras retienen la unión a FcγRIIIa haciéndolos compatibles con una vida

media incrementada mientras mantienen su unión a FcγRIIIa que está asociado con funciones efectoras.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado que se une a CHIKV y que comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL), en el que:

i. dichas CDRH tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, y dichas CDRL tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, o
ii. dichas CDRH tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, y dichas CDRL tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, o
iii. dichas CDRH y CDRLH tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de las secuencias de i. o ii. por una o dos sustituciones de aminoácidos;

y en el que dicho anticuerpo comprende además una región Fc que comprende al menos un residuo seleccionado del grupo que consiste en:

iv. una alanina en la posición 434, o
v. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o
vi. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, o
vii. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, o
viii. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente,

en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En una realización, el anticuerpo monoclonal aislado se une a CHIKV y comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL), en el que:

i. dichas CDRH tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, y dichas CDRL tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, o

ii. dichas CDRH tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, y dichas CDRL tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, o

iii. dichas CDRH y CDRLH tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de i. o ii. por una o dos sustituciones de aminoácidos;

y el que dicho anticuerpo comprende además una región Fc que comprende al menos un residuo seleccionado del grupo que consiste en:

iv. una alanina en la posición 434, o

v. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o

vi. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, o

vii. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, o

viii. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente,

en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU;
y en el que el anticuerpo tiene una o más de las propiedades siguientes:

ix. se une a la diana pE2-E1 de CHIKV con una constante de disociación de unión en equilibrio (K_D) de menos de aproximadamente 10 nM;

x. se une a FcRn humano con una K_D de menos de aproximadamente 200 nM;

xi. se une a FcγRIII humano con una K_D de menos de aproximadamente 600 nM.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y dicho anticuerpo comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal comprende:

- Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 5;

- Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 6;
- Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7;
- Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 8;
- Una CDRL2 que consiste en la secuencia GNT;
- Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 10.

En una realización adicional, el anticuerpo monoclonal comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y dicho anticuerpo comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal comprende:

- Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11;
- Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12;
- Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 13;
- Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14;
- Una CDRL2 que consiste en GTS;
- Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal comprende una región Fc que comprende residuos seleccionados del grupo que consiste en:

i. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, o
ii. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente,

en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En una realización adicional, el anticuerpo monoclonal comprende una región Fc en el que dicha región Fc comprende una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434 en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal comprende una cadena ligera kappa o cadena ligera lambda.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una región Fc que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62 y 63.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 1.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una región variable de su cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 2.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 31.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 20.

En un segundo aspecto, el anticuerpo monoclonal aislado se une a CHIKV, o un fragmento de unión a antígeno de éste, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 33, respectivamente, o que tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste comprende además tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, o que tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y en el que:

i. el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, y/o
ii. el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N; y/o

iii. el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G.

En una realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno de éste comprende:

- Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11;
- Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12;
- Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 33;
- Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14;
- Una CDRL2 que consiste en GTS;
- Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16, y en el que:
  i. el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, y/o
  ii. el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N; y/o
  iii. el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno de éste comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 33, respectivamente, o que tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste comprende además tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, o que tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y en el que:

i. el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, o
ii. el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N; o
iii. el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno de éste comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 33, respectivamente y dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste comprende además tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, y en el que:

i. el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, o
ii. el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N; o

iii. el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno de éste comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 33, respectivamente, o que tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste comprende además tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, o que tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y en el que:

i. el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, o
ii. el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N; o
iii. el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G,

y en el que el anticuerpo tiene una o más de las propiedades siguientes:

iv. se une a la diana pE2-E1 de CHIKV con una constante de disociación de unión en equilibrio (K_D) de menos de aproximadamente 10 nM;
v. se une a FcRn humano con una K_D de menos de aproximadamente 200 nM;
vi. se une a FcγRIII humano con una K_D de menos de aproximadamente 600 nM.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal comprende un aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 seleccionado del grupo que consiste en I, L, V, Q y N.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal comprende:

- Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11;
- Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12;
- Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 34;
- Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14;
- Una CDRL2 que consiste en GTS;
- Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal comprende un aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 seleccionado del grupo que consiste en Q, E, S, T y D.

En una realización adicional, el anticuerpo monoclonal comprende:

- Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11;
- Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12;
- Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 35;
- Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14;
- Una CDRL2 que consiste en GTS;
- Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal comprende un aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 seleccionado del grupo que consiste en A, S y T.

En una realización adicional, el anticuerpo monoclonal comprende:

- Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11;
- Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12;
- Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 36;
- Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14;
- Una CDRL2 que consiste en GTS;
- Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 57.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una región variable de su cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 4.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 47.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 38.

En otro aspecto de este segundo aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende además una región Fc que comprende residuos seleccionados del grupo que consiste en:

i. una alanina en la posición 434, o
ii. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o
iii. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, o
iv. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, o
v. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente,

en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una región Fc que comprende residuos seleccionados del grupo que consiste en:

i. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434 o
ii. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256,

en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una región Fc que comprende una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434 en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización de este aspecto de la invención, el anticuerpo monoclonal comprende una cadena ligera kappa o una cadena ligera lambda.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una región Fc que comprende o que consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62 y 63.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 57.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una región variable de su cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 4.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 53.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal tiene una cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 38.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere al anticuerpo monoclonal para uso como un medicamento.

En otra realización, el monoclonal es para uso en el tratamiento de artralgia asociada a CHIKV.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal es para uso en la prevención de infección con CHIKV.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal y al menos un excipiente.

En un sexto aspecto, la invención se refiere a una línea celular que produce el anticuerpo monoclonal.

En un séptimo aspecto, es un método para producir el anticuerpo monoclonal, en el que dicho método comprende las etapas de (i) cultivar una línea celular según el sexto aspecto; (ii) purificar el anticuerpo monoclonal producido; y opcionalmente (iii) formular dicho anticuerpo monoclonal en una composición farmacéutica.

En un octavo aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de éste como se describe en la presente memoria. En una realización, el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad con una de las secuencias SEQ ID NO: 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 39, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 y 54. En una realización, el polinucleótido se caracteriza porque tiene una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con una de las secuencias SEQ ID NO: 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 39, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 y 54.

En un noveno aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende al menos un anticuerpo como se describe en la presente memoria. En una realización, dicho kit comprende opcionalmente material de envasado.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Figura 1: Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de IgG1 humana de regiones CH1, bisagra, CH2 y CH3; parte de la bisagra y regiones CH2 y CH3 constituyen la región Fc. La numeración de los residuos de aminoácidos es según el índice EU como se muestra en Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª, Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Los residuos sustituidos de la región Fc descritos en la invención están enmarcados.

Figura 2: Alineamiento de secuencias de la región Fc de IgG1: SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63.

Figura 3: Efecto en la unión a diana E2-E1 de mutaciones en CDRH3 de mAb2 creadas para eliminar restos potenciales de desamidación y oxidación. Los resultados comparativos se muestran en duplicado para cada mutante.

Figura 4: Efecto en la unión a FcRn de sustituciones en las regiones Fc de mAb1 y mAb2 respectivamente. Los resultados comparativos se muestran en duplicado en FcRn humano para mAb1 (figura 4A) y mAb2 (figura 4C) y en FcRn de ratón para mAb1 (figura 4B) y mAb2 (figura 4D), a pH 6,0.

Figura 5: Efecto en la unión a diana E2-E1 de mutaciones en regiones Fc de mAb1 y mAb2 respectivamente. Los resultados se muestran en duplicado para el antígeno E1-E2 derivado de las cepas LR2006 (figura 5A) y SL15649 (figura 5B), respectivamente.

Figura 6: Efecto en la unión a FcγRIIIa de sustituciones en las regiones Fc de mAb1 y mAb2 respectivamente. Los resultados de unión se muestran en duplicado en el receptor de alta afinidad FcγRIIIa humano (FcγRIIIaV158) para mAb1 (figura 6A) y para mAb2 (figura 6B) así como en el receptor de baja afinidad FcγRIIIa humano (FcγRIIIaF158), respectivamente (figura 6C para mAb1 y figura 6D para mAb2).

Figura 7: Actividad de neutralización de mAb1 y mAb7 usando Ensayo de Reducción de Placa Estándar. MAb1 y mAb7 inhiben los virus Chikungunya de todos los tres genotipos, es decir, asiático (figura 7A), este-centro y sur de África (ESCA) (figura 7B) y África occidental (figura 7C) con actividad ultrapotente.

Figura 8: Estudios de profilaxis de mab en ratones. Efecto de mAb1 y mAb7 proporcionados a 250µg/ratón a 2, 7 ó 14 días antes de la infección con CHIKV en la titulación del virus a los 3 días después de la inoculación en la pata trasera derecha de ratones DBA/1J. La titulación viral se representa como 50% de dosis infecciosa en cultivo celular ($CCID_{50}$) por gramo de tejido.

Figura 9: Terapia de con mAb posterior a la exposición en ratones. La titulación viral en la Pata Trasera Derecha a los 5 días después de la inoculación (dpi) después de una única administración intra-peritoneal de una dosis fija de 250µg de mAb 2, 7, 11 y 14 a 3 dpi (figura 9A). El efecto del intervalo de dosis en la titulación del virus en la Pata Trasera Derecha a 5 dpi de mAb7 y mAb14 después de una única administración de varias dosis (de 10 a 250µg / ratón) a 3 dpi (figura 9B). La titulación viral se representa como 50% de dosis infecciosa en cultivo celular ($CCID_{50}$) por gramo de tejido. La línea discontinua superior es el límite promedio de detección para homogenados de tejido.

Figura 10: Farmacocinética de mAb en Primate No Humano. Comparación de la farmacocinética para mAb1 y mAb7 administrados por bolo intravenoso (IV), 2,5 mg/kg en Monos Cynomolgus (Macaca Fascicularis).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

Un "anticuerpo" puede ser un anticuerpo natural o convencional en el que dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera por un enlace disulfuro. En mamíferos, los anticuerpos se clasifican en cinco clases o isotipos principales, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Se clasifican según la cadena pesada que contienen, alfa, delta, épsilon, gamma o mu, respectivamente. Éstas se diferencian en la secuencia y número de dominios constantes, estructura de la bisagra y la valencia del anticuerpo. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (l) y kappa (k) siendo las cadenas ligeras kappa las más comunes de las dos. Aunque éstas son relativamente diferentes en secuencia de proteína, comparten una estructura y función similar.

Las cinco clases (o isotipos) principales de cadena pesada determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene dominios de secuencia distintos. IgG es el anticuerpo más abundante en suero humano normal, representando el 70-85% del combinado de inmunoglobulina total. Es monomérico con un peso molecular de aproximadamente

150kDa, es el anticuerpo principal de la respuesta inmune secundaria y tiene la vida media más larga de las cinco clases de inmunoglobulina. IgG consiste en cuatro subclases humanas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) conteniendo cada una una cadena pesada diferente. Son altamente homólogas y se diferencian principalmente en la región bisagra y el grado en el que activan el sistema inmune del huésped. IgG1 e IgG4 contienen dos enlaces disulfuro inter-cadena en la región bisagra, IgG2 tiene 4 e IgG3 tiene 11.

La cadena ligera incluye dos dominios o regiones, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, referidos colectivamente como CH). Las regiones variables tanto de las cadenas ligera (VL) como pesada (VH) determinan el reconocimiento y especificidad de unión para el antígeno. Los dominios de región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren propiedades biológicas importantes tal como asociación de cadenas del anticuerpo, secreción, movilidad trans-placentaria, unión a complemento, y unión a receptores Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las partes variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación del anticuerpo están compuestos por residuos que son principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR). Ocasionalmente, los residuos de regiones no hipervariables o marco (FR) incluyen en la estructura del dominio global y por lo tanto el sitio de combinación. "Regiones Determinantes de la Complementariedad o CDR" se refieren a secuencias de aminoácidos que conjuntamente definen la afinidad de unión y especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa. Las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR, designadas CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L (para Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera) o CDRL1, CDRL2, CDRL3 y CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H (para Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada) o CDRH1, CDRH2, CDRH3, respectivamente. Un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo convencional, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de una región V de cadena pesada y ligera.

"Regiones Marco" (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR, es decir, a aquellas partes de regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina que están relativamente conservadas entre diferentes

inmunoglobulinas en una única especie. Las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen cada una cuatro FR, designadas FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L, y FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H, respectivamente.

Tal y como se usa en la presente memoria, una "región marco humana" es una región marco que es sustancialmente idéntica (aproximadamente 85%, o más, en particular 90%, 95%, 97%, 99% ó 100%) a la región marco de un anticuerpo humano natural.

En una realización, la definición CDR/FR en una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina debe determinarse sobre la base de la definición IMGT (Lefranc, M.P. et al., 2003, Dev Comp Immunol. 27(1): 55-77; www.imgt.org). Las secuencias de CDR descritas en la invención se proporcionan según la nomenclatura de IMGT.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos convencionales o de longitud completa (es decir, anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras), a anticuerpos de dominio único, y a fragmentos de anticuerpos convencionales y de dominio único. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" incluye, pero no está limitado a, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, y anticuerpos multiespecíficos (tal como, por ejemplo, anticuerpos bispecíficos y triespecíficos). El término "anticuerpo" se refiere tanto a un anticuerpo que comprende el péptido señal (o pro-péptido, si existe), y a la forma madura obtenida después de secreción y procesamiento proteolítico de la o las cadenas.

Tal y como se usa en la presente memoria, anticuerpo o inmunoglobulina también incluye "anticuerpos de dominio único" que se han descrito más recientemente y que son anticuerpos cuyas regiones determinantes de la complementariedad son parte de un polipéptido de dominio único. Los ejemplos de anticuerpos de dominio único incluyen anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos desprovistos naturalmente de cadenas ligeras, anticuerpos de dominio único derivados de anticuerpos de cuatro cadenas convencionales, anticuerpos de dominio único preparados por ingeniería. Los anticuerpos de dominio único pueden derivar de cualquier especie incluyendo, pero no limitado a, ratón, ser humano, camello, llama, cabra, conejo y bovino. Los anticuerpos de dominio único pueden ser anticuerpos de dominio único naturales conocidos como anticuerpo de cadena pesada desprovisto de cadenas ligeras. En particular, Las especies de Camelidae, por ejemplo, camello, dromedario, llama, alpaca y guanaco, producen anticuerpos de cadena pesada desprovistos naturalmente de cadena ligera. Los anticuerpos de cadena pesada de camélidos también carecen del dominio CH1.

La cadena pesada variable de estos anticuerpos de dominio único desprovistos de cadenas ligeras se conoce en la técnica como "VHH" o "nanocuerpo". De manera similar a los dominios VH convencionales, los VHH contienen cuatro FR y tres CDR. Los nanocuerpos tienen ventajas sobre los anticuerpos convencionales: son aproximadamente diez veces más pequeños que las moléculas de IgG, y como consecuencia, pueden producirse nanocuerpos plegados apropiadamente por expresión *in vitro* a la vez que se consigue un alto rendimiento. Además, los nanocuerpos son muy estables, y resistentes a la acción de proteasas. Las propiedades y producción de los nanocuerpos se han revisado por De Haard HJ (Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007 Nov; 77(1): 13-22).

Tal y como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que carece principalmente de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas; por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une a CHIKV, o un fragmento de éste, o un fragmento de unión a antígeno de éste, carece principalmente de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CHIKV.

Un "anticuerpo bloqueante" o un "anticuerpo neutralizante", o un "anticuerpo que neutraliza la actividad de CHIKV", o un "anticuerpo que presenta / muestra una actividad neutralizante frente a CHIKV", o un "anticuerpo neutralizante de CHIKV" o un "anticuerpo anti-CHIKV" tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo cuya unión a CHIKV resulta en la inhibición de al menos una actividad biológica de CHIKV. Por ejemplo, un anticuerpo puede neutralizar una cepa de CHIKV bloqueando la unión de CHIKV a las células y de esta manera previniendo la infección de dichas células por CHIKV.

El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb" tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de anticuerpo con composición de aminoácidos única que está dirigida frente a un antígeno específico, y no debe considerarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Un anticuerpo monoclonal puede producirse por un único clon de células B o hibridoma, pero puede ser también recombinante, es decir, producido por ingeniería de proteínas.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo preparado por ingeniería que, en su sentido más amplio, contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más otros anticuerpos. En particular, un anticuerpo quimérico comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano, en asociación con un dominio CH y un dominio CL de otro anticuerpo, en particular un anticuerpo humano. Como el animal no

humano, puede usarse cualquier animal tal como ratón, rata, hámster, conejo o semejantes. Un anticuerpo quimérico también indica un anticuerpo multiespecífico que tiene especificidad para al menos dos antígenos diferentes. En una realización, un anticuerpo quimérico tiene dominios variables de origen de ratón y dominios constantes de origen humano.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que es inicialmente totalmente o parcialmente de origen no humano y que se ha modificado para reemplazar determinados aminoácidos, en particular en las regiones marco de las cadenas pesada y ligera, con el fin de evitar o minimizar una respuesta inmune en seres humanos. Los dominios constantes de un anticuerpo humanizado son la mayor parte de las veces dominios CH y CL humanos. En una realización, un anticuerpo humanizado tiene dominios constantes de origen humano.

Los “fragmentos” de anticuerpos (convencionales) comprenden una parte de un anticuerpo intacto, en particular la región de unión a antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fv, Fab, F(ab')2, Fab', dsFv, (dsFv)2, scFv, sc(Fv)2, diacuerpos, anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Un fragmento de un anticuerpo convencional también puede ser un anticuerpo de dominio único, tal como un anticuerpo de cadena pesada o VHH.

El término “Fab” indica un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígeno, en el que aproximadamente una mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L completa, entre fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, papaína, se unen entre sí a través de un enlace disulfuro.

El término “F(ab')2” se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 y actividad de unión a antígeno, que es ligeramente mayor que el Fab unido mediante un enlace disulfuro de la región bisagra, entre fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, pepsina.

El término “Fab'” se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígeno, que se obtiene cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')2.

“Región Fc” o “dominio Fc” se define como el carboxilo terminal de las cadenas pesadas de anticuerpos y contiene secuencias de proteína comunes a todas las inmunoglobulinas, así como determinantes únicos para las diferentes clases individuales de inmunoglobulinas. Como un ejemplo, la cadena pesada de IgG1 humana comprende las regiones CH1, bisagra, CH2 y CH3; parte de la bisagra y las regiones CH2 y CH3 constituyen la región Fc. Como se muestra en la figura 1,

la numeración de los residuos de aminoácidos de la región Fc para el propósito de la invención es según el índice EU como se muestra en Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª, Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Consecuentemente, la expresión "en el que las /dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU" se refiere a esta numeración de la región Fc como se ha mostrado anteriormente en Kabat et al, 1991 y como se muestra en la figura 1.

Los dominios de esta región Fc son centrales en la determinación de las funciones biológicas de la inmunoglobulina y estas funciones biológicas se denominan "funciones efectoras". Estas actividades mediadas por el dominio Fc están mediadas a través de células efectoras inmunológicas, incluyendo linfocitos B, células asesinas naturales, macrófagos, basófilos, neutrófilos y mastocitos, o varios componentes del complemento. Estas funciones efectoras implican la activación de receptores en la superficie de dichas células efectoras, a través de la unión del dominio Fc de un anticuerpo a dicho receptor (o "receptor Fc") o a componente(s) del complemento. Las actividades de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) pertenecen a estas funciones efectoras e implican la unión del dominio Fc a receptores Fc tal como FcγRI (CD64), FcγRII, FcγRIII de las células efectoras o componentes del complemento tal como C1q. De las varias clases de inmunoglobulinas humanas, IgG1 e IgG3 humanas median ADCC más eficazmente que IgG2 e IgG4. El término "receptor Fc" incluye, pero no está limitado a, FcγRI (CD64), FcγRIIA y FcγRIIB (CD32), FcγRIIIA (CD16a) y FcγRIIIB (CD16b), receptor Fcα (FcαRI o CD89) y receptor Fcε (FcεRI y FcεRII (CD23). Se han reportado en la bibliografía varias sustituciones de aminoácidos que dan lugar a la disminución de las funciones efectoras en diferentes isotipos de IgG humana (véase la Tabla 2 en Strohl 2009, Current Opinion in Biotechnology 20:685–691).

Un polipéptido Fv de cadena única ("scFv") es un heterodímero VH::VL unido covalentemente que se expresa habitualmente a partir de una fusión génica incluyendo los genes que codifican VH y VL unidos por un conector que codifica un péptido. Un fragmento scFv humano puede incluir CDR que no se mantienen en la conformación apropiada, en particular usando técnicas de recombinación génica. Los fragmentos de anticuerpos divalentes y multivalentes se pueden formar bien espontáneamente por asociación de scFv monovalentes, o pueden generarse por el acoplamiento de scFv monovalentes por un conector peptídico, tal como sc(Fv)2

divalente. “dsFv” es un heterodímero VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. “(dsFv)2” indica dos dsFv acoplados por un conector peptídico.

El término “anticuerpo biespecífico” o “BsAb” indica un anticuerpo que combina los sitios de unión a antígeno de dos anticuerpos en una única molécula. Así, los BsAb son capaces de unirse a dos antígenos diferentes simultáneamente. La ingeniería genética se ha usado con una frecuencia creciente para diseñar, modificar, y producir anticuerpos o derivados de anticuerpo con un conjunto deseado de propiedades de unión y funciones efectoras como se describe por ejemplo en EP 2 050 764 A1.

El término “anticuerpo multiespecífico” indica un anticuerpo que combina los sitios de unión a antígeno de dos o más anticuerpos en una única molécula.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmento pequeños de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH-VL). Mediante el uso de un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y se crean dos sitios de unión a antígeno.

El término “hibridoma” indica una célula, que se obtiene sometiendo una célula B preparada mediante la inmunización de un mamífero no humano con un antígeno para hacer una fusión celular con una célula de mieloma derivada de un ratón o semejante que produce un anticuerpo monoclonal deseado que tiene especificidad para un antígeno.

Tal y como se usa en la presente memoria, “se une específicamente” o “se une específicamente a” o “se une a” o semejantes, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica puede caracterizarse por una constante de disociación en equilibrio (K_D) de al menos aproximadamente $1x10^{-8}$ M o menos (por ejemplo, una K_D menor indica una unión más firme). Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis en equilibrio, resonancia de plasmón superficial, y semejantes. Como se describe en la presente memoria, los anticuerpos se han caracterizado, por ejemplo, por su unión específica a CHIKV y/o antígeno de CHIKV usando resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™.

Tal y como se usa en la presente memoria, “antígeno CHIKV” designa antígenos específicos naturales de los anticuerpos descritos en la presente memoria, es decir, proteína E2 de CHIKV. También engloba proteínas recombinantes que comprende las proteínas de cubierta E1 de CHIKV y el antígeno específico E2 de CHIKV, usado por ejemplo en experimentos de unión por resonancia de plasmón superficial para medir las afinidades de unión de los anticuerpos anti-CHIKV *in vitro*, como se describe en la presente memoria en materiales y métodos y designado bajo “proteína pE2-E1” o “diana pE2-E1“ o “p62-E1” o “E2 de CHIKV etiquetado con his” o “diana pE2-E1 de CHIKV” o “antígeno pE2-E1 de CHIKV”.

Tal y como se usa en la presente memoria, “entorno ácido” significa un entorno de menos de pH 7; se entiende que los experimentos de unión hechos a pH 6 por ejemplo dan lugar a datos de unión en un entorno ácido.

Una secuencia “al menos 80% idéntica a una secuencia de referencia” es una secuencia que tiene, en su longitud completa, 80%, o más, en particular 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la longitud completa de la secuencia de referencia.

Un porcentaje de “identidad de secuencia” puede determinarse comparando las dos secuencias, alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación, en el que la parte de la secuencia de polinucleótido o polipéptido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) comparado con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico o residuo de aminoácidos idéntico en ambas secuencias para rendir el número de posiciones concordantes, dividiendo el número de posiciones concordantes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para rendir el porcentaje de identidad de secuencia. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se lleva a cabo por alineamiento por pares global, por ejemplo, usando el algoritmo de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443 (1970). El porcentaje de identidad de secuencia puede determinarse fácilmente por ejemplo usando el programa Needle, con la matriz BLOSUM62, y los parámetros siguientes apertura de hueco=10, extensión de hueco=0,5.

Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo de cadena lateral R con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no

cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; 2) cadenas laterales alifáticas-hidroxilo: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina, y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina, e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativa son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina-triptófano, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, y asparagina-glutamina.

Los términos "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, y semejantes, tal y como se usan en la presente memoria, incluyen polipéptido o glicoproteína natural, que se puede obtener enzimáticamente, sintético, o preparado por ingeniería genética que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los términos "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo, o "fragmento de anticuerpo", tal y como se usan en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse a CHIKV y/o al antígeno CHIKV. Dichas partes de unión a antígeno comprenden típicamente las CDR del anticuerpo.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que anticuerpos secretados se unen a receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células Asesinas Naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta antígeno y posteriormente matan la célula diana. En otras palabras, ADCC es un mecanismo de inmunidad mediada por células mediante el que las células efectoras del sistema inmune, principalmente células Asesinas Naturales, lisan activamente una célula diana a la que se han unido anticuerpos específicos. ADCC es uno de los mecanismos por el que los anticuerpos como parte de la respuesta inmune humoral, pueden limitar y contener las infecciones. Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, también se contempló un ensayo ADCC in vitro, tal como el descrito en la Patente US No. 5.500.362 ó 5.821.337.

La expresión "secuencia(s) de aminoácidos que se diferencian de las secuencias de X o Y por una o dos sustituciones de aminoácidos" significa que dicha secuencia se diferencia de las secuencias X o Y por como máximo dos sustituciones

de aminoácidos, es decir, se diferencia por sólo una o dos sustituciones de aminoácidos.

Por ejemplo, la expresión "una secuencia X se diferencia de la secuencia Y por la sustitución de aminoácidos Z y opcionalmente una o dos sustituciones de aminoácidos adicionales" significa que dicha secuencia X se diferencia de la secuencia Y por:

- sólo la sustitución de aminoácidos Z, o

- la sustitución de aminoácidos Z y una o dos sustituciones de aminoácidos que son diferentes de la sustitución de aminoácidos Z.

La expresión "SEQ ID NO: X con una sustitución de aminoácidos en la posición Y" significa una secuencia que se diferencia de SEQ ID NO: X por una sustitución de aminoácidos en la posición Y de SEQ ID NO: X.

Tal y como se usa en la presente memoria, "CHIKV" significa virus Chikungunya que es un virus de ARN de cadena positiva con cubierta del género alfavirus de la familia Togaviridae como se ha descrito anteriormente en la parte de introducción. Dentro de CHIKV también se engloban las diferentes cepas infecciosas representativas ("cepas de CHIKV") incluyendo pero no limitado al genotipo del este/centro/sur de África (ECSA) tal como la cepa LR2006 OPY1 [LR], como un ejemplo, que tiene una secuencia mostrada bajo el Número de Acceso NCBI: DQ443544.2, fechado el 24 de octubre de 2006; el genotipo África occidental tal como la cepa NI 64 IbH35 como otro ejemplo que tiene una secuencia mostrada bajo el Número de Acceso NCBI: HM045786.1, fechada el 28 de diciembre de 2010 y el genotipo asiático tal como la cepa RSU1 como otro ejemplo que tiene una secuencia mostrada bajo el Número de Acceso NCBI: HM045797.1, fechada el 28 de diciembre de 2010 y las cepas 99659 [2014 caribeña] por ejemplo que tiene una secuencia mostrada bajo el Número de Acceso NCBI: KJ451624, fechada el 11 de septiembre de 2014. Otras cepas que pertenecen a los diferentes genotipos se han identificado tal como la cepa S27 como otro ejemplo que tiene una secuencia mostrada bajo el Número de Acceso NCBI: AF369024.2, fechada el 14 de enero de 2014 y bajo la referencia de UniProtKB/Swiss-Prot: Q8JUX5, fechada el 16 de septiembre de 2015 así como SL15649 como otro ejemplo que tiene una secuencia mostrada bajo el Número de Acceso NCBI: GU189061, fechada el 14 de diciembre de 2011. Otros ejemplos de cepas de CHIKV referenciadas están disponibles en la Base de Datos de Virus Patógenos, con respecto a sus genomas en: https://www.viprbrc.org/brc/vipr_genome_search.spg?método=doQuickTextSearch&decoraior=loga&pageTo=1&selectionContext=1476362322448, o respecto a sus proteínas asociadas en:

https://www.viprbrc.org/brc/vipr_protein_search.spg?método=doQuickTextSearch&decorator=toga&pageTo=1&selectionContext=1476362669763.

De manera similar al genoma de otros alfavirus, el genoma de CHIKV codifica dos glicoproteínas de cubierta, E2 y E1, que derivan de un precursor de poliproteína mayor (cápside/E3/E2/6K/E1; como se muestra bajo el Número de Acceso NCBI: NC_004162.2, fechada el 27 de junio de 2012) y están incluidas en la membrana viral. El virión maduro está comprendido por tres proteínas estructurales principales: una proteína de nucleocápside y dos glicoproteínas, E1 y E2, en la que E2 funciona en la unión a células y E1 participa en la fusión del virus. Una tercera glicoproteína, E3, está asociada con viriones maduros en algunos alfavirus, pero no otros, mientras la proteína 6K, un péptido asociado a membrana creado por la escisión del precursor de poliproteína para liberar E2 y E1, se incorpora en partículas a un nivel bajo. La organización de las glicoproteínas de superficie del alfavirus en partículas se ha definido usando microscopía de crio-electrón (Cryo-EM), mientras la estructura atómica de la glicoproteína de CHIKV se ha resuelto recientemente por cristalografía de rayos X tanto para partículas maduras como para la poliproteína precursora inmadura. 240 copias de cada una de las tres glicoproteínas (E3/E2/E1) se combinan para formar 80 púas en el virus maduro que constituyen una cubierta de proteína icosaédrica alrededor de la membrana viral. (Voss JE et al 2010, Nature 468:709–712). El plegamiento, transporte a la superficie y función de estas glicoproteínas se basa en sus interacciones correctas entre sí. E1 consiste en tres dominios de lámina b, denominados I, II y III; E2 contiene tres dominios semejantes a inmunoglobulina (A, B y C, estando A en el extremo N). En el complejo, el dominio B se encuentra en el extremo distal de la membrana y se pone en contacto con E3, el dominio C está más cerca de la membrana viral y el dominio A está en el centro (Fox JM et al 2015, Cell 163:1095-1107 y WO 2015010125). Las secuencias e informaciones para las proteínas E1, E2 y E3 de CHIKV se proporcionan en las entradas de PDB No. 2xFB y 2xFC (última actualización: 24 de noviembre de 2010), entradas de PDB No. 3N40, 3N41, 3N42, 3N43 y 3N44 (última actualización: 01 de diciembre de 2010), respectivamente, como ejemplos no limitantes.

Anticuerpos descritos en la invención

Para propósitos terapéuticos, es deseable generar mAb que sean los más idóneos para las propiedades farmacéuticas requeridas de ellos mediante la mejora, en particular, de su unión al o a los antígenos frente a los que están dirigidos, su estabilidad, farmacocinética y farmacodinámica, así como sus funciones.

Como un primer objeto, los anticuerpos anti-CHIKV se basan en anticuerpos parentales completamente humanos, respectivamente mAb1 y mAb2, que tienen una alta afinidad de unión (en el rango nanomolar) frente a diferentes cepas de CHIKV y particularmente a su proteína E2 respectiva. Por lo tanto, presentan actividades neutralizantes amplias y ultrapotentes frente a varias cepas de CHIKV.

MAb1 comprende:

- un dominio variable de cadena pesada que consiste en la secuencia: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYSFTSYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISTYK** **GYT**QYAQNFQGRVTITTDTPATTVYMELRSLRSDDTAVYYC**ARVLSETGYFYYYYY** **GMDV**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1) en el que las CDR se muestran en carácter en negrita, respectivamente, CDRH1 (**GYSFTSYG,** SEQ ID NO: 5), CDRH2 (**ISTYKGYT,** SEQ ID NO: 6) y CDRH3 (**ARVLSETGYFYYYYYGMDV,** SEQ ID NO: 7). Las regiones marco engloban CDRH1, CDRH2 y CDRH3;
- un dominio variable de cadena ligera que consiste en la secuencia: QAVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGS**SSNIGADYN**VHWYQLLPGTAPKLLIY**GNT**NR PSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC**QSYDSSLSASV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 2) en el que las CDR se muestran en carácter en negrita, respectivamente, CDRL1 (**SSNIGADYN,** SEQ ID NO: 8), CDRL2 (**GNT**) y CDRL3 (**QSYDSSLSASV,** SEQ ID NO: 10). Las regiones marco engloban CDRL1, CDRL2 y CDRL3;

Mab2 comprende:

- un domino variable de cadena pesada que consiste en la secuencia: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVS**GYILSKLS**VHWVRQAPGKGLEWMGG**SERE** **DGET**VYAQKFQGRISLTEDTSIETAYMELSSLSSEDTAVYYC**ATGGFWSMIGGNGV** **DY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 3) en el que las CDR se muestran en carácter en negrita, respectivamente, CDRH1 (**GYILSKLS,** SEQ ID NO: 11), CDRH2 (**SEREDGET,** SEQ ID NO: 12) y CDRH3 (**ATGGFWSMIGGNGVDY,** SEQ ID NO: 13). Las regiones marco engloban CDRH1, CDRH2 y CDRH3;
- un domino variable de cadena ligera que consiste en la secuencia: QAVVTQSPSSLPASVGDRVTITCRAS**QDIRNN**LGWYQQKPGKAPERLIY**GTS**NLQS GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**LQHNSYPPT**FGRGTKVEIK (SEQ ID NO: 4) en el que las CDR se muestran en carácter en negrita, respectivamente, CDRL1 (**QDIRNN,** SEQ ID NO: 14), CDRL2 (**GTS**) y CDRL3 (**LQHNSYPPT,** SEQ ID NO: 16). Las regiones marco engloban CDRL1, CDRL2 y CDRL3.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos variantes de mAb1 y mAb2 que se unen a CHIKV y que tienen unión mejorada al receptor FcRn en un entorno ácido porque comprenden al menos una sustitución de aminoácidos en su dominio Fc. Dichas mutaciones resultan en una vida media en suero incrementada de dichos anticuerpos variantes cuando se administran a un paciente. Los ejemplos no limitativos de dichas sustituciones incluye modificaciones en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, H/L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, A, W, H, F o Y); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434, en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan usando la Numeración del índice EU (Figura 1).

Los inventores identificaron, como se muestra en la figura 4 y ejemplo 2, que la unión a receptores FcRn humanos y de ratón a pH 6 se incrementó cuando las sustituciones seleccionadas del grupo siguiente se introdujeron en la región Fc de los anticuerpos mAb1 o mAb2:

i. una alanina en la posición 434, o
ii. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o
iii. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, o
iv. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, o
v. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256.

Además, los inventores mostraron, como se describe en el ejemplo 3 y figura 5, que la unión de mAb1 y mAb2 a su diana pE2-E1 de CHIKV no se vio afectada por las sustituciones como se ha mencionado anteriormente, cuando se introducen en su región Fc y que incrementan la unión a FcRn humano y de ratón. Como se muestra en el ejemplo 2 y figura 4, las sustituciones de la región Fc de mAb1 o mAb2 muestran la unión más fuerte a FcRn humano y de ratón cuando, bien una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256 respectivamente o una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, se introducen en su región Fc respectiva.

Como se muestra en la técnica, la región Fc es esencial en la determinación de las funciones biológicas de las inmunoglobulinas, denominadas “funciones

efectoras". ADCC es uno de los mecanismos, parte de la inmunidad mediada por células mediante el que las células efectoras del sistema inmune (principalmente células Asesinas Naturales) lisan una célula diana a la que se han unido anticuerpos específicos. Por lo tanto, ADCC es uno de los mecanismos que pueden limitar y contener las infecciones. Las actividades mediadas por células implican la unión del dominio Fc a receptores Fc tal como FcγRI (CD64), FcγRII, FcγRIII de las células efectoras.

Como se describe en la presente memoria, en la que anticuerpos monoclonales son altamente específicos de cepas de CHIKV y se dedican a propósitos terapéuticos de tratamiento, su potencial para activar ADCC es un parámetro importante a medir ya que ADCC parece que participa en la actividad de los anticuerpos anti-CHIKV en el control de la infección. Como se muestra en el ejemplo 4 y figura 6, los inventores han mostrado que la unión de mAb1 y mAb2 a FcγRIIIa se retenía cuando se introdujeron sustituciones seleccionadas del grupo siguiente en su región Fc respectiva:

i. una alanina en la posición 434, o
ii. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o
iii. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, o
iv. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente.

Por el contrario, la unión a FcγRIIIa se redujo cuando mAb1 y mAb2 se sustituyeron con una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256 respectivamente.

Por lo tanto, los inventores identificaron anticuerpos con unión mejorada al receptor FcRn humano mientras retenían la unión a FcγRIIIa, haciendo a los anticuerpos de la presente invención compatibles con una vida media incrementada mientras mantienen sus funciones efectoras.

Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado que se une a CHIKV y que comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL), en el que:

i. dichas CDRH tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, y dichas CDRL tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, o

ii. dichas CDRH tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, y dichas CDRL tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, o

iii. dichas CDRH y CDRLH tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de i. o ii. por una o dos sustituciones de aminoácidos;

y en el que dicho anticuerpo comprende además una región Fc que comprende al menos un residuo seleccionado del grupo que consiste en:

i. una alanina en la posición 434, o

ii. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o

iii. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, o

iv. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, o

v. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente,

en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

Las regiones Fc que incluyen dichas sustituciones se muestran en las figuras 1 y 2 (SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 59 a 63).

En una realización, un anticuerpo anti-CHIKV comprende una región Fc que comprende al menos una alanina en la posición 434. En otra realización, un anticuerpo anti-CHIKV comprende una región Fc que comprende una alanina en las posiciones 307, 380 y 434. En otra realización, un anticuerpo anti-CHIKV comprende una región Fc que comprende una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428. En otra realización, un anticuerpo anti-CHIKV comprende una región Fc que comprende una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434. En otra realización, un anticuerpo anti-CHIKV comprende una región Fc que comprende una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256,

Los anticuerpos descritos en la invención derivan de mAb1 o mAb2 y comprenden tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL), respectivamente, que tienen:

i. secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, y secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, respectivamente, o

ii. secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, y secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, o

iii. secuencias de aminoácidos que se diferencian de las secuencias de i. o ii. por una o dos sustituciones de aminoácidos;

En una realización adicional, los anticuerpos comprenden CDR con secuencias de aminoácidos que se diferencian por una o dos sustituciones de aminoácidos de las secuencias de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, y secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, respectivamente, o por una o dos sustituciones de aminoácidos de las secuencias de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, y de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente.

Una sustitución de aminoácidos según la invención puede ser una sustitución de aminoácidos conservativa o no conservativa. Los ejemplos de sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1

Sustituciones conservativas	**Tipo de Aminoácido**
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Tyr	Aminoácidos con cadenas laterales alifáticas hidrófobas
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	Aminoácidos con cadenas laterales no cargadas pero polares
Asp, Glu	Aminoácidos con cadenas laterales ácidas
Lys, Arg, His	Aminoácidos con cadenas laterales básicas
Gly	Cadena lateral neutra

En otra realización, el anticuerpo comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos y

en el que dicho anticuerpo comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos y una región Fc que comprende al menos un residuo seleccionado del grupo que consiste en:

i. una alanina en la posición 434, o
ii. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o
iii. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, o
iv. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, o
v. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente,

en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización, el anticuerpo deriva de mAb2 y comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos y en el que dicho anticuerpo comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos y una región Fc que comprende al menos un residuo seleccionado del grupo que consiste en:

i. una alanina en la posición 434, o
ii. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o
iii. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, o
iv. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, o
v. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente,

en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización, el anticuerpo comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, respectivamente, y una región Fc que comprende al menos un residuo seleccionado del grupo que consiste en:

i. una alanina en la posición 434, o
ii. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o
iii. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, o
iv. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, o
v. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente,

en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En una realización adicional, el anticuerpo variante (mAb3) comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, respectivamente, y una región Fc que comprende al menos una alanina en la posición 434, en el que dicha posición de aminoácidos se proporciona según el índice EU.

En otra realización adicional, el anticuerpo variante (mAb4) comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, respectivamente, y una región Fc que comprende al menos una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización adicional, el anticuerpo variante (mAb5) comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que

tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, respectivamente, y una región Fc que comprende al menos una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización adicional, el anticuerpo variante (mAb7) comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, respectivamente, y una región Fc que comprende al menos una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización adicional, el anticuerpo variante (mAb6) comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, respectivamente, y una región Fc que comprende al menos una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente, en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización, el anticuerpo variante comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, respectivamente, y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, y una región Fc que comprende al menos un residuo seleccionado del grupo que consiste en:

i. una alanina en la posición 434, o
ii. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o
iii. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, o
iv. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, o
v. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente,

en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En una realización adicional, el anticuerpo variante comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, respectivamente, y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, y una región Fc que comprende al menos una alanina en la posición 434, en el que dicha posición de aminoácidos se proporciona según el índice EU.

En otra realización adicional, el anticuerpo variante comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, respectivamente, y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, y una región Fc que comprende al menos una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización adicional, el anticuerpo variante comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, respectivamente, y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, y una región Fc que comprende al menos una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización adicional, el anticuerpo variante (mAb8) comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, respectivamente, y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, y una región Fc que comprende al menos una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización adicional, el anticuerpo variante (mAb9) comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, respectivamente, y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16,

respectivamente, y una región Fc que comprende al menos una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente, en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

Los inventores mostraron, como se describe en el ejemplo 3 y figura 5, que la unión de mAb1 y mAb2 a su pE2-E1 diana de CHIKV no se vio afectada cuando comprende una región Fc que comprende al menos un residuo como se ha mencionado anteriormente. Los inventores también mostraron que estos anticuerpos, que comprenden una región Fc que comprende al menos un residuo como se ha mencionado anteriormente, todos presentan una unión incrementada a FcRn humano y de ratón (ejemplo 2 y figura 4) lo que tiene un impacto positivo en su vida media respectiva y consecuentemente es beneficioso para la terapia anti-CHIKV; mostrándose la mayor unión a FcRn en ser humano y en ratón cuando, bien una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256 respectivamente o una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, se introducen en la región Fc respectiva.

Por lo tanto, en una realización ejemplar, el anticuerpo variante comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, respectivamente, y una región Fc que comprende al menos una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, o una región Fc que comprende al menos una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente, en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

Además, como se muestra en el ejemplo 4 y figura 6, los inventores han mostrado que la unión de mAb1 y mAb2 a FcγRIIIa se retenía cuando se introdujeron sustituciones seleccionadas del grupo siguiente en su región Fc respectiva:

i. una alanina en la posición 434, o
ii. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o
iii. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, o
iv. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente.

Por el contrario, la unión a FcγRIIIa se redujo cuando mAb1 y mAb2 se sustituyeron con una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256 respectivamente.

Por lo tanto, los inventores identificaron al menos un anticuerpo con unión inalterada a su diana y unión mejorada al receptor FcRn humano mientras retenía la unión a FcγRIIIa, haciéndolo compatible con un desarrollo de terapéuticos para prevenir y tratar la enfermedad CHIKV respecto a su vida media incrementada mientras se mantienen sus funciones efectoras.

En una realización típica, el anticuerpo variante comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, respectivamente, y una región Fc que comprende al menos una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otras palabras, el anticuerpo descrito en la presente memoria puede describirse como un anticuerpo monoclonal aislado que se une a CHIKV y que comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL), en el que:

i. dichas CDRH tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, y dichas CDRL tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, o
ii. dichas CDRH tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, y dichas CDRL tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, o
iii. dichas CDRH y CDRLH tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de las secuencias de i. o ii. por una o dos sustituciones de aminoácidos;

y en el que dicho anticuerpo comprende además una región Fc que comprende al menos un residuo seleccionado del grupo que consiste en:

iv. una alanina en la posición 434, o
v. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, o
vi. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, o
vii. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, o

viii. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256,

en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU;

y en el que el anticuerpo tiene una o más de las propiedades siguientes:

i. se une a la diana pE2-E1 de CHIKV con una constante de disociación de unión en equilibrio (K_D) de menos de aproximadamente 10 nM;

ii. se une a FcRn humano con una K_D de menos de aproximadamente 200 nM;

iii. se une a FcγRIII humano con una K_D de menos de aproximadamente 600 nM;

En una realización el anticuerpo según la invención se une a una diana pE2-E1 de CHIKV con una constante de disociación de unión en equilibrio (K_D) de menos de aproximadamente 5 nM, menos de aproximadamente 4nM, 3, 2, 1nM, menos de aproximadamente 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3 nM o menos de aproximadamente 0,25 nM, 0,20nM, 0,15nM, 0,1nM.

En otra realización, el anticuerpo según la invención se une a FcRn humano con una K_D de menos de aproximadamente 200 nM, menos de aproximadamente 100 nM, menos de aproximadamente 50 nM, 45, 40, 35, 30nM o menos de aproximadamente 25 nM, 20, 15 ó 10NM.

En otra realización, el anticuerpo según la invención se une a FcγRIII humano con una K_D de menos de aproximadamente 600 nM, menos de aproximadamente 500 nM, 400 nM, 300 nM, menos de aproximadamente 200 nM, 150, 100 ó 50nM.

La unión a la diana pE2-E1 de CHIKV, FcRn humano y FcγRIII humano puede medirse por ejemplo por un ensayo de resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, a 37°C. Este ensayo puede realizarse por ejemplo como se describe en los Ejemplos 1 a 4.

La "región Fc" según la invención puede pertenecer a una de las cuatro subclases humanas de cadenas pesadas de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) que determinan la actividad funcional de los anticuerpos. En una realización, la región Fc pertenece a una cadena pesada subtipo IgG1. En otra realización, la región Fc pertenece a una cadena pesada subtipo IgG2. En otra realización, la región Fc pertenece a una cadena pesada subtipo IgG3. En otra realización, la región Fc pertenece a una cadena pesada subtipo IgG4. En otra realización, la región Fc

comprende o consiste en una secuencia de región FC de lgG1 (SEQ ID NO: 17), excepto por las mutaciones descritas en la presente memoria (figuras 1 y 2).

En una realización, el anticuerpo tiene una región Fc que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 17. En otra realización, el anticuerpo tiene una región Fc que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 17. En otra realización, el anticuerpo tiene una región Fc que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 17. En una realización adicional, el anticuerpo tiene una región Fc que comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 17.

En una realización, el anticuerpo tiene una región Fc que comprende una o varias de las sustituciones como se ha descrito anteriormente y en los ejemplos. En otra realización, el anticuerpo tiene una región Fc que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62 y 63.

Alternativamente o adicionalmente, pueden introducirse un residuo o residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro inter-cadena en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado tiene una capacidad de internalización mejorada y/o capacidad de matar células mediada por complemento y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) incrementadas (Caron, P.C. et al., 1992, J Exp Med. 176(4): 1191-1195 y Shopes B., 1992, J Immunol. 148(9): 2918-2922).

En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 1. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 1. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 1. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 1.

En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 2. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 2. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 2. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 2.

En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 19. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 19. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 19. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 19.

En otra realización, la cadena ligera del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 20. En otra realización, la cadena ligera del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 20. En otra realización, la cadena ligera del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 20. En otra realización, la cadena ligera del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 20.

En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 23. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 23. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 23. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una

secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 23.

En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 25. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 25. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 25. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 25.

En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 27. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 27. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 27. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 27.

En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 29. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 29. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 29. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 29.

En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 31. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 31. En otra

realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 31. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 31.

En una realización, el anticuerpo es una combinación entre una cadena pesada y una cadena ligera o entre una cadena pesada y una cadena ligera codificadas por una secuencia de nucleótidos de las secuencias como se describe en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2

	Secuencias de aminoácidos		**Secuencias de nucleótidos**	
	HC	**LC**	**HC**	**LC**
mAb3 = mAb1A	SEQ ID NO : 23	SEQ ID NO : 20	SEQ ID NO : 24	SEQ ID NO : 22
mAb4 = mAb1AAA	SEQ ID NO : 25	SEQ ID NO : 20	SEQ ID NO : 26	SEQ ID NO : 22
mAb5 = mAb1QL	SEQ ID NO : 27	SEQ ID NO : 20	SEQ ID NO : 28	SEQ ID NO : 22
mAb6 = mAb1YTE	SEQ ID NO : 29	SEQ ID NO : 20	SEQ ID NO : 30	SEQ ID NO : 22
mAb7 = mAb1LS	SEQ ID NO : 31	SEQ ID NO : 20	SEQ ID NO : 32	SEQ ID NO : 22

En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 3. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 3. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 3. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 3.

En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 4. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 4. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 4. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 4.

En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 37. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 37. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 37. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 37.

En otra realización, la cadena ligera del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 38. En otra realización, la cadena ligera del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 38. En otra realización, la cadena ligera del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 38. En otra realización, la cadena ligera del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 38.

En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 41. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 41. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 41. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una

secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 41.

En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 43. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 43. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 43. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 43.

En una realización, el anticuerpo es una combinación entre una cadena pesada y una cadena ligera o entre una cadena pesada y una cadena ligera codificadas por una secuencia de nucleótidos de las secuencias como se describe en la tabla 3 siguiente.

Tabla 3

	Secuencias de aminoácidos		**Secuencias de nucleótidos**	
	HC	**LC**	**HC**	**LC**
mAb8 = mAb2YTE	SEQ ID NO : 41	SEQ ID NO : 38	SEQ ID NO : 42	SEQ ID NO : 40
mAb9 = mAb2LS	SEQ ID NO : 43	SEQ ID NO : 38	SEQ ID NO : 44	SEQ ID NO : 40

Como ya se ha mencionado, para propósitos terapéuticos, es altamente deseable generar mAb en los que podamos confiar en términos de estabilidad, farmacocinética y farmacodinámica, así como sus funciones, mientras retienen sus afinidades de unión a su diana específica.

En un segundo aspecto, los inventores identificaron puntos calientes que pueden usarse para incrementar la homogeneidad y mitigar las trabas de química, fabricación y control (CMC). Dichos análisis se centraron en oxidación, desamidación, isomerización, escisión ácida, glicosilación, de resto no deseado expuesto a disolvente, así como residuos de Cisteína libres adicionales,

identificados, bien *in silico* o experimentalmente, como que resultan potencialmente en productos de degradación o heterogeneidad de las preparaciones de anticuerpo. Como ejemplos, la desamidación de residuos de asparagina y glutamina puede ocurrir dependiendo de factores tales como pH y exposición en superficie. Los residuos de asparagina son particularmente susceptibles a desamidación, principalmente cuando están presentes en la secuencia Asn-Gly, y en menor grado en otras secuencias de dipéptido tal como Asn-Ala. Cuando dicho sitio de desamidación, en particular Asn-Gly, está presente en un anticuerpo o polipéptido descrito en la presente memoria, puede por lo tanto ser deseable eliminar el sitio, típicamente por sustitución conservativa para eliminar uno de los residuos implicados.

Como se muestra en el ejemplo 1 y figura 3, los inventores identificaron al menos tres aminoácidos en CDRH3 de mAb2 (SEQ ID NO: 13) que pueden tener consecuencias perjudiciales per se o porque crean un resto no favorable basado en los criterios previos cuando se usa para propósitos terapéuticos. Como se muestra en la figura 3, los inventores generan al menos tres anticuerpos variantes de mAb2 con sustituciones únicas respectivamente en las posiciones 8, 12 y 13 de SEQ ID NO: 13 con el fin de suprimir aminoácidos o restos no deseados, que mantienen la afinidad de unión para su antígeno pE2-E1 de CHIKV. Así, los inventores generaron variantes de mAb2, con respecto a criterios CMC, con mayor estabilidad, mayor homogeneidad cuando se producen en biorreactores con menos impurezas relacionadas con producto, mientras mantienen su afinidad para la diana.

Así, en un segundo aspecto, la invención se refiere a anticuerpos variantes mAb2 o un fragmento de unión a antígeno de éste que se une a CHIKV y que comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 33, respectivamente, o que tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste comprende además tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, o que tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y en el que:

i. el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, y/o
ii. el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N; y/o

iii. el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G.

En una realización, el anticuerpo variante comprende CDRH con secuencias de aminoácidos que se diferencian por una o dos sustituciones de aminoácidos de secuencias de SEQ ID NO: 11, 12 y 33, y comprende CDRL con secuencias de aminoácidos que se diferencian por una o dos sustituciones de aminoácidos de secuencias de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente. Por "secuencia de aminoácidos que se diferencia por una o dos sustituciones de aminoácidos", con respecto a la SEQ IDNO: 33, se quiere decir sustituciones de aminoácidos adicionales comparado con las sustituciones consideradas en las posiciones, 8, 12 y 13 de SEQ ID NO: 33 como se describe en la invención.

Una sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución de aminoácidos conservativa o no conservativa. Los ejemplos de sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 anterior.

En otra realización, el anticuerpo variante comprende una CDRH3 de SEQ ID NO: 33 en el que el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, y el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N; y el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G. En otra realización, dicho anticuerpo variante comprende una CDRH3 de SEQ ID NO: 33 en el que el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 es M, y el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N y el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G. En otras realizaciones, dicho anticuerpo variante comprende, respectivamente: una CDRH3 de SEQ ID NO: 33 en el que el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, y el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 es N y el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G; una CDRH3 de SEQ ID NO: 33 en el que el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, y el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N y el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 es G; una CDRH3 de SEQ ID NO: 33 en el que el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 es M, y el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 es N y el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G; una CDRH3 de SEQ ID NO: 33 en el que el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 es M, y el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N y el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 es G; una CDRH3 de SEQ ID NO: 33 en el que el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, y el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 es N y el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID

NO: 33 es G; una CDRH3 de SEQ ID NO: 33 en el que el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, y el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 es N y el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G. En otros términos, SEQ ID NO: 33 no puede ser idéntica a SEQ ID NO: 13.

Por la expresión "el aminoácido en la posición X no es M", se quiere decir que dicho aminoácido en la posición X puede ser cualquier aminoácido excepto M. De forma similar, por la expresión "el aminoácido en la posición X no es N", se quiere decir que dicho aminoácido en la posición X puede ser cualquier aminoácido excepto N. De forma similar, por la expresión "el aminoácido en la posición X no es G", se quiere decir que dicho aminoácido en la posición X puede ser cualquier aminoácido excepto G. Como un ejemplo no limitativo, el anticuerpo variante en el que dicha variante comprende una CDRH3 de SEQ ID NO: 33 en el que el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, puede comprender en dicha posición 8 cualquier aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: A, G, V, L, I, F, W, Y, S, T, N, Q, C, D, E, K, R y H. Como otro ejemplo no limitativo, el anticuerpo variante en el que dicha variante comprende una CDRH3 de SEQ ID NO: 33 en el que el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N, puede comprender en dicha posición 12 cualquier aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: A, G, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, Q, C, D, E, K, R y H. Como otro ejemplo no limitativo, el anticuerpo variante en el que dicha variante comprende una CDRH3 de SEQ ID NO: 33 en el que el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G, puede comprender en dicha posición 13 cualquier aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: A, N, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, Q, C, D, E, K, R y H.

En otra realización, el anticuerpo variante o un fragmento de unión a antígeno de éste, comprende:

- Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11;
- Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12;
- Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 33;
- Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14;
- Una CDRL2 que consiste en GTS;
- Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16, y en el que:
    i. el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, y/o
    ii. el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N; y/o
    iii. el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G.

En otra realización, el anticuerpo variante o un fragmento de unión a antígeno de éste, comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 33, respectivamente, o que tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y comprende además tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, o que tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y en el que:

i. el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, o
ii. el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N; o
iii. el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G.

En otra realización, el anticuerpo variante o un fragmento de unión a antígeno de éste, comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 33, respectivamente, y comprende además tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, y en el que:

i. el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, o
ii. el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N; o
iii. el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G.

En otras palabras y como se muestra en el ejemplo 1 y figura 3, los inventores identificaron anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de éstos que comprenden tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 33, respectivamente, o que tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y que comprenden además tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, o que tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y en el que:

i. el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, o
ii. el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N; o
iii. el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G,

y en el que el anticuerpo tiene una o más de las propiedades siguientes:

i. se une a la diana pE2-E1 de CHIKV con una constante de disociación de unión en equilibrio (K_D) de menos de aproximadamente 10 nM;

ii. se une a FcRn humano con una K_D de menos de aproximadamente 200 nM;

iii. se une a FcγRIII humano con una K_D de menos de aproximadamente 600 nM;

En una realización, el anticuerpo se une a la diana pE2-E1 de CHIKV con una constante de disociación de unión en equilibrio (K_D) de menos de aproximadamente 5 nM, menos de aproximadamente 4nM, 3, 2, 1nM, menos de aproximadamente 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3 nM o menos de aproximadamente 0,25 nM, 0,20nM, 0,15nM, 0,1nM.

En otra realización, el anticuerpo se une a FcRn humano con una K_D de menos de aproximadamente 200 nM, menos de aproximadamente 100 nM, menos de aproximadamente 50 nM, 45, 40, 35, 30nM o menos de aproximadamente 25 nM, 20, 15 ó 10NM.

En otra realización, el anticuerpo según la invención se une a FcγRIII humano con una K_D de menos de aproximadamente 600 nM, menos de aproximadamente 500 nM, 400 nM, 300 nM, menos de aproximadamente 200 nM, 150, 100 ó 50nM.

La unión a la diana pE2-E1 de CHIKV, FcRn humano y FcγRIII humano puede medirse por ejemplo por un ensayo de resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, a 37°C. Este ensayo puede por ejemplo realizarse como se describe en los Ejemplos 1 a 4.

En otra realización, el anticuerpo variante o un fragmento de unión a antígeno de éste, comprende CDRH3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, en el que el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 se selecciona del grupo que consiste en I, L, V, Q y N.

En otra realización, el anticuerpo variante (mAb10) o un fragmento de unión a antígeno de éste, comprende:

- Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11;
- Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12;
- Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 34;
- Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14;

- Una CDRL2 que consiste en GTS;
- Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16.

En otra realización, el anticuerpo variante o un fragmento de unión a antígeno de éste, comprende CDRH3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, en el que el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 se selecciona del grupo que consiste en Q, E, S, T y D.

En otra realización, el anticuerpo variante (mAb11) o un fragmento de unión a antígeno de éste, comprende:

- Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11;
- Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12;
- Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 35;
- Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14;
- Una CDRL2 que consiste en GTS;
- Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16.

En otra realización, el anticuerpo variante o un fragmento de unión a antígeno de éste, comprende CDRH3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, en el que el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 se selecciona del grupo que consiste en A, S y T.

En otra realización, el anticuerpo variante (mAb12) o un fragmento de unión a antígeno de éste, comprende:

- Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11;
- Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12;
- Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 36;
- Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14;
- Una CDRL2 que consiste en GTS;
- Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16.

En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 56. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 56. En otra

realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 56. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 56.

En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 57. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 57. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 57. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 57.

En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 58. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 58. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 58. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de su cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 58.

En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 45. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 45. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 45. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una

secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 45.

En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 47. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 47. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 47. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 47.

En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 49 o comprende o consiste en una secuencia codificada por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 50. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 49. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 49. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 49.

En una realización, el anticuerpo es una combinación entre una cadena pesada y una cadena ligera o entre una cadena pesada y una cadena ligera codificadas por una secuencia de nucleótidos de las secuencias como se describe en la tabla 4 siguiente.

Tabla 4

	Secuencias de aminoácidos		**Secuencias de nucleótidos**	
	HC	**LC**	**HC**	**LC**
mAb10 = mAb2M104I	SEQ ID NO : 45	SEQ ID NO : 38	SEQ ID NO : 46	SEQ ID NO : 40
mAb11 = mAb2N108Q	SEQ ID NO : 47	SEQ ID NO : 38	SEQ ID NO : 48	SEQ ID NO : 40
mAb12	SEQ ID NO : 49	SEQ ID NO : 38	SEQ ID NO : 50	SEQ ID NO : 40

= mAb2G109A				

En un tercer aspecto, los inventores combinaron los aspectos beneficiosos anteriores. Los inventores generaron variantes de mAb2 que, por una parte, se sustituyeron en CDRH3 para suprimir aminoácidos o restos no favorables basados en criterios de trabas de química, fabricación y control (CMC) y por otra parte, tenían una unión mejorada al receptor FcRn en un entorno ácido mientras retenían la unión a FcγRIIIa asociada con funciones efectoras porque comprendían al menos una sustitución de aminoácidos en su dominio Fc.

Como se describe en el ejemplo 2 y Figura 4C y 4D, los inventores mostraron que una variante de mAb2 en el que se introdujeron sustituciones en su CDRH3 presentaba una unión incrementada a receptores FcRn humano y de ratón a pH 6 cuando las sustituciones seleccionadas del grupo siguiente se introdujeron en su región Fc:

i. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, o
ii. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256.

Además, los inventores confirmaron, como se describe en el ejemplo 3 y figura 5, que la unión a su diana pE2-E1 de CHIKV no se vio afectada para anticuerpos que acumulaban sustituciones en su CDRH3 y su región Fc como se ha descrito anteriormente.

Como se muestra en el ejemplo 4 y figuras 6B y 6D, los inventores también confirmaron que para dichos anticuerpos la unión a FcγRIIIa se retuvo al menos cuando una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, se introdujeron en su región Fc. Por el contrario, la unión a FcγRIIIa se redujo cuando dichos anticuerpos se sustituyeron con una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256 respectivamente.

Por lo tanto, los inventores confirmaron en anticuerpos según la invención que habían sido sustituidos en CDRH3 para suprimir aminoácidos o restos no favorables sobre la base de criterios de trabas de química, fabricación y control (CMC), los efectos beneficiosos de sustituciones introducidas en sus regiones Fc respectivas.

Así, en este tercer aspecto, la invención se refiere a anticuerpos variantes mAb2 o un fragmento de unión a antígeno de éstos que se une a CHIKV y que comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 33, respectivamente, o que tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste comprende además tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, o que tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y en el que:

i. el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, y/o
ii. el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N; y/o
iii. el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G;

y en el que dicho anticuerpo comprende una región Fc que comprende al menos mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en:

i. una alanina en la posición 434, o
ii. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o
iii. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, o
iv. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, o
v. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente, en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En un tercer aspecto, se entiende que cualquier anticuerpo del segundo aspecto, es decir. que comprende una CDRH de SEQ ID NO:33, puede comprender cualquier mutación en la región Fc descrita en el primer aspecto, comprendiendo dicho anticuerpo una región Fc con al menos un residuo seleccionado del grupo que consiste en:

i. una alanina en la posición 434, o
ii. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o
iii. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, o

iv. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, o

v. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente,

en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización, el anticuerpo variante (mAb13) o un fragmento de unión a antígeno de éste, comprende:

- Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11;
- Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12;
- Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 35;
- Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14;
- Una CDRL2 que consiste en GTS;
- Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16;

y una región Fc que comprende al menos una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente, en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización, el anticuerpo variante (mAb14) o un fragmento de unión a antígeno de éste, comprende:

- Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11;
- Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12;
- Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 35;
- Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14;
- Una CDRL2 que consiste en GTS;
- Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16.

y una región Fc que comprende al menos una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 51. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 51. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 51. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una

secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 51.

En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 53. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 85% de identidad con SEQ ID NO: 53. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 53. En otra realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende o consiste en una secuencia que tiene 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con SEQ ID NO: 53.

En una realización, el anticuerpo según este aspecto particular es una combinación entre una cadena pesada y una cadena ligera o entre una cadena pesada y una cadena ligera codificadas por una secuencia de nucleótidos de las secuencias como se describe en la tabla 5 siguiente

Tabla 5

	Secuencias de aminoácidos		**Secuencias de nucleótidos**	
	HC	**LC**	**HC**	**LC**
mAb13 = mAb2N108QYTE	SEQ ID NO : 51	SEQ ID NO : 38	SEQ ID NO : 52	SEQ ID NO : 40
mAb14 = mAb2N108QLS	SEQ ID NO : 53	SEQ ID NO : 38	SEQ ID NO : 54	SEQ ID NO : 40

Ácidos nucleicos, vectores y células huésped recombinantes

Un objeto adicional descrito en la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende o que consiste en una secuencia que codifica un anticuerpo como se define en la presente memoria, o un polipéptido, una cadena pesada, una cadena ligera o un fragmento que comprende o que consiste en un anticuerpo descrito en la presente memoria o un fragmento de éste.

Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede incluirse en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector viral.

Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el que una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) puede introducirse en una célula huésped, de manera que se transforma el huésped y se estimula la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

De esta manera, un objeto adicional descrito en la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico como se describe en la presente memoria.

Dichos vectores pueden comprender elementos reguladores, tal como un promotor, potenciador, terminador y semejantes, para causar o dirigir la expresión de dicho polipéptido después de la administración a un sujeto. Los ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para células animales incluyen potenciador y promotor del citomegalovirus humano (Nelson, J., 1996 J. Virology 70: 3207-3986), promotor y potenciador temprano de SV40 (Mizukami, T. e Itoh, S. et al., 1987, J Biochem. 101(5): 1307-1310), promotor y potenciador LTR del virus de la leucemia de ratón de Moloney (Kuwana Y. et al., 1987, Biochem Biophys Res Commun. 149: 960-968), promotor (Mason, J.O. et al., 1985, Cell 41: 479-487) y potenciador (Gillies, S.D. et al., 1983, Cell 33: 717-728) de la cadena H de inmunoglobulina y semejantes.

Puede usarse cualquier vector de expresión para células animales, siempre que un gen que codifica la región C de anticuerpo humano pueda insertarse y expresarse. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji, H. et al., 1990, Cytotechnology 3(2): 133-140), pAGE103 (Mizukami, T. e Itoh, S. et al., 1987, J Biochem. 101(5): 1307-1310), pHSG274 (Brady, G. et al., 1984, Gene 27(2): 223-232), pKCR (O'Hare, K. et al., 1981, Proc Natl Acad Sci USA. 78(3): 1527-1531), pSG1 beta d2-4-(Miyaji, H. et al., 1990, Cytotechnology 4: 173-180) y semejantes.

Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación pCEP5, o plásmidos integrativos, tal como por ejemplo pUC, pcDNA, pBR, y semejantes.

Otros ejemplos de vector viral incluyen vectores adenovirales, retrovirales, de virus del herpes y AAV. Dichos virus recombinantes pueden producirse por técnicas conocidas en la técnica, tal como transfectando células de empaquetamiento o por transfección transitoria con plásmidos auxiliares o virus. Los ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes con replicación defectuosa pueden encontrarse por ejemplo en

WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.

En una realización, la invención se refiere a un polinucleótido que tiene al menos 80% de identidad con una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 39, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 y 54. En otra realización, la invención se refiere a un polinucleótido que tiene al menos 85% de identidad con una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 39, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 y 54. En otra realización, la invención se refiere a un polinucleótido que tiene al menos 90% de identidad con una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 39, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 y 54. En otra realización, la invención se refiere a un polinucleótido que tiene al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad con una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 39, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 y 54. En otra realización, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica una de las cadenas pesadas, o una de las cadenas ligeras, o tanto las cadenas pesadas como las cadenas ligeras de los anticuerpos como se describe en la presente memoria, es decir, mAb3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14. En otra realización, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de éste como se describe en la presente memoria.

Un objeto adicional descrito en la presente invención se refiere a una célula que se ha transfectado, infectado o transformado con un ácido nucleico y/o un vector como se describe en la presente memoria.

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere a una línea celular que produce uno de los anticuerpos como se describe en la presente memoria.

El término "transformación" significa la introducción de un gen "extraño" (es decir, extrínseco), secuencia de ADN o ARN en una célula huésped, de manera que la célula huésped expresará el gen o secuencia introducida para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducida. Una célula huésped que recibe y expresa ADN o ARN introducido ha sido "transformada".

Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria pueden usarse para producir un anticuerpo anti-CHIKV recombinante a partir de un sistema de expresión adecuado. El término "sistema de expresión" significa una célula huésped y vector

compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por el ADN extraño portado por el vector e introducido en la célula huésped.

Los sistemas de expresión comunes incluyen células huésped E. coli y vectores plasmídicos, células huésped de insecto y vectores Baculovirus, y células huésped y vectores de mamíferos. Otros ejemplos de células huésped incluyen, sin limitación, células procariotas (tal como bacterias) y células eucariotas (tal como células de levadura, células de mamíferos, células de insectos, células de plantas, etc.). Los ejemplos específicos incluyen E. coli, levaduras Kluyveromyces o Saccharomyces, líneas celulares de mamíferos (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, células HEK293 etc.) así como cultivos celulares de mamíferos primarios o establecidos (por ejemplo, producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos también incluyen célula SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), célula P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), célula CHO en la que es defectuoso un gen de dihidrofolato reductasa (referido de aquí en adelante como "gen DHFR") (Urlaub, G. et al.; 1980, Proc Natl Acad Sci USA. 77(7): 4216-4220), célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de rata (ATCC CRL1662, referida de aquí en adelante como "célula YB2/0"), y semejantes. La célula YB2/0 es interesante, ya que la actividad ADCC de anticuerpos quiméricos o humanizados se potencia cuando se expresa en esta célula.

En particular, para la expresión de anticuerpo humanizado, el vector de expresión puede ser bien de un tipo en el que un gen que codifica una cadena pesada de anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera de anticuerpo existan en vectores separados o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem). Al respecto de la facilidad de construcción de un vector de expresión de un anticuerpo humanizado, la facilidad de introducción en células animales, y el equilibrio entre los niveles de expresión de cadenas H y L de anticuerpo en células animales, se usan comúnmente los vectores de expresión de anticuerpo humanizado de tipo tándem (Shitara, K. et al., 1994, J Immunol Methods. ene.3: 167(1-2): 271-8). Los ejemplos de vectores de expresión de anticuerpo humanizado de tipo tándem incluyen pKANTEX93 (WO 97/10354), pEE18 y semejantes.

La presente invención también se refiere a un método para producir una célula huésped recombinante que expresa un anticuerpo según la invención, comprendiendo dicho método las etapas que consisten en: (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector como se describe anteriormente en

una célula huésped competente, (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula huésped recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o secretan dicho anticuerpo.

Dichas células huésped recombinantes pueden usarse para la producción de los anticuerpos anti-CHIKV descritos en la presente memoria.

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere a un método para producir un anticuerpo monoclonal según la invención, en el que dicho método comprende las etapas de (i) cultivar una línea celular como se ha descrito anteriormente; (ii) purificar el anticuerpo monoclonal producido; y opcionalmente (iii) formular dicho anticuerpo monoclonal en una composición farmacéutica.

Métodos para producir los anticuerpos anti-CHIKV

Los anticuerpos anti-CHIKV descritos en la invención pueden producirse por cualquier técnica conocida en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, bien sola o en combinación.

Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la técnica puede producir fácilmente dichos anticuerpos o cadenas de inmunoglobulina, por técnicas estándar para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse usando un método en fase sólida muy conocido, en particular usando un aparato de síntesis de péptidos disponible comercialmente (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, los anticuerpos y cadenas de inmunoglobulina pueden sintetizarse por técnicas de ADN recombinante como es muy conocido en la técnica. Por ejemplo, estos fragmentos pueden obtenerse como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican el (poli)péptido deseado en vectores de expresión e introducción de dichos vectores en huéspedes eucariotas o procariotas adecuados que expresarán el polipéptido deseado, a partir de las que pueden aislarse posteriormente usando técnicas muy conocidas.

En particular, la invención se refiere además a un método para producir un anticuerpo, método que comprende las etapas que consisten en: (i) cultivar una célula huésped transformada según la invención; (ii) expresar dicho anticuerpo o polipéptido; y (iii) recuperar el anticuerpo o polipéptido expresado.

En otras palabras, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo, que comprende las etapas de:

(i) Proporcionar una célula que expresa el anticuerpo anti-CHIKV;

(ii) Cultivar dicha célula;

(iii) Purificar dicho anticuerpo; y

(iv) Opcionalmente, formular dicho anticuerpo en una composición farmacéutica.

Los métodos para producir anticuerpos humanizados o quiméricos que implican técnicas convencionales de ADN recombinante y transfección génica son muy conocidos en la técnica (Véase Morrison, S.L. y Oi, V.T., 1984, Annu Rev Immunol 2: 239-256 y documentos de patente US 5.202.238; y US 5.204,.244).

En una realización particular, un anticuerpo quimérico de la presente invención puede producirse mediante la obtención de secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios VL y VH murinos como se ha descrito previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo quimérico insertándolos en un vector de expresión para células animales que tiene genes que codifican CH de anticuerpo humano y CL de anticuerpo humano, y expresando la secuencia codificadora por introducción del vector de expresión en una célula animal.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria se separan adecuadamente del medio de cultivo por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tal como, por ejemplo, cromatografía de afinidad en proteína A, cromatografía de hidroxiapatito cerámica, cromatografía de modo mixto, cromatografía de exclusión por tamaño etc.

El Fab puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con CHIKV con una proteasa, tal como papaína. También, el Fab puede producirse insertando secuencias de ADN que codifican ambas cadenas del Fab del anticuerpo en un vector para expresión procariota, o para expresión eucariota, e introduciendo el vector en células procariotas o eucariotas (según sea apropiado) para expresar el Fab.

El F(ab')2 puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con CHIKV con una proteasa, pepsina. También, el F(ab')2 puede producirse uniendo Fab' descrito más adelante mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

El Fab' puede obtenerse tratando F(ab')2 que reacciona específicamente con CHIKV con un agente reductor, tal como ditiotreitol. También, el Fab' puede producirse insertando secuencias de ADN que codifican cadenas de Fab' del anticuerpo en un vector para expresión procariota, o un vector para expresión eucariota, e introduciendo el vector en células procariotas o eucariotas (según sea apropiado) para llevar a cabo su expresión.

El scFv puede producirse tomando secuencias de las CDR o dominios VH y VL como se ha descrito previamente, construyendo un ADN que codifica un fragmento scFv, insertando el ADN en un vector de expresión procariota o eucariota, y después introduciendo el vector de expresión en células procariotas o eucariotas (según sea apropiado) para expresar el scFv. Para generar un fragmento scFv humanizado, puede usarse una tecnología muy conocida denominada injerto de CDR, que implica seleccionar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) según la invención, e injertarlas en un marco de fragmento scFv humano de estructura tridimensional conocida (véase, por ejemplo, W098/45322; WO 87/02671; US5.859.205; US5.585.089; US4.816.567; EP0173494).

El anticuerpo de cadena única o VHH dirigido frente a CHIKV puede obtenerse por ejemplo por un método que comprende las etapas de (a) inmunizar un mamífero que pertenece a Camelidae con CHIKV o un fragmento de éste, de manera que se incitan anticuerpos (y en particular anticuerpos de cadena pesada) frente a CHIKV; (b) obtener una muestra biológica de Camelidae así inmunizado, comprendiendo dicha muestra secuencias de anticuerpo de cadena pesada y/o secuencias VHH que están dirigidas frente a CHIKV; y (c) recuperar (por ejemplo, aislar) las secuencias de anticuerpo de cadena pesada y/o secuencias VHH que están dirigidas frente a CHIKV de dicha muestra biológica. El anticuerpo de cadena única o VHH adecuado también puede obtenerse cribando una biblioteca que comprende secuencias de anticuerpo de cadena pesada y/o secuencias VHH para secuencias de anticuerpo de cadena pesada y/o secuencias VHH que compiten para la unión con pE2-E1 de CHIKV como un ejemplo no limitativo.

Modificación de los anticuerpos anti-CHIKV de la invención

Un objeto adicional de la presente invención engloba variantes conservativas de función de los anticuerpos descritos en la presente memoria.

Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de actividad. Como la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína definen su actividad biológica funcional, pueden hacerse determinadas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteína, y por supuesto en su secuencia codificadora de ADN, mientras se obtiene no obstante una proteína con propiedades similares. Se contempla así que pueden hacerse varios cambios en las secuencias de anticuerpos o, secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos anticuerpos, sin pérdida apreciable de su actividad de unión.

Se sabe en la técnica que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropático similar y todavía resultar en una proteína con una actividad biológica similar, es decir, aún así, se obtiene una proteína con funcionalidad biológica equivalente. También es posible usar tecnologías bien establecidas, tal como estrategias de escaneo de alanina, para identificar, en un anticuerpo, todos los aminoácidos que pueden sustituirse sin pérdida significativa de unión al antígeno. Dichos residuos pueden calificarse como neutros, ya que no están implicados en la unión a antígeno o en el mantenimiento de la estructura del anticuerpo. Una o más de estas posiciones neutras pueden sustituirse por alanina o por otro aminoácido sin cambiar las características principales del anticuerpo.

Como se ha indicado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente por lo tanto en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga, tamaño, y semejantes. Las sustituciones ejemplares que tienen en cuenta varias de las características anteriores son muy conocidas para los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Otro tipo de modificación de aminoácidos de un anticuerpo puede ser útil para alterar el patrón de glicosilación original del anticuerpo, es decir, delecionando uno o más restos de carbohidratos encontrados en el anticuerpo, y/o añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. La presencia bien de las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina, y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, crea un sitio de glicosilación potencial. La adición o deleción de sitios de glicosilación en el anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contiene una o más de las secuencias de tripéptido descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos en N).

Otro tipo de modificación covalente implica acoplar químicamente o enzimáticamente glicósidos al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos ya que no requieren la producción del anticuerpo en una célula huésped que tiene capacidades de glicosilación para glicosilación unida por N u O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el o los azúcares pueden unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina, orhidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, o tirosina, (f)

el grupo amida de glutamina. Por ejemplo, dichos métodos se describen en WO87/05330.

La eliminación de cualesquiera restos de carbohidrato presentes en el anticuerpo puede conseguirse químicamente o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la escisión de la mayor parte o todos los azúcares excepto el azúcar conector (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras se deja el anticuerpo intacto. Las desglicosilación química se describe por Sojahr, H. et al. (1987, Arch Biochem Biophys. 259(1): 52-57) y por Edge, A.S. et al. (1981, Anal Biochem. 118(1): 131-137). La escisión enzimática de restos de carbohidrato en anticuerpos puede conseguirse por el uso de una variedad de endo- y exo-glicosidasas como se describe por Thotakura, NR. et al. (1987, Methods Enzymol 138: 350-359).

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende unir el anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilen glicol, polipropilen glicol, o polioxialquilenos, de la manera mostrada en las Patentes US Nos. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos anti-CHIKV descritos en la invención pueden combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

Así, la invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CHIKV de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también se refiere a un anticuerpo según la invención, para uso como un medicamento.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra inapropiada cuando se administra a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un material de relleno, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo no toxico, sólido, semi-sólido o líquido.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la ruta de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente de la afección que se va a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, peso, y sexo del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para una administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y semejantes.

En particular, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede ser inyectada. Éstos pueden ser en particular disoluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y semejantes o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que después de la adición, dependiendo del caso, de agua o disolución salina fisiológica esterilizada, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

Las dosis usadas para la administración pueden adaptarse como una función de varios parámetros, y en particular como una función del modo de administración usado, de la patología relevante, o alternativamente de la duración de tratamiento deseada.

Para preparar composiciones farmacéuticas, una cantidad efectiva del anticuerpo puede disolverse o dispersarse en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende anticuerpos o un fragmento de unión a antígeno de éstos que se unen a CHIKV como se describe en la presente memoria en una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado de que existe una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tal como bacterias y hongos.

El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol, y polietilen glicol líquido, y semejantes), mezclas adecuadas de éstos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el

uso de tensioactivos, agentes estabilizantes, crioprotectores o antioxidantes. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse por agentes antibacterianos y antifúngicos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio.

Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los demás ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diferentes ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación comunes incluyen técnicas de secado en vacío y liofilización que rinden un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una disolución esterilizada por filtración previamente de éste.

Después de la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tal como el tipo de disoluciones inyectables descrito anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármaco y semejantes.

Para administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido volverse en primer lugar isotónico con disolución salina o glucosa suficiente. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, el medio acuoso estéril que puede emplearse será conocido para los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 mL de disolución isotónica de NaCl y bien añadirse a 1.000 mL de fluido de hipodermoclisis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la afección del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier evento, la dosis apropiada para el sujeto individual.

El anticuerpo puede formularse en una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente 0,01 a 100 miligramos, por dosis o así.

Según determinadas realizaciones, pueden administrarse dosis únicas o múltiples de un anticuerpo anti-CHIKV descrito en la presente memoria a un sujeto durante un curso de tiempo definido.

Los métodos según este aspecto comprenden administrar secuencialmente a un sujeto dosis múltiples de un anticuerpo frente a CHIKV. Tal y como se usa en la presente memoria, "administrar secuencialmente" significa que cada dosis de anticuerpo frente a CHIKV se administra al sujeto en un punto de tiempo diferente, por ejemplo, en diferentes días separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente invención incluye métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una dosis única inicial de un anticuerpo frente a CHIKV, seguido de una o más dosis secundarias del anticuerpo frente a CHIKV y opcionalmente seguido de una o más dosis terciarias del anticuerpo frente a CHIKV.

Los términos "dosis inicial," "dosis secundarias," y "dosis terciarias," se refieren a la secuencia temporal de administración del anticuerpo frente a CHIKV. Así, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al comienzo del régimen de tratamiento (también referida como la "dosis de línea base"); las "dosis secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las "dosis terciarias" son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. La dosis inicial, secundarias, y terciarias pueden contener todas la misma cantidad de anticuerpo frente a CHIKV, pero generalmente pueden diferenciarse unas de otras en términos de frecuencia de administración. En determinadas realizaciones, sin embargo, la cantidad de anticuerpo frente a CHIKV contenida en la dosis inicial, secundarias y/o terciarias varían entre sí (por ejemplo, se ajustan hacia arriba o abajo según sea apropiado) durante el curso del tratamiento. En determinadas realizaciones, dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, ó 5) dosis se administran al comienzo del régimen de tratamiento como "dosis de carga" seguido de dosis posteriores que se administran de una manera menos frecuente (por ejemplo, "dosis de mantenimiento").

Métodos y usos terapéuticos

En otro aspecto, la invención proporciona un método para prevenir la infección con CHIKV en un paciente que lo necesita, o para tratar a un paciente que padece una infección con CHIKV, o para mejorar al menos un síntoma o complicación asociado con la infección con CHIKV, comprendiendo el método administrar uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de éstos como se describe en la presente memoria, o una composición farmacéutica que comprende uno o más de los anticuerpos anti-CHIKV descritos en la invención o

fragmentos de éstos, como se describe en la presente memoria, a un paciente que lo necesita, de manera que se previene la infección con CHIKV, o al menos un síntoma o complicación asociado con la infección, se mejora, alivia o reduce su gravedad y/o duración.

En algunas realizaciones, el método reduce una patología asociada con infección con CHIKV.

En algunas realizaciones, el método alivia los síntomas asociados con poliartritis/poliartralgia/artralgia asociada con CHIKV aguda, post-aguda o crónica, fiebre, sarpullido, mialgia y/o fatiga. En una realización, el método reduce el dolor en un sujeto asociado con la infección con CHIKV. En una realización, el anticuerpo se usa para tratar/reducir los síntomas asociados con infección con CHIKV que pueden reaccionar de manera cruzada y tratar un síntoma asociado con otras infecciones con alfavirus. En una realización, el anticuerpo se usa para tratar/reducir las fases aguda, post-aguda y crónica de poliartritis/poliartralgia asociadas con infección con CHIKV.

Los ejemplos de dichos otros alfavirus incluyen, pero no están limitados a, O'nyong Nyong (ONNV), Río Ross (RRV), Bosque de Barmah (BFV), Encefalitis Equina Occidental (WEEV), Bosque de Semliki (SFV), Sindbis (SINV), Encefalitis Equina Oriental (EEEV), Encefalitis Equina Venezolana (VEEV). Los síntomas tratados o reducidos pueden incluir, pero no están limitados a, dolor, fiebre y semejantes.

En otra realización, se proporciona un método para tratar a un sujeto infectado con Virus Chikungunya, o para reducir la probabilidad de infección de un sujeto en riesgo de contraer virus Chikungunya, que comprende administrar a dicho sujeto un anticuerpo que se une a CHIKV o un fragmento de unión a antígeno según la invención que comprende secuencias de CDR de anticuerpos listados en las Tablas 2 a 5, respectivamente.

En otra realización, se proporciona un método para tratar a un sujeto infectado con Virus Chikungunya, o para reducir la probabilidad de infección de un sujeto en riesgo de contraer virus Chikungunya, que comprende administrar a dicho sujeto un anticuerpo que se une a CHIKV listado en las Tablas 2 a 5, respectivamente. En otra realización, pueden combinarse uno, dos o varios anticuerpos entre los listados en las Tablas 2 a 5. En otra realización, el anticuerpo puede codificar un anticuerpo variante que comprende cadenas pesadas y ligeras con secuencias variables que tienen 70%, 80%, 90% ó 95% de identidad con las secuencias variables de uno de los anticuerpos listados en las Tablas 2 a 5. El fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo ScFv recombinante (fragmento

variable de cadena única), fragmento Fab, fragmento F(ab')2, o fragmento Fv. El anticuerpo puede ser una IgG, y/o un anticuerpo quimérico. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede administrarse antes de la infección, o después de la infección. La administración puede comprender la administración de anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o la administración genética con una secuencia de ARN o ADN o un vector que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Como se ha indicado anteriormente, los métodos de la presente invención comprenden administrar al sujeto que lo necesita para prevenir o tratar una infección/síntomas por CHIKV un anticuerpo como se describe en la presente memoria seleccionado del grupo que consiste en mAb3, mAb4, mAb5, mAb6, mAb7, mAb8, mAb9, mAb10, mAb11, mAb12, mAb13 y mAb14 como se lista en las tablas 2, 3, 4 y 5.

Como se ha indicado anteriormente, los métodos de la presente invención comprenden administrar al sujeto que lo necesita para prevenir o tratar una infección/síntomas por CHIKV un anticuerpo como se describe en la presente memoria seleccionado del grupo que consiste en mAb6, mAb7, mAb8, mAb9, mAb13 y mAb14. En otra realización, los métodos de la presente invención comprenden administrar al sujeto que lo necesita para prevenir o tratar una infección/síntomas por CHIKV un anticuerpo descrito en la invención seleccionado del grupo que consiste en mAb7 y mAb14.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria para uso como un medicamento. En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria para uso en el tratamiento de una infección con CHIKV. En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal para uso en el tratamiento de artralgia asociada con CHIKV. En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal para uso en el tratamiento de las fases aguda, post-aguda y crónica de poliartritis/poliartralgia asociada con infección con CHIKV. En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal para uso en el tratamiento de los síntomas asociados con poliartritis/poliartralgia/artralgia asociada con CHIKV aguda, post-aguda o crónica, fiebre, sarpullido, mialgia y/o fatiga. En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal para uso para reducir el dolor en un sujeto asociado con una infección con CHIKV. En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal para uso en la prevención de infección con CHIKV. En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en mAb3, mAb4, mAb5, mAb6, mAb7, mAb8, mAb9, mAb10, mAb11, mAb12, mAb13 y mAb14 como se listan en las

tablas 2, 3, 4 y 5 para uso en el tratamiento de la infección y los síntomas como se ha listado anteriormente. En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en mAb6, mAb7, mAb8, mAb9, mAb13 y mAb14 como se listan en las tablas 2, 3 y 5 para uso en el tratamiento de la infección y los síntomas como se ha listado anteriormente. En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal seleccionado de mAb7 y mAb14 como se listan en las tablas 2 y 5 para uso en el tratamiento de la infección y los síntomas como se ha listado anteriormente.

En otro aspecto, el anticuerpo monoclonal anti-CHIKV de la invención o el fragmento de unión a antígeno de éste puede usarse para prevenir o tratar una infección con CHIKV o los síntomas asociados en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "en combinación con" significa que los agentes terapéuticos adicionales se administran antes, después, o simultáneamente con la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CHIKV descrito en la invención. El término “en combinación con” también incluye la administración secuencial o concomitante del anticuerpo anti-CHIKV y un segundo agente terapéutico.

Por ejemplo, cuando se administra "antes" la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CHIKV, el agente terapéutico adicional puede administrarse aproximadamente 72 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 15 minutos o aproximadamente 10 minutos antes de la administración de la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CHIKV. Cuando se administra "después" la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CHIKV, el agente terapéutico adicional puede administrarse aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas o aproximadamente 72 horas después de la administración de la composición farmacéutica que comprende los anticuerpos anti-CHIKV. La administración "concurrente" o con la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CHIKV significa que el agente

terapéutico adicional se administra al sujeto en una forma de dosificación separada en menos de 5 minutos (antes, después, o al mismo tiempo) de la administración de la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CHIKV, o se administra al sujeto como una única formulación de dosificación combinada que comprende tanto el agente terapéutico adicional como el anticuerpo anti-CHIKV.

Las terapias de combinación pueden incluir un anticuerpo anti-CHIKV descrito en la presente memoria y cualquier agente terapéutico adicional que puede combinarse ventajosamente con el anticuerpo, o con un fragmento del anticuerpo biológicamente activo.

Por ejemplo, puede emplearse un segundo o tercer agente terapéutico para ayudar a reducir los síntomas asociados con una infección con CHIKV que incluyen, pero no están limitados a, poliartritis/poliartralgia/artralgia asociada con CHIKV aguda, post-aguda o crónica, fiebre, sarpullido, mialgia y/o fatiga. Por ejemplo, puede emplearse un segundo o tercer agente terapéutico para ayudar a reducir el dolor asociado con una infección con CHIKV.

Usos diagnósticos

En otro aspecto, el anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno descrito en la invención se usa para detectar la presencia o la ausencia de un antígeno CHIKV en una muestra. En una realización, el anticuerpo como se describe en la presente memoria se usa como un componente de un ensayo que comprende una etapa de poner en contacto una muestra con un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno como se describe en la presente memoria, una etapa de detección de la unión del anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno a un antígeno CHIKV, en el que la detección de la unión indica la presencia de antígeno CHIKV o la ausencia de la detección de la unión al antígeno CHIKV indica la ausencia del antígeno CHIKV.

En particular, el anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno como se describe en la presente memoria se usa tanto como un componente del agente terapéutico y como componente del ensayo de diagnóstico.

En una realización, el anticuerpo se pretende para un uso *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, CHIKV puede detectarse *in vitro* o *ex vivo* en una muestra biológica obtenida de un sujeto, usando un anticuerpo anti-CHIKV descrito en la presente memoria.

La invención se refiere además a un método in vitro o ex vivo para detectar la presencia de una infección con CHIKV en un sujeto, que comprende las etapas que consisten en:

i. poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con un anticuerpo anti-CHIKV, en particular en condiciones suficientes para que el anticuerpo forme complejos con dicha muestra biológica,
ii. medir el nivel de anticuerpo unido a dicha muestra biológica,
iii. detectar la presencia de una infección con CHIKV comparando el nivel medido de anticuerpo unido con un control, siendo indicativo un nivel incrementado de anticuerpo unido comparado con el control de una infección con CHIKV.

La invención también se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para determinar la susceptibilidad de un paciente infectado con CHIKV a un agente terapéutico dirigido a CHIKV, en particular a un anticuerpo anti-CHIKV o un fragmento de unión a antígeno de éste, como se describe en la presente memoria, método que comprende las etapas que consisten en:

i. poner en contacto una muestra biológica de un paciente infectado con CHIKV con un anticuerpo anti-CHIKV o un fragmento de unión a antígeno de éste, en particular en condiciones suficientes para que el anticuerpo forme complejos con dicha muestra biológica,
ii. medir el nivel de anticuerpo unido a dicha muestra biológica,
iii. comparar el nivel medido de anticuerpo unido a dicha muestra biológica con el nivel de anticuerpo unido a un control,

el que un nivel incrementado de anticuerpo unido a dicha muestra biológica comparado con el control es indicativo de que un paciente es susceptible a un agente terapéutico dirigido a CHIKV.

En los métodos anteriores, dicho control puede ser una muestra biológica normal, no infectada, del mismo tipo, o un valor de referencia que se ha determinado que es representativo del nivel de unión del anticuerpo en una muestra biológica normal del mismo tipo.

La invención se refiere además a un método *in vitro* o *ex vivo* para monitorizar la eficacia de una terapia contra la infección con CHIKV, que comprende las etapas que consisten en:

i. poner en contacto una muestra biológica de un sujeto que está siendo sometido a terapia contra infección con CHIKV, con un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de éste como se describe en la

presente memoria, en particular en condiciones suficientes para que el anticuerpo forme complejos con dicha muestra biológica,

ii. medir el nivel de anticuerpo unido a dicha muestra biológica,

iii. comparar el nivel medido de anticuerpo unido con el nivel de anticuerpo unido a un control;

el que un nivel disminuido de anticuerpo unido a dicha muestra biológica comparado con el control es indicativo de la eficacia de dicha terapia contra infección con CHIKV.

En dicho método, un nivel incrementado de anticuerpo unido a dicha muestra biológica comparado con el control es indicativo de la ineficacia de dicha terapia contra infección con CHIKV.

Dicho control es en particular una muestra biológica del mismo tipo que la muestra biológica sometida a análisis, pero que se ha obtenido del sujeto previamente en el tiempo, durante el curso de la terapia contra infección con CHIKV.

En una realización, los anticuerpos anti-CHIKV o fragmento de unión a antígeno de éstos como se describe en la presente memoria (por ejemplo, fragmentos de unión a E2) pueden marcarse con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radioactiva o cualesquiera otros marcadores que se conoce en la técnica que proporcionan (bien directamente o indirectamente) una señal.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "marcado", respecto al anticuerpo según la invención, se pretende que englobe marcaje directo del anticuerpo por acoplamiento (es decir, unión física) de una sustancia detectable, tal como un agente radioactivo o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o Indocianina (Cy5)) al polipéptido, así como marcaje indirecto del polipéptido por reactividad con una sustancia detectable.

Las “muestras” o “muestra biológica” que pueden usarse en los ensayos de diagnóstico de CHIKV según la presente invención incluyen cualquier muestra de tejido o fluido que se puede obtener de un paciente en condiciones normales o patológicas.

Las muestras biológicas incluyen, pero no están limitadas a, sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido tal como un espécimen de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de éstos, y la progenie de éstos. Por lo tanto, las muestras biológicas engloban muestras clínicas, muestras de células en cultivo, sobrenadantes de células, lisados celulares, suero, plasma, fluido biológico, y tejido.

Kits

La invención también proporciona kits que comprenden al menos un anticuerpo anti-CHIKV o fragmento de unión a antígeno. Los kits que contienen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno encuentran uso en la detección de CHIKV, o en ensayos terapéuticos o de diagnóstico. Los kits pueden contener un polipéptido o anticuerpo acoplado a un soporte sólido, por ejemplo, una placa de cultivo tisular o lechos (por ejemplo, lechos de sefarosa). Pueden proporcionarse kits que contienen anticuerpos para la detección y cuantificación del CHIKV in vitro, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Dicho anticuerpo útil para la detección puede proporcionarse con un marcaje tal como un marcaje fluorescente o radiactivo.

En una realización, la invención se refiere a un kit que comprende al menos un anticuerpo como se describe en la presente memoria y opcionalmente material de envasado y opcionalmente una etiqueta o prospecto contenido en dicho material de envasado indicando que dicho anticuerpo como se describe en la presente memoria es efectivo para prevenir/tratar infección con CHIKV o los síntomas relacionados con infección con CHIKV.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de VH del anticuerpo “mAb1”.

SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de VL del anticuerpo “mAb1”.

SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de VH del anticuerpo “mAb2”.

SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de VL del anticuerpo “mAb2”.

SEQ ID NO: 5-7 muestran las secuencias de CDR1H, CDR2H, CDR3H del anticuerpo “mAb1”.

SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de CDR1L del anticuerpo “mAb1”.

SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de la diana pE2-E1 recombinante “E2 LR2006 de CHIKV etiquetada con His”.

SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de CDR3L del anticuerpo “mAb1”.

SEQ ID NO: 11-13 muestran las secuencias de CDR1H, CDR2H, CDR3H del anticuerpo “mAb2”.

SEQ ID NO: 14 muestra las secuencias de CDR1L del anticuerpo “mAb2”.

SEQ ID NO: 15 muestra la secuencia de la diana pE2-E1 recombinante “E2 SL15649 de CHIKV etiquetada con His“.

SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de CDR3L del anticuerpo “mAb2”.

SEQ ID NO: 17 muestra la secuencia de la región Fc de IgG1 sin sustituciones descrita en la invención y mostrada en la figura 1.

SEQ ID NO: 18 muestra la secuencia de ácido nucleico de la región Fc de IgG1.

SEQ ID NO: 19 muestra la secuencia de HC del anticuerpo “mAb1”.

SEQ ID NO: 20 muestra la secuencia de LC del anticuerpo “mAb1”.

SEQ ID NO: 21 muestra la secuencia de ácido nucleico de HC del anticuerpo “mAb1”.

SEQ ID NO: 22 muestra la secuencia de ácido nucleico de LC del anticuerpo “mAb1”.

SEQ ID NO: 23 muestra la secuencia de HC del anticuerpo “mAb3”.

SEQ ID NO: 24 muestra la secuencia de ácido nucleico de HC del anticuerpo “mAb3”.

SEQ ID NO: 25 muestra la secuencia de HC del anticuerpo “mAb4”.

SEQ ID NO: 26 muestra la secuencia de ácido nucleico de HC del anticuerpo “mAb4”.

SEQ ID NO: 27 muestra la secuencia de HC del anticuerpo “mAb5”.

SEQ ID NO: 28 muestra la secuencia de ácido nucleico de HC del anticuerpo “mAb5”.

SEQ ID NO: 29 muestra la secuencia de HC del anticuerpo “mAb6”.

SEQ ID NO: 30 muestra la secuencia de ácido nucleico de HC del anticuerpo “mAb6”.

SEQ ID NO: 31 muestra la secuencia de HC del anticuerpo “mAb7”.

SEQ ID NO: 32 muestra la secuencia de ácido nucleico de HC del anticuerpo “mAb7”.

SEQ ID NO: 33 muestra la secuencia consenso de CDRH3 del anticuerpo “mAb2”.

SEQ ID NO: 34 muestra la secuencia de CDRH3 del anticuerpo “mAb10”.

SEQ ID NO: 35 muestra la secuencia de CDRH3 del anticuerpo “mAb11”.

SEQ ID NO: 36 muestra la secuencia de CDRH3 del anticuerpo “mAb12”.

SEQ ID NO: 37 muestra la secuencia de HC del anticuerpo “mAb2”.

SEQ ID NO: 38 muestra la secuencia de LC del anticuerpo “mAb2”.

SEQ ID NO: 39 muestra la secuencia de ácido nucleico de HC del anticuerpo “mAb2”.

SEQ ID NO: 40 muestra la secuencia de ácido nucleico de LC del anticuerpo “mAb2”.

SEQ ID NO: 41 muestra la secuencia de HC del anticuerpo “mAb8”.

SEQ ID NO: 42 muestra la secuencia de ácido nucleico de HC del anticuerpo “mAb8”.

SEQ ID NO: 43 muestra la secuencia de HC del anticuerpo “mAb9”.

SEQ ID NO: 44 muestra la secuencia de ácido nucleico de HC del anticuerpo “mAb9”.

SEQ ID NO: 45 muestra la secuencia de HC del anticuerpo “mAb10”.

SEQ ID NO: 46 muestra la secuencia de ácido nucleico de HC del anticuerpo "mAb10".

SEQ ID NO: 47 muestra la secuencia de HC del anticuerpo "mAb11".

SEQ ID NO: 48 muestra la secuencia de ácido nucleico de HC del anticuerpo "mAb11".

SEQ ID NO: 49 muestra la secuencia de HC del anticuerpo "mAb12".

SEQ ID NO: 50 muestra la secuencia de ácido nucleico de HC del anticuerpo "mAb12".

SEQ ID NO: 51 muestra la secuencia de HC del anticuerpo "mAb13".

SEQ ID NO: 52 muestra la secuencia de ácido nucleico de HC del anticuerpo "mAb13".

SEQ ID NO: 53 muestra la secuencia de HC del anticuerpo "mAb14".

SEQ ID NO: 54 muestra la secuencia de ácido nucleico de HC del anticuerpo "mAb14".

SEQ ID NO: 55 muestra la secuencia de una región constante de IgG1 como se muestra en la figura 1.

SEQ ID NO: 56 muestra la secuencia de VH del anticuerpo "mAb10".

SEQ ID NO: 57 muestra la secuencia de VH del anticuerpo "mAb11".

SEQ ID NO: 58 muestra la secuencia de VH del anticuerpo "mAb12".

SEQ ID NO: 59 muestra la secuencia de una región Fc de IgG1 con una alanina en la posición 434 según la invención como se muestra en la figura 2.

SEQ ID NO: 60 muestra la secuencia de una región Fc de IgG1 con una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, según la invención como se muestra en la figura 2.

SEQ ID NO: 61 muestra la secuencia de una región Fc de IgG1 con una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, según la invención como se muestra en la figura 2.

SEQ ID NO: 62 muestra la secuencia de una región Fc de IgG1 con una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente, según la invención como se muestra en la figura 2.

SEQ ID NO: 63 muestra la secuencia de una región Fc de IgG1 con una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, según la invención como se muestra en la figura 2.

EJEMPLOS

Materiales y Métodos

Análisis y preparación por ingeniería de anticuerpos monoclonales:

Las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-CHIKV se analizaron usando Antiboby Inspector (herramienta desarrollada in situ para el análisis de la secuencia de los anticuerpos) acoplado con herramientas de análisis de modelo/estructura 3D (Biovia Discovery Studio Suite) para cribar problemas y trabas potenciales para el desarrollo. El análisis de las trabas se centró en, motivo no deseado de exposición al disolvente como oxidación, desamidación, isomerización, escisión ácida, glicosilación, y Cys libres adicionales. Todas las trabas de exposición a disolvente se priorizaron sobre la base de su localización (CDR, marcos de dominio variable, dominios constantes). Se sugirieron mutaciones para minimizar las trabas encontradas en las secuencias.

Generación de anticuerpos optimizados:

Se sintetizaron fragmentos génicos optimizados por codones y se clonaron en un vector de expresión de mamíferos. La transfección se llevó a cabo según el protocolo del fabricante usando el sistema de expresión Expi293F (Thermo Fisher Scientific). Se purificaron las muestras de medio condicionado recogidas mediante columna de Proteína A y a las fracciones eluidas se les cambió el tampón a Gibco PBS, pH 7,4.

Análisis de Unión: unión a antígeno, unión a FcRn humano y de ratón, unión a FcγRIIIa:

La unión a antígeno E2 de CHIKV recombinante se midió por resonancia de plasmón superficial usando el instrumento Biacore T200. Se inmovilizó un chip sensor CM5 de la serie S con anticuerpo anti-tetra His (Qiagen) a niveles de saturación mediante el procedimiento estándar de acoplamiento de amina proporcionado por Biacore. Los antígenos E2 de CHIKV recombinantes, es decir, construcciones de proteína recombinante E2 LR2006 de CHIKV etiquetado con His (SEQ ID NO: 9) y E2 SL15649 de CHIKV etiquetado con His (SEQ ID NO: 15) se basaron en Voss et al., 2010 (Voss JE et al 2010, Nature 468:709–712), se expresaron transitoriamente por y se purificaron de células HEK293 (Pal et al, 2013, PLoS Pathog9, e1003312; Smith et al, 2015, Cell Host & Microbe 18:86-95). Básicamente, estas construcciones se diseñaron como péptido señal-E3_E2-(G4S)4-E1-His8, pero en la forma madura, el péptido señal y E3 se eliminan por escisión. Los antígenos recombinantes E2 LR2006 de CHIKV etiquetado con His y E2 SL15649 de CHIKV etiquetado con His se diluyeron en tampón de operación HBS-

EP+ y se inyectaron durante 30 seg con el fin de conseguir un nivel de captura entre 10 y 30 RU. Los anticuerpos de ensayo se diluyeron de forma seriada 3 veces de 30 nM a 1,1 nM. Los agentes de unión de baja afinidad se diluyeron de forma seriada de 900 nM. Cada anticuerpo se inyectó en los antígenos capturados y superficies control durante 3 min en duplicado a una velocidad de flujo de 65 µL/min con 5 ó 15 min de disociación. Las superficies se regeneraron con glicina pH 1,5. Las constantes cinéticas se calcularon usando un modelo de unión 1:1 con el Software de Evaluación Biacore T200.

Para medir la unión a FcRn, se inmovilizó directamente un chip sensor CM5 serie S con el FcRn humano recombinante o FcRn de ratón usando química de amina, consiguiendo una densidad superficial de 1.700RU y 800RU, respectivamente. Los anticuerpos de ensayo se diluyeron a 200 y 50 nM en 50 mM fosfato de sodio, 150 mM NaCl, 0,05% tensioactivo P20, pH 6,0 o pH 7,4. Las muestras diluidas se inyectaron durante 3 min, seguido de 5 min de disociación en tampón a 10µL/min, en duplicado. Las superficies se regeneraron con tampón borato pH 8,5.

La unión a FcγRIIIa se midió con el instrumento Biacore 3000. Se inmovilizó un chip CM5 con anticuerpo anti-HPC4 a niveles de saturación mediante acoplamiento de amina. Se compararon dos polimorfismos de FcγRIIIa humano recombinante en el análisis (Val158 y Phe158). Se diluyeron FcγRIIIa-V158 y FcγRIII-F158 humano recombinante etiquetado con HPC4 en tampón HBS-P+ que contenía 2 mM CaCl2 y se inyectó en Fc2 o Fc4, respectivamente, durante 30 seg a 10 µL/min para conseguir un nivel de captura de 10-40 RU. Las muestras se diluyeron a 900, 300, y 100 nM y se inyectaron durante 2 min, seguido de 3 min de disociación en tampón a 30 µL/min, en duplicado. Las superficies se regeneraron durante 3 min con 10 mM EDTA en tampón HBS-EP+ a 20 µL/min.

Resultados

Ejemplo 1: Unión a antígeno de mAb2 con sustituciones en CDRH3

Los resultados se presentan en la figura 3. Los efectos de mutaciones en CDRH3 de mAb2, introducidas para eliminar restos de desamidación y oxidación potenciales, se midieron en la unión al antígeno pE2-E1 de CHIKV derivado de cepas de CHIKV LR2006. La unión se midió para, respectivamente:

-mAb2 y sus variantes derivadas mAb10, mAb11 y mAb12 que comprenden respectivamente una isoleucina en la posición 8 de su CDRH3, una glutamina en la posición 12 de su CDRH3 y una alanina en la posición 13 de su CDRH3, así como

para una variante que comprende una alanina en la posición 8 de su CDRH3 y variantes que comprenden diferentes combinaciones de dos sustituciones entre las listadas anteriormente.

Entre los siete mutantes creados para eliminar restos de desamidación y oxidación potenciales, sólo mAb11, que comprende una glutamina en la posición 12 de su CDRH3 (mAb2 N108Q) retuvo una afinidad de unión a la diana equivalente al mAb parental. Debe indicarse que mAb10 que comprende una isoleucina en la posición 8 de su CDRH3 (mAb2 M104I) y mAb12, que comprende una alanina en la posición 13 de su CDRH3 (mAb2 G109A), presentaron perfiles intermedios; los dobles mutantes perdieron sus afinidades de unión a la diana así como una variante que comprende una alanina en la posición 8 de su CDRH3 (mAb2 M104A).

Ejemplo 2: Unión a FcRn

Los resultados se presentan en la figura 4. La unión a FcRn humano (figuras 4A y 4C) y de ratón (figuras 4B y 4D) se midieron a pH 6,0. para:

-mAb1 y mAb3, mAb4, mAb5, mAb6 y mAb7 que comprenden respectivamente en sus regiones Fc una alanina en la posición 434, una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, y una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256.

-mAb2 y mAb8, mAb9, mAb11, mAb13 y mAb14 que comprenden respectivamente en sus regiones Fc una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, una glutamina en la posición 12 de su CDRH3, una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256 así como una glutamina en la posición 12 de su CDRH3, una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434 así como una glutamina en la posición 12 de su CDRH3.

Todos los mutantes mostraron un incremento en la afinidad de unión a FcRn lo que se espera que resulte en una vida media incrementada, y por lo tanto un impacto positivo en su utilidad en una terapia anti-CHIKV. Los mutantes que comprenden una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, y una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256 respectivamente mostraron la unión más fuerte cuando se comparan con los demás mutantes.

Ejemplo 3: Efectos de las sustituciones en la región Fc en la unión de mAb1 y mAb2 a la diana

Los resultados se presentan en la figura 5. El efecto de sustituciones en la región Fc se midió para mAb1 y mAb2 en la unión al antígeno pE2-E1 de CHIKV derivado de cepas de CHIKV LR2006 (figura 5A) y SL15649 (figura 5B), respectivamente. La unión se midió para respectivamente:

-mAb1 y mAb3, mAb4, mAb5, mAb6 y mAb7 que comprenden respectivamente una alanina en la posición 434, una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, y una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256.

-mAb2 y mAb8, mAb9, mAb11, mAb13 y mAb14 que comprenden respectivamente una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, una glutamina en la posición 12 de su CDRH3, una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256 así como una glutamina en la posición 12 de su CDRH3, una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434 así como una glutamina en la posición 12 de su CDRH3.

Ninguna de las sustituciones en la región Fc que aumentó la unión a FcRn de mAb1 y mAb2 afectó la unión al antígeno pE2-E1 diana de CHIKV.

Ejemplo 4: Unión a FcγRIIIa

Los resultados se presentan en la figura 6. Los efectos de sustituciones en la región Fc de mAb1 y mAb2 se midieron en la unión a FcγRIIIa respectivamente. FCγRIIa (CD16a) se expresa por NK y macrófagos y es capaz de inducir la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y liberación de citoquinas por macrófagos.

Los resultados de unión se muestran en el receptor de alta afinidad FcγRIIIa humano (FcγRIIIaV158) para mAb1 (figura 6A) y para mAb2 (figura 6B) así como en el receptor de baja afinidad FcγRIIIa humano (FcγRIIIaF158), respectivamente para mAb1 (figura 6C) y para mAb2 (figura 6D).

La unión se midió para, respectivamente:

-mAb1 y mAb3, mAb4, mAb5, mAb6 y mAb7 que comprenden respectivamente una alanina en la posición 434, una alanina en las posiciones 307,

380 y 434, respectivamente, una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, y una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256.

-mAb2 y mAb8, mAb9, mAb11, mAb13 y mAb14 que comprenden respectivamente una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, una glutamina en la posición 12 de su CDRH3, una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256 así como una glutamina en la posición 12 de su CDRH3, una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434 así como una glutamina en la posición 12 de su CDRH3.

Entre las sustituciones en la región Fc de mAb1 y mAb2 que aumentaban la unión a FcRn, una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256 dieron lugar a una afinidad de unión a FcγRIIIa reducida que podría tener un impacto negativo en las funciones efectoras mediadas por células y terapia anti-CHIKV comparado con mAb1 o mAb2 con las regiones Fc no sustituidas. Otras mutaciones tales como una alanina en la posición 434, una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, retuvieron la afinidad de unión frente a FcγRIIIa.

MAb1 y mAb2 que comprenden una alanina en la posición 434, una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, o una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, pero no una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, retuvieron la unión a FcγRIIIa que está ligada a funciones efectoras.

Por lo tanto, mAb1 o mAb2 que comprende una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434 presentan la mejor unión a FcRn mientras retienen la unión a FcγRIIIa que está ligada a funciones efectoras.

Tabla 6

Veces de mejora de K_D de la unión a FcRn de mAb1 sin o con una región Fc que porta una o varias sustituciones.

	Ligando	K_D (nM)	Incremento de Afinidad (veces)	Ligando	K_D (nM)	Incremento de Afinidad (veces)	Ligando	K_D (nM)	Ligando	K_D (nM)
mAb1	FcRn humano	348	**1,0**	FcRn de ratón	20	**1,0**	Antígeno (E2)	0,13	hFcγRIII	179
mAb7		15	**23,8**		5,9	**3,4**		0,17		169
mAb6		21	**16,3**		1,9	**10,4**				381
mAb5		27	**13,0**		5,9	**3,3**				236
mAb4		31	**11,3**		8,4	**2,3**				180
mAb3		45	**7,7**		9,3	**2,1**				199

Tabla 7

Veces de mejora de K_D de la unión a FcRn de mAb2 y mAb2 que porta una sustitución en CDRH3 sin o con una región Fc que porta una o varias sustituciones.

	Ligando	K_D (nM)	Incremento de Afinidad (veces)	Ligando	K_D (nM)	Incremento de Afinidad (veces)	Ligando	K_D (nM)	Ligando	K_D (nM)
mAb2	FcRn humano	328	1,0	FcRn de ratón	22	1,0	Antígeno (E2)	0,13	hFcγRIII	262
mAb9		20	16,6		7,5	3,0		0,25		207
mAb8		23	14,1		1,2	19,5				499
mAb11		301	1,1		20	1,1		0,22		289
mAb14		18	18,2		6,2	3,6		0,12		187
mAb13		24	13,7		1,6	13,7				387
mAb12								0,50		
mAb10								0,94		

Ejemplo 5: Actividad de neutralización de los mAb usando Ensayo de Reducción de Placa Estándar

Se ensayaron mAb1, mAb7 y mAb CTR (anticuerpo control anti-lisozima rhlgG1) *in vitro* frente a 3 cepas prototípicas diferentes de CHIKV (cepas Caribeña, La Reunión (LR) y 37997) que representan los tres linajes de CHIKV (linajes asiático, este-centro y sur de África (ESCA) y África occidental).

Una cantidad fija de virus se mezcló con un volumen igual de anticuerpo diluido en PBS o con diluyente. La mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas. Después, la mezcla se añadió a monocapas confluentes de células vero en placas de 6 pocillos. Después de una incubación de 2 horas, las placas se cubrieron con CMC en DMEM-5%. Las placas se fijaron a las 48 horas después de la inyección con formalina y después se tiñeron con tinción de azul de metileno. Las placas se contaron y los datos se analizaron en Prism-Graph Pad para la determinación de CE_{50}.

Los resultados se presentan en la tabla 8 siguiente, así como en las figuras 7A a 7C. MAb1 y mAb7 inhibieron los virus de los tres genotipos con actividad ultrapotente (valores de CE_{50} < 10 ng/mL para mAb1 y < 1ng/mL para mAb7) en los linajes de CHIKV asiático, este-centro y sur de África (ESCA) y África occidental como se muestra en las figuras 7A, 7B y 7C, respectivamente. El anticuerpo anti-lisozima (mAb CTR) se usó como control negativo no específico.

Tabla 8

Genotipo de CHIKV	Neutralización in vitro - CE_{50} (ng/ml)		
	mAb CTR	mAb1	mAb7
Cepa caribeña Linaje asiático	NA	7,6	0,6
Cepa LR Linaje ECSA	NA	3,9	0,3
Cepa 37997 Linaje África occidental	NA	4,8	0,2

Ejemplo 6: Estudios de protección in vivo en ratones.

Se llevaron a cabo estudios *in vivo* con el modelo de ratón DBA1/J de acuerdo estrictamente con las recomendaciones en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal en el National

Institute of Allergy and Infection Diseases (NIAID). Los experimentos de infección se realizaron en instalaciones A-BSL3 con la aprobación del Comité de Estudios Animales del NIAID.

Se inocularon ratones DBA/1J de 7-8 semanas de edad con 0,05 ml subcutáneamente en la almohadilla plantar trasera derecha hacia el tobillo, con CHIKV-LR2006. Para los estudios terapéuticos, se administró una única dosis de mAb IgG individuales anti-CHIKV humanos recombinantes a las dosis especificadas por la ruta intra-peritoneal a los 3 días después de la infección con CHIKV usando inoculación subcutánea en la almohadilla plantar con $10^{5,5}$ $CCID_{50}$/0,1 ml de CHIKV-LR2006. La titulación de virus en el sitio de la inyección se monitorizó a los 5 días después de la infección. Para los estudios de profilaxis, se administraron mAb IgG anti-CHIKV humanos recombinantes por inyección intraperitoneal bien a los 2, 7 ó 14 días antes de la infección subcutánea en la almohadilla plantar con $10^{5,5}$ $CCID_{50}$/0,1 ml de CHIKV-LR2006. La titulación de virus en el sitio de la inyección se monitorizó a los 3 días después de la infección.

Profilaxis con mAb in vivo.

Los ratones se pre-trataron con una dosis única de 250 µg (~ 12,5 mg/kg) de mAb hIgG anti-CHIKV recombinantes (mAb1, mAb7) o mAb control de isotipo anti-lisozima (mAb_{CTR}) bien a los 2, 7 ó 14 días antes de la inyección subcutánea con CHIKV-LR2006. Todos los ratones tratados con el mAb de control de isotipo presentaron una alta titulación de virus en la pata trasera derecha ($CCID_{50}$/g de tejido) a los 3 días después de la inoculación (figura 8). El pretratamiento tanto con mAb7 como con mAb1, al tiempo diferente antes de la infección (-2 a -14 días), protegió completamente a los ratones DBA1/J de la carga de virus en el sitio de inyección ya que su nivel de virus respectivo en la pata trasera derecha fue comparable al de ratones no infectados del grupo SHAM-PBS.

Terapia de mAb posterior a la exposición in vivo.

Se inocularon ratones DBA/1J de 7-8 semanas de edad con 0,05 ml subcutáneamente en la almohadilla plantar trasera derecha hacia el tobillo, con 105,5 $CCID_{50}$/0,1 ml de CHIKV-LR. Se administró una única dosis de 250µg de mAb individual (mAb1, mAb2, mAb7, mAb11 o mAb14) por la ruta intra-peritoneal a los 3 días después de la infección con CHIKV. La titulación de virus en el sitio de la inyección se monitorizó a los 5 días después de la infección. Todos los mAb ensayados presentaron la misma potencia para neutralizar la carga viral en tejido en el modelo de ratón de infección con CHIKV (figura 9A). MAb7 y mAb14 se

caracterizaron adicionalmente en un estudio de titulación de dosis. Para este propósito, se inocularon ratones DBA1/J con 0,05 ml subcutáneamente en la almohadilla plantar trasera derecha hacia el tobillo, con 105,5 $CCID_{50}$/0,1 ml de CHIKV-LR2006. Se proporcionó mAb7 o mAb14 a 3 dpi por una única inyección intra-peritoneal a las dosis de 10, 25, 50, 100 y 250µg (~ 0,5, 1, 2,5, 5, 12,5 mg/kg). El resultado primario fue la titulación de virus en la extremidad trasera en el sitio del puso con el virus en 5 dpi. El mAb7 redujo la titulación viral articular de una manera dependiente de la dosis en ratones DBA/1J infectados con CHIKV (figura 9B). Se observa una reducción significativa de la dosis 50 a 250µg con el efecto máximo conseguido a la dosis más alta. El mAb14 redujo significativamente la titulación viral independientemente de la dosis, pero no se observó un efecto de la dosis en las condiciones ensayadas.

Ejemplo 7: Farmacocinética de mAb en primate no humano.

Se administraron mAb1 y mAb7 por bolo intravenoso (IV), 2,5 mg/kg a Monos Cynomolgus macho (Macaca Fascicularis). Los animales que recibieron mab1 y mab7 fueron diferentes (dos estudios separados). Se ensayaron muestras de plasma con un método bioanalítico Elisa exploratorio usando anticuerpos frente a lgG1 humana y que de esta manera reconocían mAb1 y mAb7 desarrollados por inmunización de conejos. La comparación de la farmacocinética mostró un incremento de la vida media terminal (es decir, $t_{1/2}$, el periodo de tiempo requerido para que se reduzca la concentración o cantidad de fármaco en el cuerpo a exactamente la mitad) con mAb7 con 22,7 y 25,5 días para mAb1 y mAb7 respectivamente (figura 10).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a CHIKV y que comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL), en el que:
    i. dichas CDRH tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, y dichas CDRL tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, o
    ii. dichas CDRH tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, y dichas CDRL tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, o
    iii. dichas CDRH y CDRLH tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de las secuencias de i. o ii. por una o dos sustituciones de aminoácidos;

    y en el que dicho anticuerpo comprende además una región Fc que comprende al menos un residuo seleccionado del grupo que consiste en:
    iv. una alanina en la posición 434, o
    v. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o
    vi. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, o
    vii. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, o
    viii. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente,

    en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

2. El anticuerpo monoclonal aislado según la reivindicación 1 en el que dicho anticuerpo tiene una o más de las propiedades siguientes:
    i. se une a una diana pE2-E1 de CHIKV con una constante de disociación de unión en equilibrio (K_D) de menos de aproximadamente 10 nM;
    ii. se une a FcRn humano con una K_D de menos de aproximadamente 200 nM;

iii. se une a FcγRIII humano con una K_D de menos de aproximadamente 600 nM.

3. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 o reivindicación 2 en el que dicho anticuerpo comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y en el que dicho anticuerpo comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, GNT y 10, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos.

4. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 o reivindicación 2 en el que dicho anticuerpo comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 13, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos, y dicho anticuerpo comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL) que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, respectivamente, o secuencias de aminoácidos que se diferencian de esas secuencias por una o dos sustituciones de aminoácidos.

5. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo comprende:
   - Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 5;
   - Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 6;
   - Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7;
   - Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 8;
   - Una CDRL2 que consiste en la secuencia GNT;
   - Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 10.

6. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4, en el que dicho anticuerpo comprende:
   - Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11;
   - Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12;
   - Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 13;

- Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14;
- Una CDRL2 que consiste en GTS;
- Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16.

7. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha región Fc comprende residuos seleccionados del grupo que consiste en:
    i. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, o
    ii. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente,

   en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

8. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha región Fc comprende una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434 en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

9. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha región Fc comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62 y 63.

10. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 5, 7 a 9, en el que la región variable de su cadena pesada comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 1.

11. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 5, 7 a 10, en el que la región variable de su cadena ligera comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 2.

12. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 5, 7 a 11, en el que su cadena pesada comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 31.

13. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 5, 7 a 12, en el que su cadena ligera comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con secuencia ID NO: 20.

14. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a CHIKV y que comprende o consiste en una cadena pesada de SEQ ID NO: 31 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 20.

15. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a CHIKV y que comprende tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Pesada (CDRH) y tres Regiones Determinantes de la Complementariedad de Cadena Ligera (CDRL), en el que:
    i. dichas CDRH tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12 y 33, y dichas CDRL tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, GTS y 16, o
    ii. dichas CDRH y CDRLH tienen secuencias de aminoácidos que se diferencian de las secuencias de i. por una o dos sustituciones de aminoácidos;

y en el que:

    iii. el aminoácido en la posición 8 de SEQ ID NO: 33 no es M, y/o
    iv. el aminoácido en la posición 12 de SEQ ID NO: 33 no es N; y/o
    v. el aminoácido en la posición 13 de SEQ ID NO: 33 no es G.

16. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 15, en el que dicho anticuerpo tiene una o más de las propiedades siguientes:
    i. se une a una diana pE2-E1 de CHIKV con una constante de disociación de unión en equilibrio (K_D) de menos de aproximadamente 10 nM;
    ii. se une a FcRn humano con una K_D de menos de aproximadamente 200 nM;
    iii. se une a FcγRIII humano con una K_D de menos de aproximadamente 600 nM.

17. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 15 o reivindicación 16, en el que dicho anticuerpo comprende:
    - Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11;
    - Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12;
    - Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 34;
    - Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14;
    - Una CDRL2 que consiste en GTS;
    - Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16.

18. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que dicho anticuerpo comprende:
    - Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11;
    - Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12;
    - Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 35;
    - Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14;
    - Una CDRL2 que consiste en GTS;
    - Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16.

19. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que dicho anticuerpo comprende:
    - Una CDRH1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11;
    - Una CDRH2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12;
    - Una CDRH3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 36;
    - Una CDRL1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14;
    - Una CDRL2 que consiste en GTS;
    - Una CDRL3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16.

20. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el que dicho anticuerpo comprende además una región Fc que comprende residuos seleccionados del grupo que consiste en:
    i. una alanina en la posición 434, o
    ii. una alanina en las posiciones 307, 380 y 434, respectivamente, o
    iii. una glutamina en la posición 250 y una leucina en la posición 428, respectivamente, o
    iv. una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434, respectivamente, o
    v. una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256, respectivamente,

    en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

21. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 20, en el que dicho anticuerpo tiene una región Fc que comprende una leucina en la posición 428 y una serina en la posición 434 en el que dichas posiciones de aminoácidos se proporcionan según el índice EU.

22. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, en el que dicho anticuerpo tiene una región Fc que comprende o que consiste en una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62 y 63.

23. El anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, para uso como un medicamento.

24. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 23, para uso en el tratamiento de artralgia asociada a CHIKV.

25. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 23, para uso en la prevención de infección con CHIKV.

26. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 y al menos un excipiente.

27. Una línea celular que produce el anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.

28. Un método para producir el anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que dicho método comprende las etapas de:
    i. cultivar una línea celular que produce dicho anticuerpo monoclonal;
    ii. purificar el anticuerpo monoclonal producido; y opcionalmente
    iii. formular dicho anticuerpo monoclonal en una composición farmacéutica.

29. Un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.

30. El polinucleótido de la reivindicación 29 que codifica un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad con una de las secuencias SEQ ID NO: 18, 21, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 39, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 y 54.

31. Un kit que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 y opcionalmente material de envasado.

RESUMEN

La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos que se unen específicamente a y neutralizan el virus Chikungunya (CHIKV) y que se preparan por ingeniería para desarrollar terapéuticos con el fin de tratar la enfermedad CHIKV o prevenir la infección con CHIKV. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de la invención y al uso de los anticuerpos para la prevención y tratamiento de la enfermedad CHIKV.

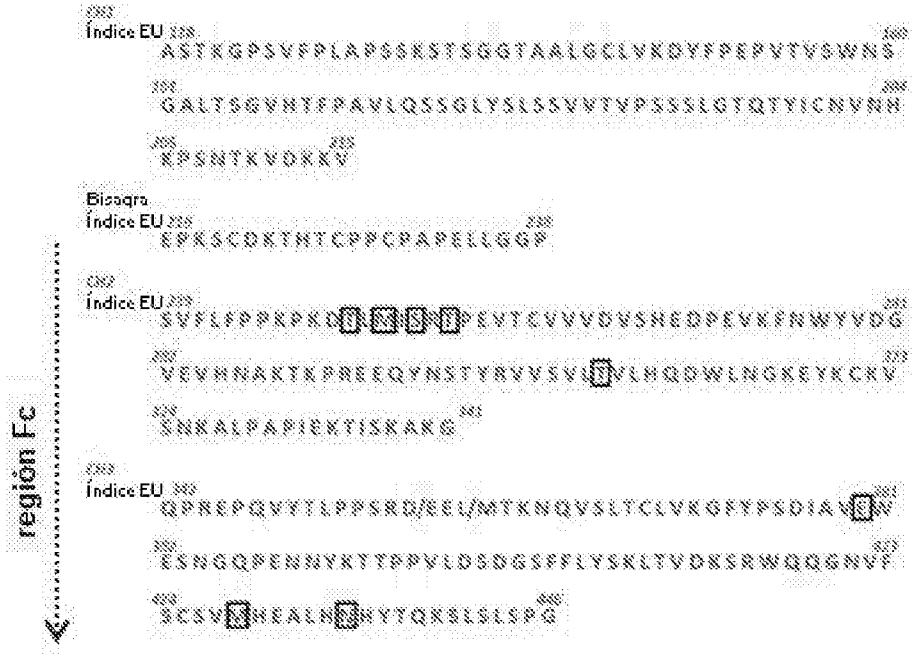

Índice EU
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKV
Bisagra
Índice EU
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
Índice EU
SVFLFPPKPKD
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
VLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKG
Índice EU
QPREPQVYTLPPSRD/EEL/MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSV
HEALH
YTQKSLSLSPG
región Fc

Figura 1

```
IgG1_Fc_region_YTE_SEQ_ID_NO:62      CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVV
IgG1_Fc_region_QL_SEQ_ID_NO:61       CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVV
IgG1_Fc_region_AAA_SEQ_ID_NO:60      CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
IgG1_Fc_region_SEQ_ID_NO:17          CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
IgG1_Fc_region_A_SEQ_ID_NO:59        CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
IgG1_Fc_region_LS_SEQ_ID_NO:63       CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
                                     ************************ * *:* ********

IgG1_Fc_region_YTE_SEQ_ID_NO:62      NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
IgG1_Fc_region_QL_SEQ_ID_NO:61       NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
IgG1_Fc_region_AAA_SEQ_ID_NO:60      NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLAVLHQDWLNGKEYKCKVS
IgG1_Fc_region_SEQ_ID_NO:17          NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
IgG1_Fc_region_A_SEQ_ID_NO:59        NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
IgG1_Fc_region_LS_SEQ_ID_NO:63       NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
                                     **********************:**********

IgG1_Fc_region_YTE_SEQ_ID_NO:62      PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
IgG1_Fc_region_QL_SEQ_ID_NO:61       PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
IgG1_Fc_region_AAA_SEQ_ID_NO:60      PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVAWESN
IgG1_Fc_region_SEQ_ID_NO:17          PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
IgG1_Fc_region_A_SEQ_ID_NO:59        PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
IgG1_Fc_region_LS_SEQ_ID_NO:63       PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
                                     ********************************* ****

IgG1_Fc_region_YTE_SEQ_ID_NO:62      LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
IgG1_Fc_region_QL_SEQ_ID_NO:61       LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLS
IgG1_Fc_region_AAA_SEQ_ID_NO:60      LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHAHYTQKSLSLS
IgG1_Fc_region_SEQ_ID_NO:17          LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
IgG1_Fc_region_A_SEQ_ID_NO:59        LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHAHYTQKSLSLS
IgG1_Fc_region_LS_SEQ_ID_NO:63       LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLS
                                     **********************:***** **********
```

Figura 2

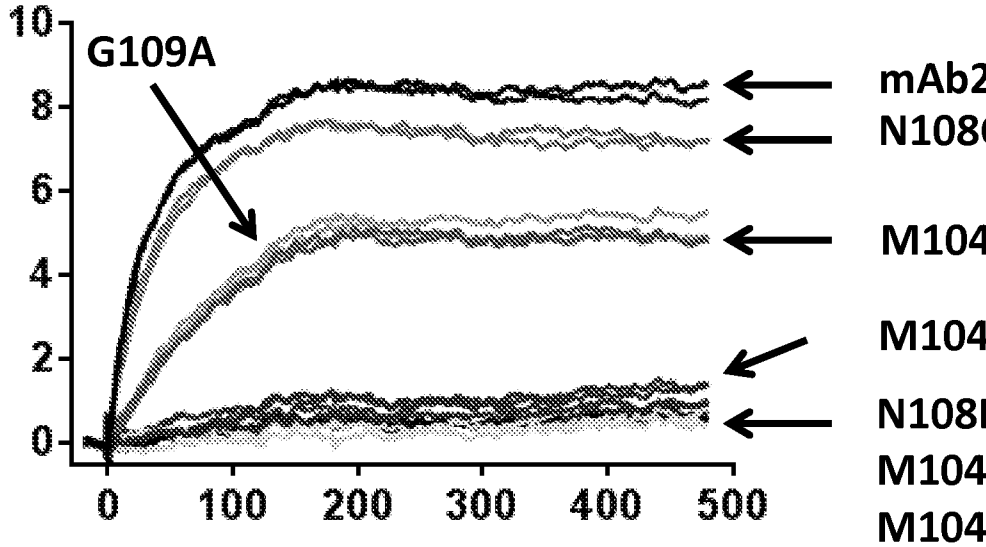

10
8
6
4
2
0
G109A
0
100
200
300
400
500
mAb2
N108
M104
M104
N108
M104
M104

Figura 3

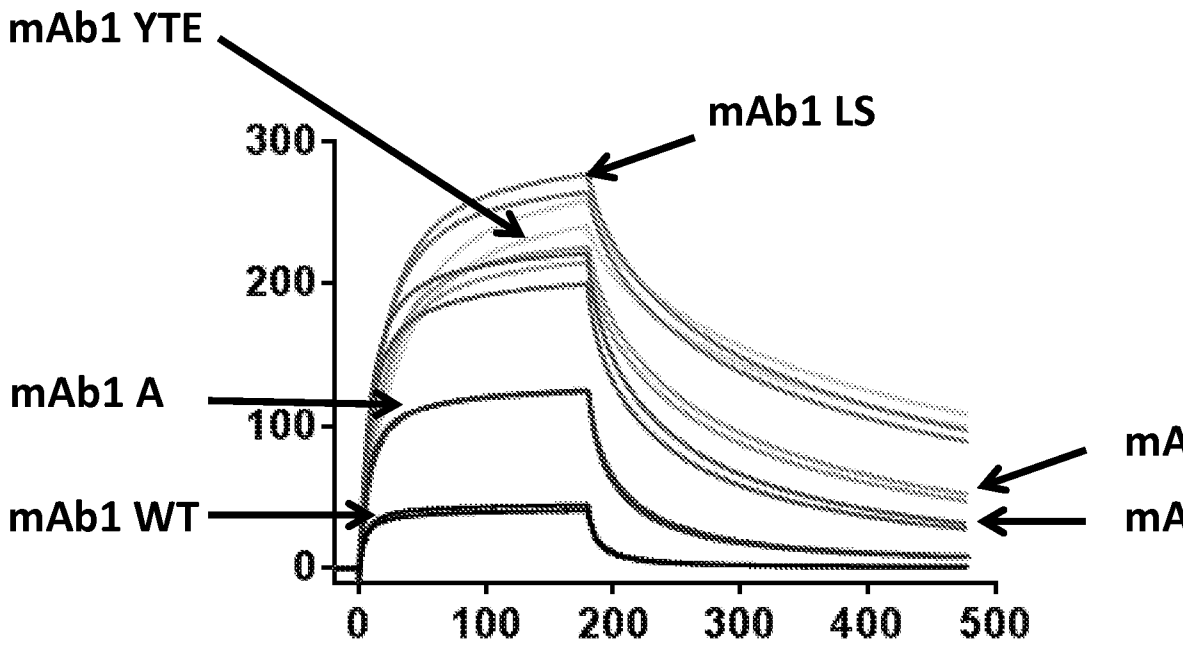

mAb1 YTE
mAb1 LS
300
200
mAb1 A
100
mAb1 WT
0
0
100
200
300
400
500

Figura 4A

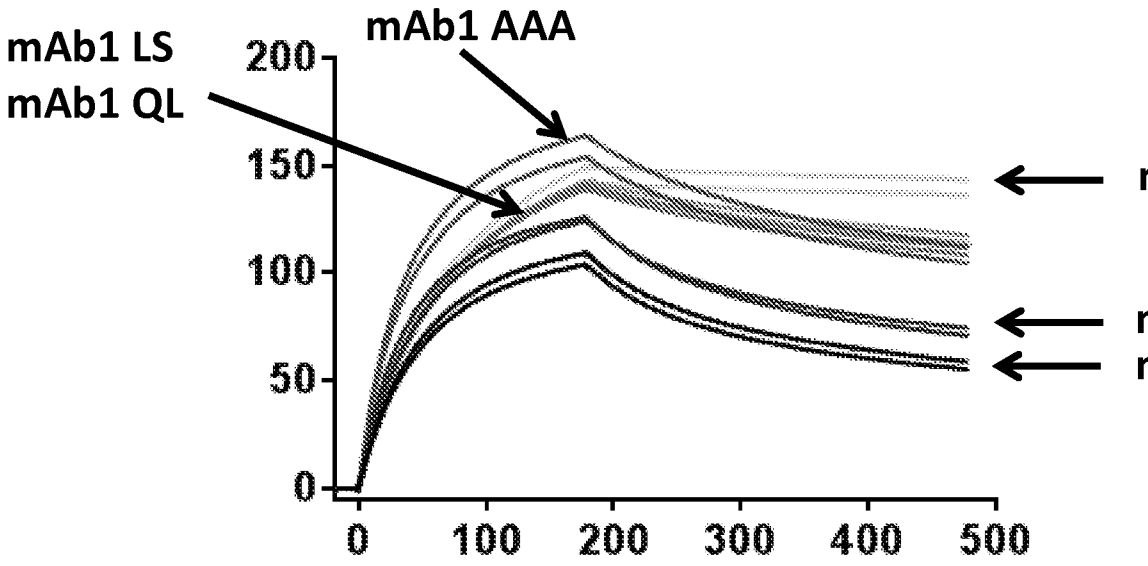


Figura 4B

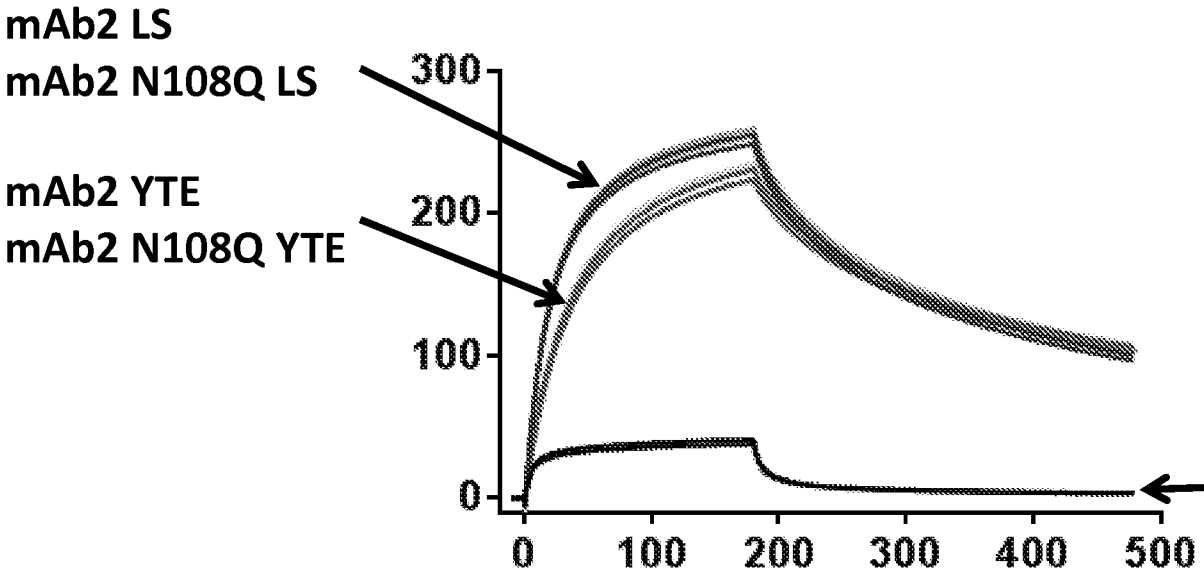

mAb2 LS
mAb2 N108Q LS
mAb2 YTE
mAb2 N108Q YTE
300
200
100
0
0
100
200
300
400
500

Figura 4C

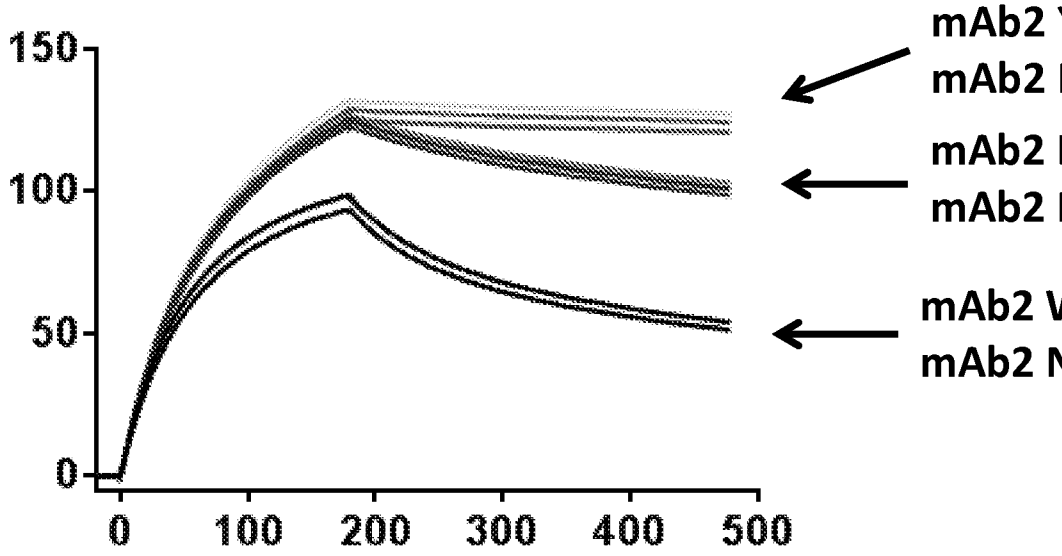
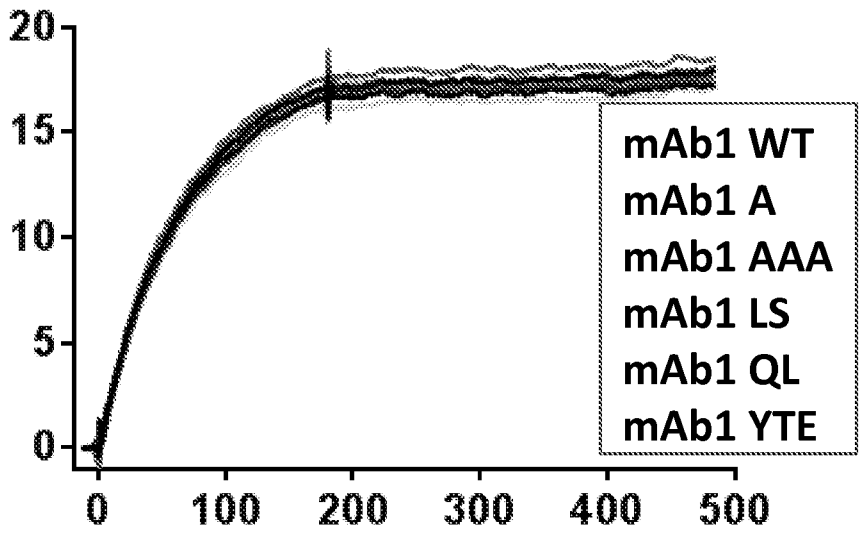

150
100
50
0
0
100
200
300
400
500
mAb2 V
mAb2 I
mAb2 I
mAb2 I
mAb2 V
mAb2 N

Figura 4D


20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
500
mAb1 WT
mAb1 A
mAb1 AAA
mAb1 LS
mAb1 QL
mAb1 YTE

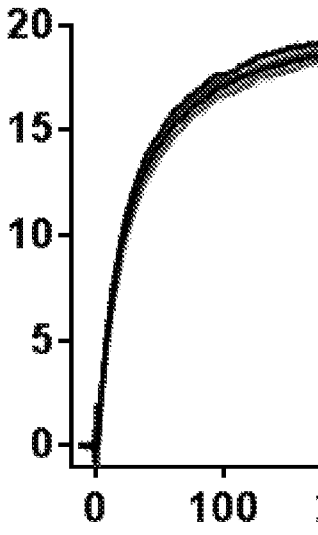
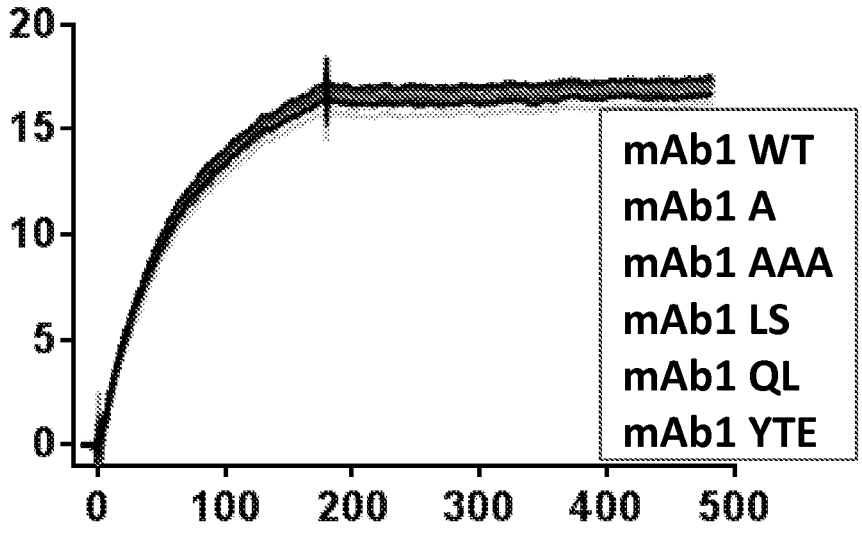

20
15
10
5
0
0
100

Figura 5A


20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
500
mAb1 WT
mAb1 A
mAb1 AAA
mAb1 LS
mAb1 QL
mAb1 YTE

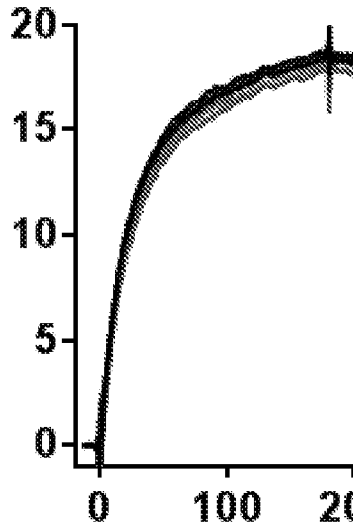

20
15
10
5
0
0
100

Figura 5B

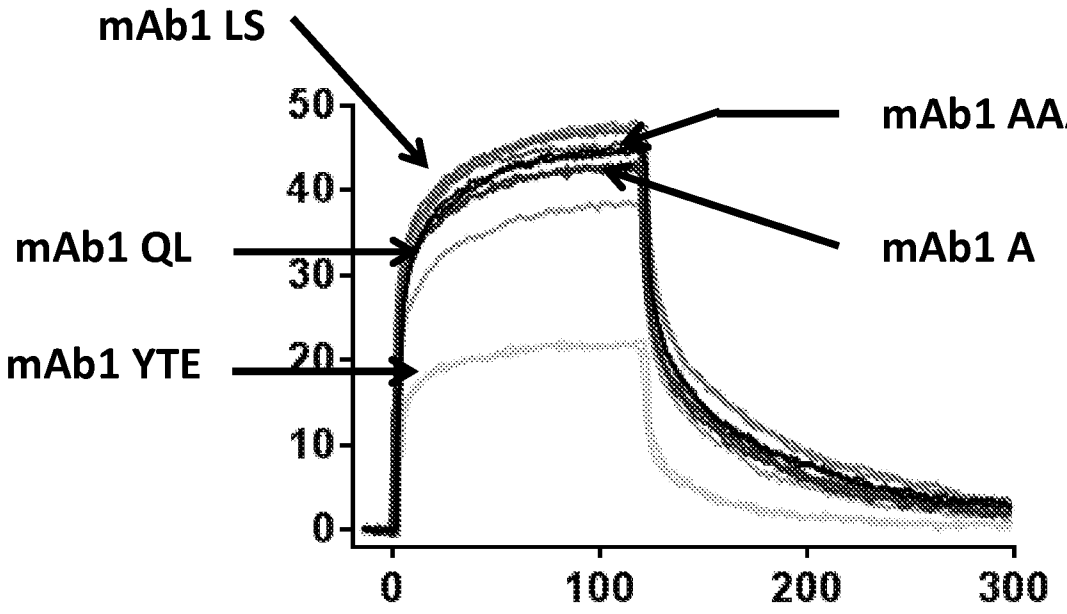

mAb1 LS
mAb1 AAA
mAb1 A
mAb1 QL
mAb1 YTE
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300

Figura 6A

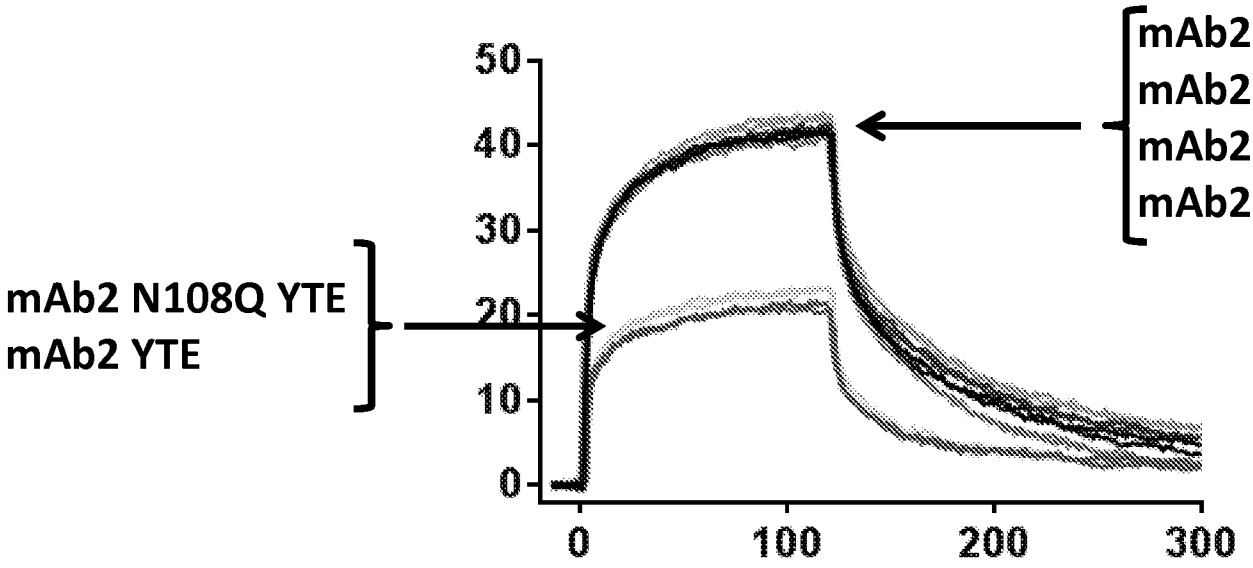

mAb2
mAb2
mAb2
mAb2
mAb2 N108Q YTE
mAb2 YTE
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300

Figura 6B

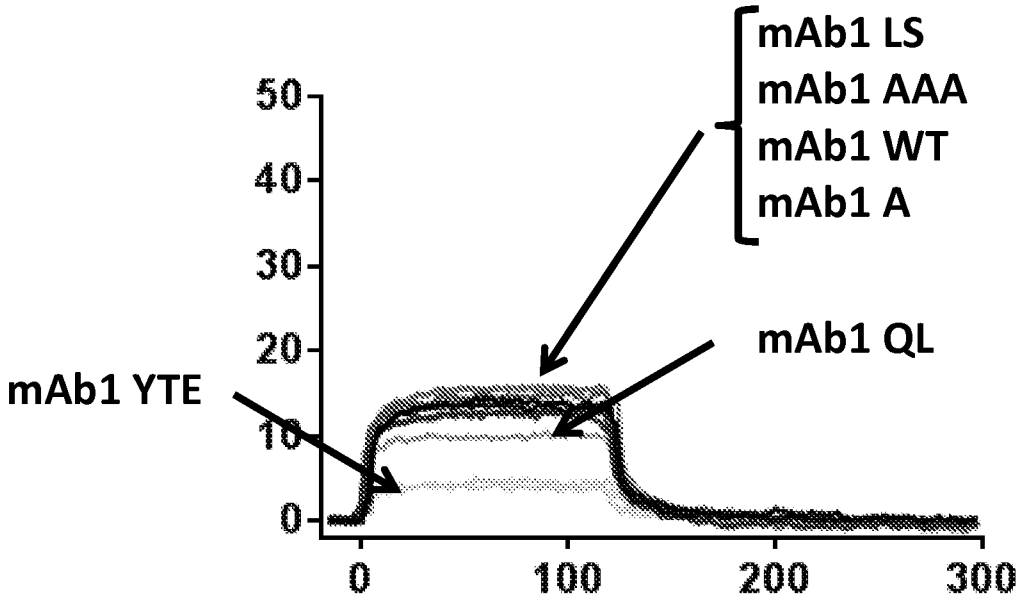

mAb1 LS
mAb1 AAA
mAb1 WT
mAb1 A
mAb1 QL
mAb1 YTE
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300

Figura 6C

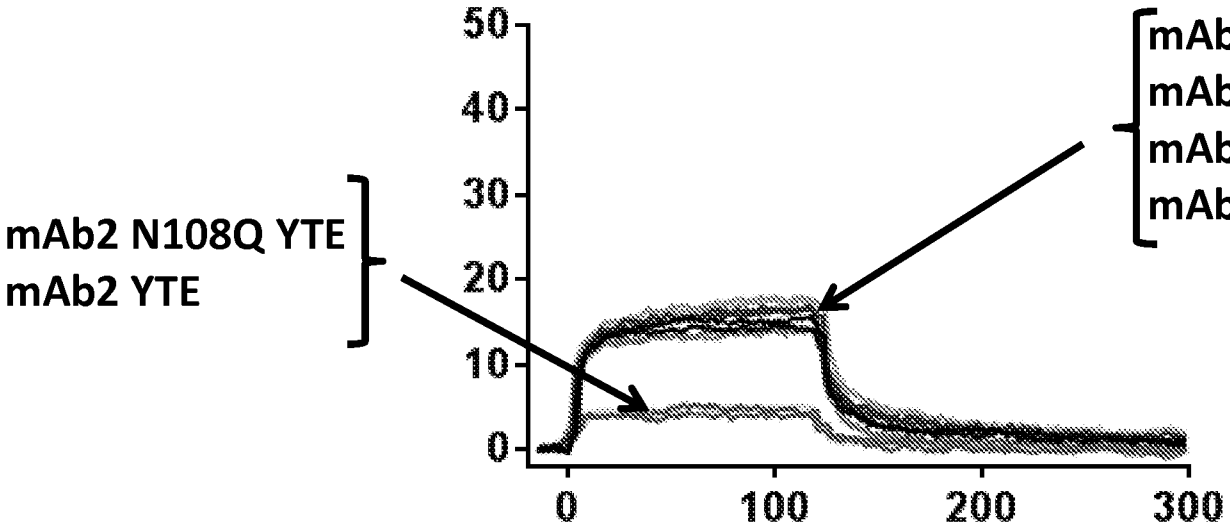

mAb2 N108Q YTE
mAb2 YTE
mAb
mAb
mAb
mAb
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300

Figura 6D

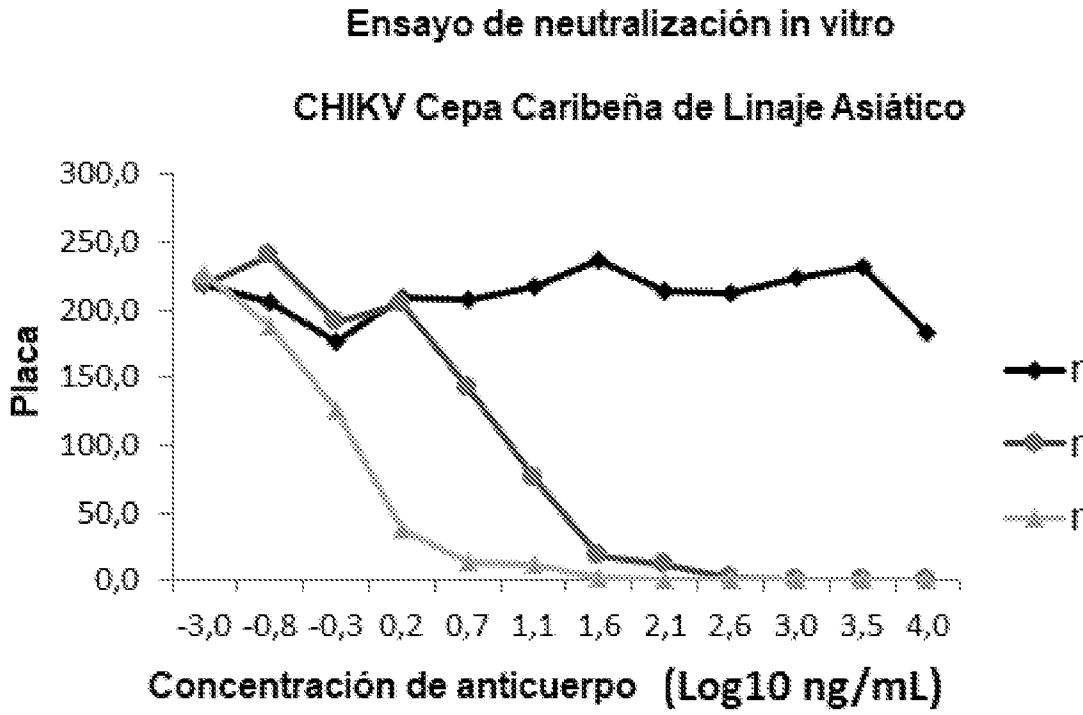

Ensayo de neutralización in vitro
CHIKV Cepa Caribeña de Linaje Asiático
Placa
300,0
250,0
200,0
150,0
100,0
50,0
0,0
-3,0 -0,8 -0,3 0,2 0,7 1,1 1,6 2,1 2,6 3,0 3,5 4,0
Concentración de anticuerpo (Log10 ng/mL)

Figura 7A

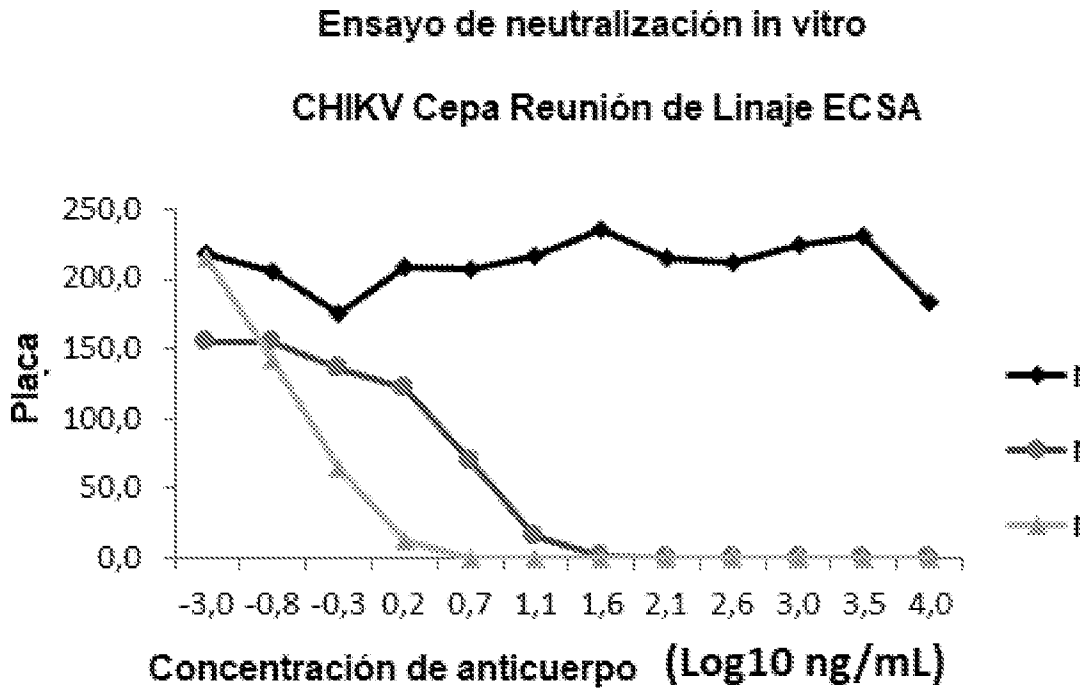

Ensayo de neutralización in vitro
CHIKV Cepa Reunión de Linaje ECSA
Placa
250,0
200,0
150,0
100,0
50,0
0,0
-3,0 -0,8 -0,3 0,2 0,7 1,1 1,6 2,1 2,6 3,0 3,5 4,0
Concentración de anticuerpo (Log10 ng/mL)

Figura 7B

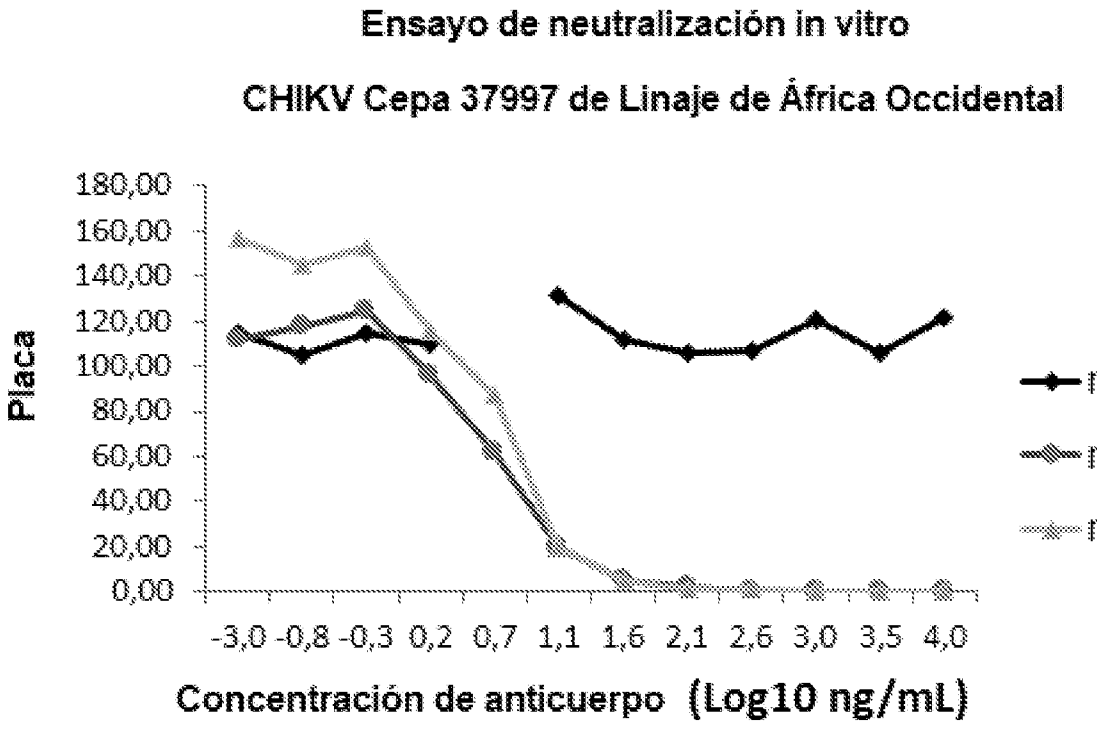

Ensayo de neutralización in vitro
CHIKV Cepa 37997 de Linaje de África Occidental
Placa
180,00
160,00
140,00
120,00
100,00
80,00
60,00
40,00
20,00
0,00
-3,0 -0,8 -0,3 0,2 0,7 1,1 1,6 2,1 2,6 3,0 3,5 4,0
Concentración de anticuerpo (Log10 ng/mL)

Figura 7C

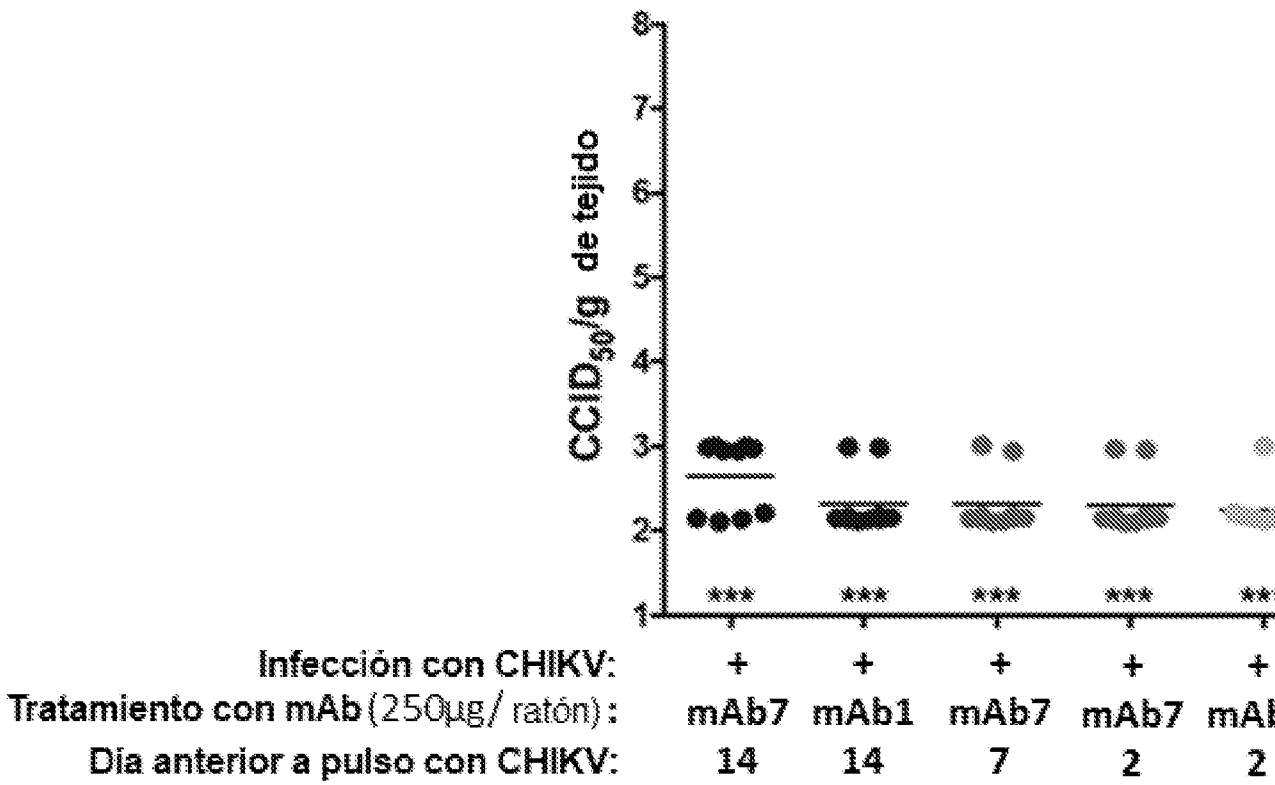

CCID50/g de tejido
8
7
6
5
4
3
2
1
***
***
***
***
***
Infección con CHIKV:
+
+
+
+
+
Tratamiento con mAb (250µg/ ratón):
mAb7
mAb1
mAb7
mAb7
mAb
Día anterior a pulso con CHIKV:
14
14
7
2
2

Figura 8

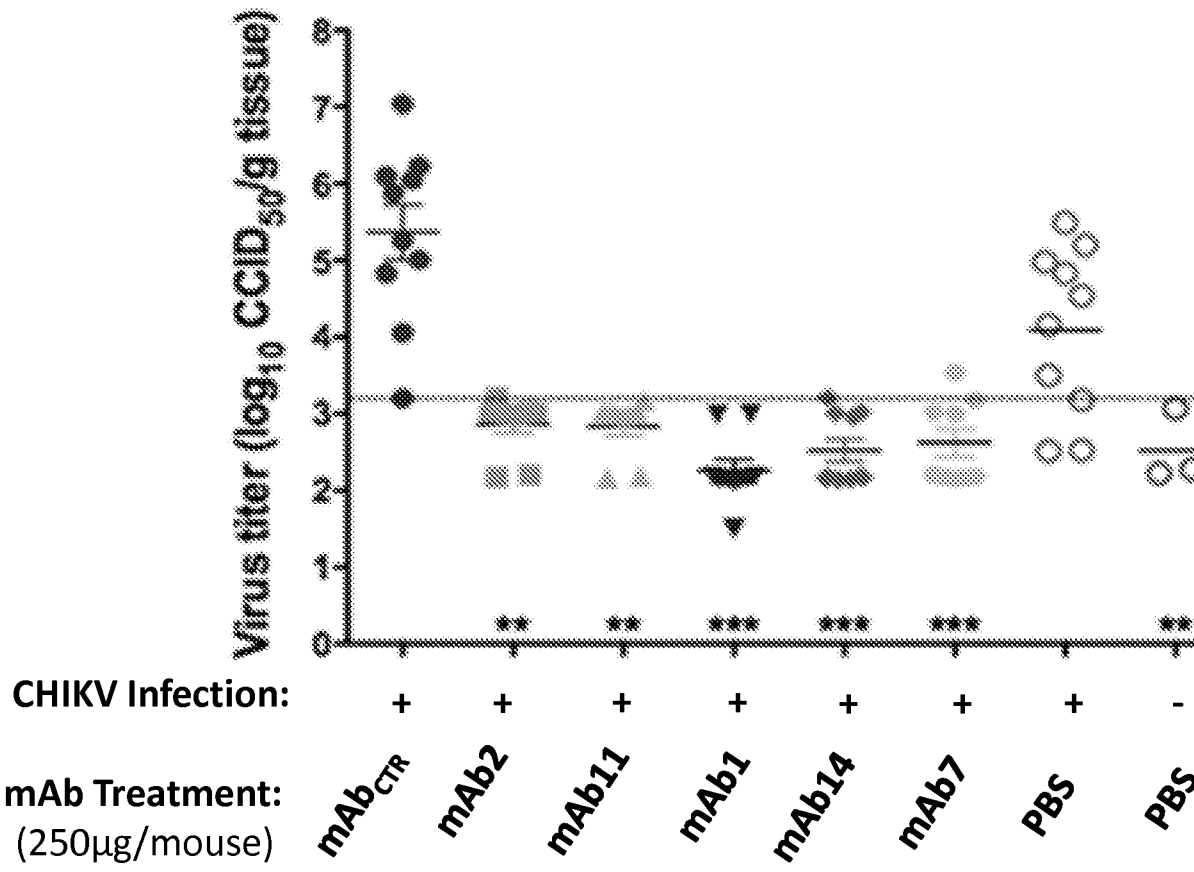

Virus titer (log_{10} $CCID_{50}$/g tissue)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
**
**
***
***
***
**
CHIKV Infection:
+
+
+
+
+
+
+
-
mAb Treatment:
(250µg/mouse)
mAb_{CTR}
mAb2
mAb11
mAb1
mAb14
mAb7
PBS
PBS

Figure 9A

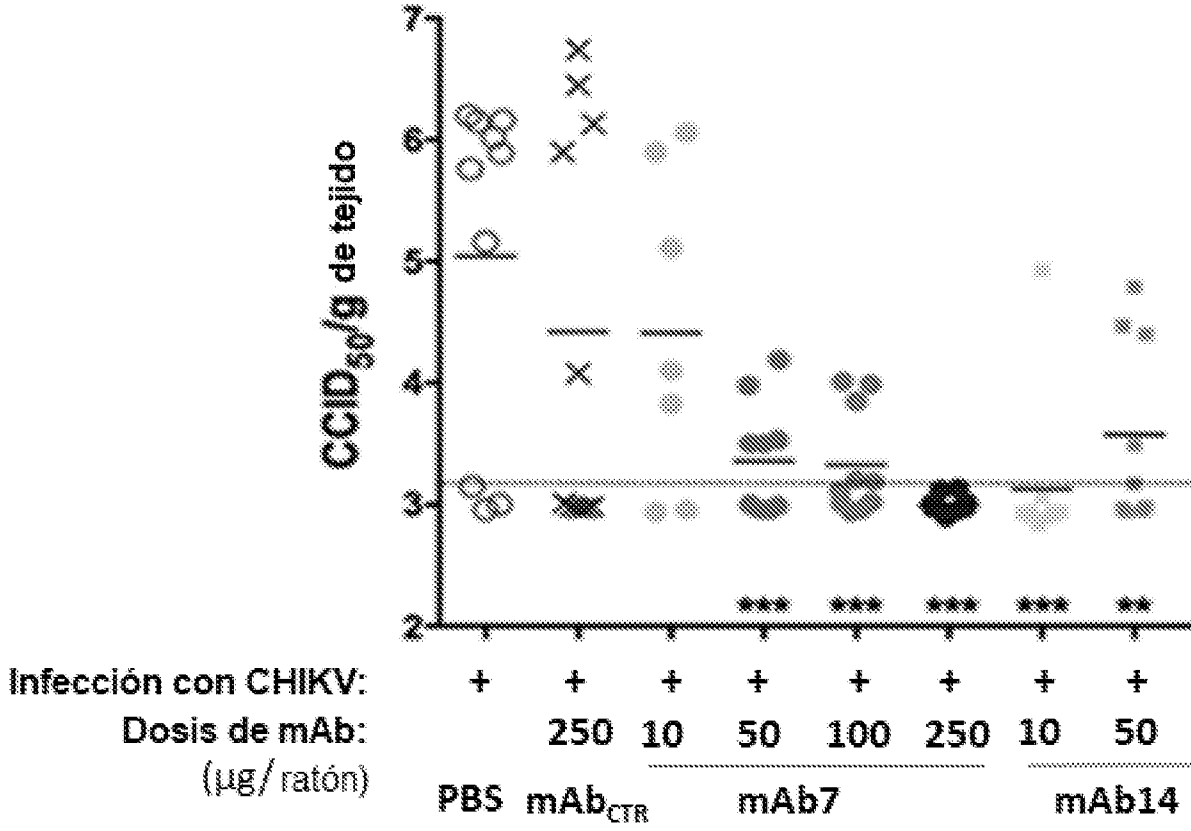

CCID50/g de tejido
7
6
5
4
3
2
***
***
***
***
**
Infección con CHIKV:
+ + + + + + + +
Dosis de mAb:
(µg/ ratón)
250 10 50 100 250 10 50
PBS
mAbCTR
mAb7
mAb14

Figura 9B

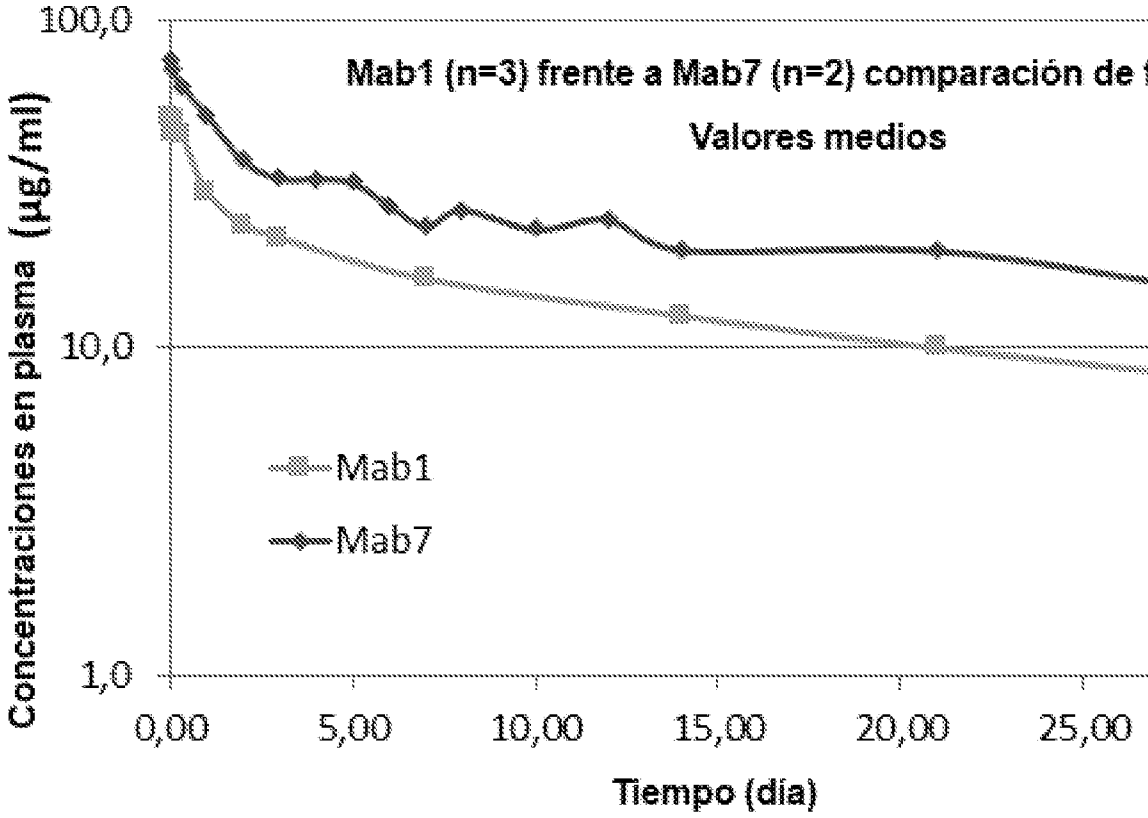

100,0
10,0
1,0
Concentraciones en plasma (µg/ml)
Mab1 (n=3) frente a Mab7 (n=2) comparación de
Valores medios
Mab1
Mab7
0,00
5,00
10,00
15,00
20,00
25,00
Tiempo (día)

Figura 10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SANOFI

<120> Anticuerpos anti-CHIKV y usos de éstos

<130> FR2016/026

<160> 63

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 126
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VH mAb1

<400> 1

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Thr Tyr Lys Gly Tyr Thr Gln Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Thr Pro Ala Thr Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Leu Ser Glu Thr Gly Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 2
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VL mAb1

<400> 2

```
Gln Ala Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1               5                   10                  15


Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Asp
            20                  25                  30


Tyr Asn Val His Trp Tyr Gln Leu Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
        35                  40                  45


Leu Ile Tyr Gly Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
    50                  55                  60


Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65                  70                  75                  80


Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
                85                  90                  95


Leu Ser Ala Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 3
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VH mAb2

<400> 3

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

```
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Leu
            20                  25                  30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Ser Glu Arg Glu Asp Gly Glu Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Glu Asp Thr Ser Ile Glu Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Met Ile Gly Gly Asn Gly Val Asp Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VL mAb2

<400> 4

```
Gln Ala Val Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Asn
            20                  25                  30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Arg Leu Ile
        35                  40                  45
```

Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDRH1 mAb1

<400> 5

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Gly
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDRH2 mAb1

<400> 6

Ile Ser Thr Tyr Lys Gly Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDRH3 mAb1

<400> 7

Ala Arg Val Leu Ser Glu Thr Gly Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDRL1 mAb1

<400> 8

Ser Ser Asn Ile Gly Ala Asp Tyr Asn
1 5

<210> 9
<211> 863
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CHIKVE2 LR2006 etiquetado con His

<400> 9

Ser Leu Ala Ile Pro Val Met Cys Leu Leu Ala Asn Thr Thr Phe Pro
1 5 10 15

Cys Ser Gln Pro Pro Cys Thr Pro Cys Cys Tyr Glu Lys Glu Pro Glu
20 25 30

Glu Thr Leu Arg Met Leu Glu Asp Asn Val Met Arg Pro Gly Tyr Tyr
35 40 45

Gln Leu Leu Gln Ala Ser Leu Thr Cys Ser Pro His Arg Gln Arg Arg
50 55 60

Ser Thr Lys Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro Tyr Leu
65 70 75 80

```
Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro Val
                85                  90                  95

Ala Leu Glu Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys Ile
            100                 105                 110

Gln Val Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His Asp Trp
        115                 120                 125

Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala Glu Arg
    130                 135                 140

Ala Gly Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly Thr
145                 150                 155                 160

Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu Thr
                165                 170                 175

Val Gly Phe Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr His Pro
            180                 185                 190

Phe His His Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser Arg
        195                 200                 205

Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln Ser Thr
    210                 215                 220

Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro
225                 230                 235                 240

Asp Arg Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr Val
                245                 250                 255

Asn Gly Gln Thr Val Arg Tyr Lys Cys Asn Cys Gly Gly Ser Asn Glu
            260                 265                 270

Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp Gln
        275                 280                 285
```

Cys His Ala Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro
290 295 300

Leu Val Pro Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His
305 310 315 320

Ile Pro Phe Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg
325 330 335

Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu Tyr
340 345 350

Pro Asp His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu Pro
355 360 365

Asn Tyr Gln Glu Glu Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr
370 375 380

Val Pro Thr Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr
385 390 395 400

Lys Tyr Trp Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro
405 410 415

His Glu Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
420 425 430

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Tyr Glu His Val
435 440 445

Thr Val Ile Pro Asn Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys Thr Leu Val Asn
450 455 460

Arg Pro Gly Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu Leu Leu Ser Val
465 470 475 480

Thr Leu Glu Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr Cys Glu Tyr Lys
485 490 495

Thr Val Ile Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly Thr Ala Glu Cys
500 505 510

Lys Asp Lys Asn Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val Phe Thr Gly Val
515 520 525

Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys Asp Ala Glu Asn
530 535 540

Thr Gln Leu Ser Glu Ala His Val Glu Lys Ser Glu Ser Cys Lys Thr
545 550 555 560

Glu Phe Ala Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser Ala Ser Ala Lys
565 570 575

Leu Arg Val Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile Thr Val Thr Ala Tyr Ala
580 585 590

Asn Gly Asp His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys Phe Ile Val Gly
595 600 605

Pro Met Ser Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys Ile Val Val Tyr
610 615 620

Lys Gly Asp Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe Gly Ala Gly Arg
625 630 635 640

Pro Gly Gln Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro Glu Ser Lys Asp
645 650 655

Val Tyr Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro Ala Val Gly Thr
660 665 670

Val His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe Lys Tyr Trp Leu
675 680 685

Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro Phe Gly Cys Gln
690 695 700

```
Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Val Asn Cys Ala Val Gly Asn Met
705                 710                 715                 720

Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Glu Ala Ala Phe Thr Arg Val Val Asp
                725                 730                 735

Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu Val Pro Ala Cys Thr His
            740                 745                 750

Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile Lys Tyr Ala Ala Ser Lys
        755                 760                 765

Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr Asn Ala Val Thr Ile Arg
    770                 775                 780

Glu Ala Glu Ile Glu Val Glu Gly Asn Ser Gln Leu Gln Ile Ser Phe
785                 790                 795                 800

Ser Thr Ala Leu Ala Ser Ala Glu Phe Arg Val Gln Val Cys Ser Thr
                805                 810                 815

Gln Val His Cys Ala Ala Glu Cys His Pro Pro Lys Asp His Ile Val
            820                 825                 830

Asn Tyr Pro Ala Ser His Thr Thr Leu Gly Val Gln Asp Ile Ser Ala
        835                 840                 845

Thr Ala Met Ser Trp Val Gln His His His His His His His His
    850                 855                 860
```

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDRL3 mAb1

<400> 10

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDRH1 mAb2

<400> 11

Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Leu Ser
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDRH2 mAb2

<400> 12

Ser Glu Arg Glu Asp Gly Glu Thr
1 5

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDRH3 mAb2

<400> 13

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Met Ile Gly Gly Asn Gly Val Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDRL1 mAb2

<400> 14

Gln Asp Ile Arg Asn Asn
1 5

<210> 15
<211> 863
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CHIKVE2 SL15649 etiquetado con His

<400> 15

Ser Leu Ala Ile Pro Val Met Cys Leu Leu Ala Asn Thr Thr Phe Pro
1 5 10 15

Cys Ser Gln Pro Pro Cys Thr Pro Cys Cys Tyr Glu Lys Glu Pro Glu
20 25 30

Glu Thr Leu Arg Met Leu Glu Asp Asn Val Met Arg Pro Gly Tyr Tyr
35 40 45

Gln Leu Leu Gln Ala Ser Leu Thr Cys Ser Pro His Arg Gln Arg Arg
50 55 60

Ser Thr Lys Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro Tyr Leu
65 70 75 80

Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro Val
85 90 95

Ala Leu Glu Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys Ile
100 105 110

Gln Val Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His Asp Trp
115 120 125

Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala Glu Arg
130 135 140

Ala Gly Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly Thr
145 150 155 160

Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu Thr
165 170 175

Val Gly Phe Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr His Pro
180 185 190

Phe His His Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser Arg
195 200 205

Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln Ser Thr
210 215 220

Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro
225 230 235 240

Asp Arg Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr Val
245 250 255

Asn Gly Gln Thr Val Arg Tyr Lys Cys Asn Cys Gly Gly Ser Asn Glu
260 265 270

Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp Gln
275 280 285

Cys His Ala Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro
290 295 300

Leu Val Pro Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His
305 310 315 320

Ile Pro Phe Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg
325 330 335

Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu Tyr
340 345 350

```
Pro Asp His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu Pro
        355                 360                 365

Asn Tyr Gln Glu Glu Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr
    370                 375                 380

Val Pro Thr Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr
385                 390                 395                 400

Lys Tyr Trp Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro
                405                 410                 415

His Glu Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
            420                 425                 430

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Tyr Glu His Val
        435                 440                 445

Thr Val Ile Pro Asn Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys Thr Leu Val Asn
    450                 455                 460

Arg Pro Gly Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu Leu Leu Ser Val
465                 470                 475                 480

Thr Leu Glu Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr Cys Glu Tyr Lys
                485                 490                 495

Thr Val Ile Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly Thr Ala Glu Cys
            500                 505                 510

Lys Asp Lys Asn Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val Phe Thr Gly Val
        515                 520                 525

Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys Asp Ala Glu Asn
    530                 535                 540

Thr Gln Leu Ser Glu Ala His Val Glu Lys Ser Glu Ser Cys Lys Thr
545                 550                 555                 560
```

Glu Phe Ala Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser Ala Ser Ala Lys
565 570 575

Leu Arg Val Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile Thr Val Thr Ala Tyr Ala
580 585 590

Asn Gly Asp His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys Phe Ile Val Gly
595 600 605

Pro Met Ser Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys Ile Val Val Tyr
610 615 620

Lys Gly Asp Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe Gly Ala Gly Arg
625 630 635 640

Pro Gly Gln Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro Glu Ser Lys Asp
645 650 655

Val Tyr Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro Ala Ala Gly Thr
660 665 670

Val His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe Lys Tyr Trp Leu
675 680 685

Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro Phe Gly Cys Gln
690 695 700

Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Val Asn Cys Ala Val Gly Asn Met
705 710 715 720

Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Glu Ala Ala Phe Thr Arg Val Val Asp
725 730 735

Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu Val Leu Ala Cys Thr His
740 745 750

Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile Lys Tyr Ala Ala Ser Lys
755 760 765

```
Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr Asn Ala Val Thr Ile Arg
    770                 775                 780

Glu Ala Glu Ile Glu Val Glu Gly Asn Ser Gln Leu Gln Ile Ser Phe
785                 790                 795                 800

Ser Thr Ala Leu Ala Ser Ala Glu Phe Arg Val Gln Val Cys Ser Thr
                805                 810                 815

Gln Val His Cys Ala Ala Glu Cys His Pro Pro Lys Asp His Ile Val
            820                 825                 830

Asn Tyr Pro Ala Ser His Thr Thr Leu Gly Val Gln Asp Ile Ser Ala
        835                 840                 845

Thr Ala Met Ser Trp Val Gln His His His His His His His His
    850                 855                 860
```

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDRL3 mAb2

<400> 16

```
Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1               5
```

<210> 17
<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región Fc de IgG1 sin sustitución

<400> 17

```
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1               5                   10                  15
```

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

<210> 18
<211> 663
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de región Fc de IgG1 sin sustitución

<220>
<221> exón
<222> (1)..(663)

<400> 18
```
tgt ccc cct tgt cct gcc cct gaa ctg ctg ggc gga cct tcc gtg ttc          48
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1               5                   10                  15

ctg ttc ccc cca aag ccc aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc          96
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
            20                  25                  30

gaa gtg acc tgc gtg gtg gtg gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg         144
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
        35                  40                  45

aag ttc aat tgg tac gtg gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc         192
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
    50                  55                  60

aag ccc aga gag gaa cag tac aac tcc acc tac cgg gtg gtg tcc gtg         240
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65                  70                  75                  80

ctg aca gtg ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc         288
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
                85                  90                  95

aag gtg tcc aac aaa gcc ctg cct gcc ccc atc gag aaa acc atc agc         336
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
            100                 105                 110

aag gcc aag ggc cag ccc cgc gaa ccc cag gtg tac aca ctg cct ccc         384
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
        115                 120                 125

agc agg gac gag ctg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg         432
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
    130                 135                 140
```

```
aaa ggc ttc tac ccc tcc gat atc gcc gtg gaa tgg gag agc aac ggc        480
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145                 150                 155                 160

cag ccc gag aac aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac        528
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
                165                 170                 175

ggc tca ttc ttc ctg tac agc aag ctg acc gtg gac aag tcc cgg tgg        576
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
            180                 185                 190

cag cag ggc aac gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac        624
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
        195                 200                 205

aac cac tac aca cag aag tcc ctg agc ctg agc ccc ggc
663
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    210                 215                 220


<210>  19
<211>  455
<212>  PRT
<213>  Secuencia Artificial

<220>
<223>  HC mAb1

<400>  19

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


Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30


Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45


Gly Trp Ile Ser Thr Tyr Lys Gly Tyr Thr Gln Tyr Ala Gln Asn Phe
    50                  55                  60


Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Thr Pro Ala Thr Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80
```

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Leu Ser Glu Thr Gly Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 20
<211> 217
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC mAb1

<400> 20

Gln Ala Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Asp
20 25 30

Tyr Asn Val His Trp Tyr Gln Leu Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Ala Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 21
<211> 1368
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de HC mAb1

<400> 21
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta cagcttcacc agctacggca tcagctgggt gcgccaggct
120

cctggacagg gcctggaatg gatgggctgg atcagcacct acaagggcta cacccagtac
180

gcccagaact tccagggcag agtgaccatc accaccgaca cccctgccac caccgtgtac
240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagagtgctg
300

agcgagacag gctactttta ctactactat tacggcatgg acgtgtgggg ccagggcacc
360

ctcgtgacag tgtctagcgc ctctacaaag ggccccagcg tgttccctct ggcccctagc
420

agcaagagca catctggcgg aacagccgcc ctgggctgcc tcgtgaagga ctactttccc
480

gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcggc gctctgacct ctggcgtgca caccttttcca
540

gccgtgctgc agagcagcgg cctgtactct ctgagcagcg tcgtgactgt gcccagcagc
600

agcctgggaa cccagaccta catctgcaac gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg
660

gacaagaagg tggaacccaa gagctgcgac aagacccaca cctgtccccc ttgtcctgcc
720

cctgaactgc tgggcggacc ttccgtgttc ctgttccccc caaagcccaa ggacaccctg

780

atgatcagcc ggacccccga agtgacctgc gtggtggtgg atgtgtccca cgaggaccct
840

gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc gtggaagtgc acaacgccaa gaccaagccc
900

agagaggaac agtacaactc cacctaccgg gtggtgtccg tgctgacagt gctgcaccag
960

gactggctga acggcaaaga gtacaagtgc aaggtgtcca acaaagccct gcctgccccc
1020

atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagccccgcg aaccccaggt gtacacactg
1080

cctcccagca gggacgagct gaccaagaac caggtgtccc tgacctgtct cgtgaaaggc
1140

ttctaccccct ccgatatcgc cgtggaatgg gagagcaacg gccagcccga gaacaactac
1200

aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac ggctcattct tcctgtacag caagctgacc
1260

gtggacaagt cccggtggca gcagggcaac gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc
1320

ctgcacaacc actacacaca gaagtccctg agcctgagcc ccggctga
1368

<210> 22
<211> 654
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de LC mAb1

<400> 22
caggctgtcg tgacacagcc tcctagcgtg tcaggcgccc ctggccagag agtgaccatc
60

agctgtacag gcagcagcag caacatcgga gccgactaca acgtgcactg gtatcagctg
120

ctgcccggca ccgcccctaa gctgctgatc tacggcaaca ccaaccggcc tagcggcgtg
180

cccgatagat tcagcggcag caagagcggc acaagcgcca gcctggccat tactggactg

240

caggccgagg acgaggccga ctactactgc cagagctacg acagcagcct gagcgcctcc
300

gtgtttggcg gcggaacaaa gctgacagtg ctgggccagc ctaaggccgc tccaagcgtg
360

accctgttcc ctccaagcag cgaggaactg caggctaaca aggccaccct cgtgtgcctg
420

atcagcgact tctatcctgg cgccgtgacc gtggcctgga aggccgatag ctctcctgtg
480

aaggccggcg tggaaaccac cacccctagc aagcagagca acaacaaata cgccgccagc
540

agctacctga gcctgacccc cgagcagtgg aagtcccaca gatcctacag ctgccaagtg
600

acccacgagg gcagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta ccgagtgctc ctga
654

<210> 23
<211> 455
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC mAb3

<400> 23

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Thr Tyr Lys Gly Tyr Thr Gln Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Thr Pro Ala Thr Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Leu Ser Glu Thr Gly Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 24
<211> 1368
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico de HC mAb3

<400> 24
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta cagcttcacc agctacggca tcagctgggt gcgccaggct
120

cctggacagg gcctggaatg gatgggctgg atcagcacct acaagggcta cacccagtac
180

gcccagaact tccagggcag agtgaccatc accaccgaca cccctgccac caccgtgtac
240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagagtgctg
300

agcgagacag gctactttta ctactactat tacggcatgg acgtgtgggg ccagggcacc
360

ctcgtgacag tgtctagcgc cagcacaaag ggccccagcg tgttccctct ggcccctagc
420

agcaagagca catctggcgg aacagccgcc ctgggctgcc tcgtgaagga ctactttccc
480

gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcggc gctctgacct ctggcgtgca caccttttcca
540

gccgtgctgc agagcagcgg cctgtactct ctgagcagcg tcgtgactgt gcccagcagc
600

agcctgggaa cccagaccta catctgcaac gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg
660

gacaagaagg tggaacccaa gagctgcgac aagacccaca cctgtccccc ttgtcctgcc
720

cctgaactgc tgggcggacc ttccgtgttc ctgttccccc caaagcccaa ggacaccctg
780

atgatcagcc ggacccccga agtgacctgc gtggtggtgg atgtgtccca cgaggaccct
840

gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc gtggaagtgc acaacgccaa gaccaagccc
900

agagaggaac agtacaactc cacctaccgg gtggtgtccg tgctgacagt gctgcaccag
960

gactggctga acggcaaaga gtacaagtgc aaggtgtcca acaaagccct gcctgccccc

1020

atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagccccgcg aaccccaggt gtacacactg
1080

cctcccagca gggacgagct gaccaagaac caggtgtccc tgacctgtct cgtgaaaggc
1140

ttctaccccc ccgatatcgc cgtggaatgg gagagcaacg gccagcccga gaacaactac
1200

aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac ggctcattct tcctgtacag caagctgacc
1260

gtggacaagt cccggtggca gcagggcaac gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc
1320

ctgcacgccc actacacaca gaagtccctg agcctgagcc ccggctga
1368

<210> 25
<211> 455
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC mAb4

<400> 25

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Thr Tyr Lys Gly Tyr Thr Gln Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Thr Pro Ala Thr Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Val Leu Ser Glu Thr Gly Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Ala Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Ala Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 26
<211> 1368
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de HC mAb4

<400> 26
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta cagcttcacc agctacggca tcagctgggt gcgccaggct
120

cctggacagg gcctggaatg gatgggctgg atcagcacct acaagggcta cacccagtac
180

gcccagaact tccagggcag agtgaccatc accaccgaca cccctgccac caccgtgtac
240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagagtgctg
300

agcgagacag gctactttta ctactactat tacggcatgg acgtgtgggg ccagggcacc
360

ctcgtgacag tgtctagcgc cagcacaaag ggccccagcg tgttccctct ggcccctagc
420

agcaagagca catctggcgg aacagccgcc ctgggctgcc tcgtgaagga ctactttccc
480

gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcggc gctctgacct ctggcgtgca cacctttcca
540

gccgtgctgc agagcagcgg cctgtactct ctgagcagcg tcgtgactgt gcccagcagc
600

agcctgggaa cccagaccta catctgcaac gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg
660

gacaagaagg tggaacccaa gagctgcgac aagacccaca cctgtccccc ttgtcctgcc
720

cctgaactgc tgggcggacc ttccgtgttc ctgttccccc caaagcccaa ggacaccctg
780

atgatcagcc ggacccccga agtgacctgc gtggtggtgg atgtgtccca cgaggaccct
840

gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc gtggaagtgc acaacgccaa gaccaagccc
900

agagaggaac agtacaactc cacctaccgg gtggtgtccg tgctggctgt gctgcaccag
960

gactggctga acggcaaaga gtacaagtgc aaggtgtcca acaaagccct gcctgccccc
1020

atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagccccgcg aaccccaggt gtacacactg
1080

cctcccagca gggacgagct gaccaagaac caggtgtccc tgacctgtct cgtgaaaggc
1140

ttctaccccct ccgatatcgc cgtggcctgg gagagcaacg gccagcccga gaacaactac
1200

aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac ggctcattct tcctgtacag caagctgacc
1260

gtggacaagt cccggtggca gcagggcaac gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc
1320

ctgcacgccc actacacaca gaagtccctg agcctgagcc ccggctga
1368

<210> 27
<211> 455
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC mAb5

<400> 27

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Thr Tyr Lys Gly Tyr Thr Gln Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Thr Pro Ala Thr Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Leu Ser Glu Thr Gly Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 28
<211> 1368
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de HC mAb5

<400> 28
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta cagcttcacc agctacggca tcagctgggt gcgccaggct
120

cctggacagg gcctggaatg gatgggctgg atcagcacct acaagggcta cacccagtac
180

gcccagaact tccagggcag agtgaccatc accaccgaca cccctgccac caccgtgtac
240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagagtgctg
300

agcgagacag gctactttta ctactactat tacggcatgg acgtgtgggg ccagggcacc
360

ctcgtgacag tgtctagcgc cagcacaaag ggccccagcg tgttccctct ggcccctagc
420

agcaagagca catctggcgg aacagccgcc ctgggctgcc tcgtgaagga ctactttccc
480

gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcggc gctctgacct ctggcgtgca cacctttcca
540

gccgtgctgc agagcagcgg cctgtactct ctgagcagcg tcgtgactgt gcccagcagc
600

agcctgggaa cccagaccta catctgcaac gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg
660

gacaagaagg tggaacccaa gagctgcgac aagacccaca cctgtccccc ttgtcctgcc
720

cctgaactgc tgggcggacc ttccgtgttc ctgttccccc caaagcccaa ggaccagctg
780

atgatcagcc ggacccccga agtgacctgc gtggtggtgg atgtgtccca cgaggaccct
840

gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc gtggaagtgc acaacgccaa gaccaagccc
900

agagaggaac agtacaactc cacctaccgg gtggtgtccg tgctgacagt gctgcaccag
960

gactggctga acggcaaaga gtacaagtgc aaggtgtcca acaaagccct gcctgccccc
1020

atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagccccgcg aaccccaggt gtacacactg
1080

cctcccagca gggacgagct gaccaagaac caggtgtccc tgacctgtct cgtgaaaggc
1140

ttctaccccct ccgatatcgc cgtggaatgg gagagcaacg gccagcccga gaacaactac
1200

aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac ggctcattct tcctgtacag caagctgacc
1260

gtggacaagt cccggtggca gcagggcaac gtgttcagct gcagcgtgct gcacgaggcc
1320

ctgcacaacc actacacaca gaagtccctg agcctgagcc ccggctga
1368

<210> 29
<211> 455
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC mAb6

<400> 29

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Thr Tyr Lys Gly Tyr Thr Gln Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Thr Pro Ala Thr Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Leu Ser Glu Thr Gly Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

```
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
                325                 330                 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
            340                 345                 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
        355                 360                 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
    370                 375                 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385                 390                 395                 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
                405                 410                 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
            420                 425                 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
        435                 440                 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    450                 455
```

<210> 30
<211> 1368
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de HC mAb6

<400> 30
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta cagcttcacc agctacggca tcagctgggt gcgccaggct 120

cctggacagg gcctggaatg gatgggctgg atcagcacct acaagggcta cacccagtac
180

gcccagaact tccagggcag agtgaccatc accaccgaca cccctgccac caccgtgtac
240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagagtgctg
300

agcgagacag gctactttta ctactactat tacggcatgg acgtgtgggg ccagggcacc
360

ctcgtgacag tgtctagcgc cagcacaaag ggccccagcg tgttccctct ggcccctagc
420

agcaagagca catctggcgg aacagccgcc ctgggctgcc tcgtgaagga ctactttccc
480

gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcggc gctctgacct ctggcgtgca cacctttcca
540

gccgtgctgc agagcagcgg cctgtactct ctgagcagcg tcgtgactgt gcccagcagc
600

agcctgggaa cccagaccta catctgcaac gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg
660

gacaagaagg tggaacccaa gagctgcgac aagacccaca cctgtccccc ttgtcctgcc
720

cctgaactgc tgggcggacc ttccgtgttc ctgttccccc caaagcccaa ggacaccctg
780

tacatcaccc gcgagcccga agtgacctgc gtggtggtgg atgtgtccca cgaggaccct
840

gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc gtggaagtgc acaacgccaa gaccaagccc
900

agagaggaac agtacaactc cacctaccgg gtggtgtccg tgctgacagt gctgcaccag
960

gactggctga acggcaaaga gtacaagtgc aaggtgtcca acaaagccct gcctgccccc
1020

atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagccccgcg aaccccaggt gtacacactg
1080

cctcccagca gggacgagct gaccaagaac caggtgtccc tgacctgtct cgtgaaaggc
1140

ttctacccct ccgatatcgc cgtggaatgg gagagcaacg gccagcccga gaacaactac
1200

aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac ggctcattct tcctgtacag caagctgacc
1260

gtggacaagt cccggtggca gcagggcaac gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc
1320

ctgcacaacc actacacaca gaagtccctg agcctgagcc ccggctga
1368

<210> 31
<211> 455
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC mAb7

<400> 31

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Thr Tyr Lys Gly Tyr Thr Gln Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Thr Pro Ala Thr Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Leu Ser Glu Thr Gly Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

```
        115                 120                 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
    130                 135                 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145                 150                 155                 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
                165                 170                 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
            180                 185                 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
        195                 200                 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
    210                 215                 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225                 230                 235                 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
                245                 250                 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
            260                 265                 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
        275                 280                 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
    290                 295                 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305                 310                 315                 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
```

325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 32
<211> 1368
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de HC mAb7

<400> 32
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg
60

tcctgcaagg ccagcggcta cagcttcacc agctacggca tcagctgggt gcgccaggct
120

cctggacagg gcctggaatg gatgggctgg atcagcacct acaagggcta cacccagtac
180

gcccagaact tccagggcag agtgaccatc accaccgaca cccctgccac caccgtgtac
240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagagtgctg
300

agcgagacag gctactttta ctactactat tacggcatgg acgtgtgggg ccagggcacc
360

ctcgtgacag tgtctagcgc cagcacaaag ggccccagcg tgttccctct ggcccctagc
420

agcaagagca catctggcgg aacagccgcc ctgggctgcc tcgtgaagga ctactttccc
480

gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcggc gctctgacct ctggcgtgca cacctttcca
540

gccgtgctgc agagcagcgg cctgtactct ctgagcagcg tcgtgactgt gcccagcagc
600

agcctgggaa cccagaccta catctgcaac gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg
660

gacaagaagg tggaacccaa gagctgcgac aagacccaca cctgtccccc ttgtcctgcc
720

cctgaactgc tgggcggacc ttccgtgttc ctgttccccc caaagcccaa ggacaccctg
780

atgatcagcc ggacccccga agtgacctgc gtggtggtgg atgtgtccca cgaggaccct
840

gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc gtggaagtgc acaacgccaa gaccaagccc
900

agagaggaac agtacaactc cacctaccgg gtggtgtccg tgctgacagt gctgcaccag
960

gactggctga acggcaaaga gtacaagtgc aaggtgtcca acaaagccct gcctgccccc
1020

atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagccccgcg aaccccaggt gtacacactg
1080

cctcccagca gggacgagct gaccaagaac caggtgtccc tgacctgtct cgtgaaaggc
1140

ttctaccccct ccgatatcgc cgtggaatgg gagagcaacg gccagcccga gaacaactac
1200

aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac ggctcattct tcctgtacag caagctgacc
1260

gtggacaagt cccggtggca gcagggcaac gtgttcagct gcagcgtgct gcacgaggcc
1320

ctgcacagcc actacacaca gaagtccctg agcctgagcc ccggctga
1368

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mAb2 CDRH3

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (8)..(8)
<223> X = cualquier aminoácido M

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (12)..(12)
<223> X = cualquier aminoácido N

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (13)..(13)
<223> X = cualquier aminoácido G

<400> 33

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Xaa Ile Gly Gly Xaa Xaa Val Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mAb10 CDRH3

<400> 34

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Ile Ile Gly Gly Asn Gly Val Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 35
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mAb11 CDRH3

<400> 35

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Met Ile Gly Gly Gln Gly Val Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 36
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mAb12 CDRH3

<400> 36

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Met Ile Gly Gly Asn Ala Val Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 37
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC mAb2

<400> 37

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Leu
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ser Glu Arg Glu Asp Gly Glu Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Glu Asp Thr Ser Ile Glu Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Met Ile Gly Gly Asn Gly Val Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

```
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        275                 280                 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    290                 295                 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305                 310                 315                 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                325                 330                 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
            340                 345                 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
        355                 360                 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
    370                 375                 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385                 390                 395                 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                405                 410                 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
            420                 425                 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Pro Gly
    450
```

<210> 38
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LC mAb2

<400> 38

Gln Ala Val Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Asn
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 39
<211> 1359
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ácido nucleico de HC mAb2

<400> 39
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg tgtccggcta catcctgagc aagctgagcg tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gcctggaatg gatgggcggc agcgagcgcg aagatggcga gacagtgtac 180

gcccagaagt tccagggccg gatcagcctg accgaggaca cctctatcga gacagcctac 240

atggaactga gcagcctgtc cagcgaggat accgccgtgt actactgtgc caccggcggc 300

ttttggagca tgatcggcgg aaacggcgtg gactattggg gccagggaac cctcgtgacc 360

gtgtctagcg cctctacaaa gggccccagc gtgttccctc tggcccctag cagcaagagc 420

acatctggcg gaacagccgc cctgggctgc ctcgtgaagg actactttcc cgagcccgtg 480

acagtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggagtgc ataccttttcc agccgtgctg 540

cagagcagcg gcctgtactc tctgagcagc gtcgtgactg tgcccagcag cagcctggga 600

acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag
660

gtggaaccca agagctgcga caagacccac acctgtcccc cttgtcctgc ccctgaactg
720

ctgggaggcc cttccgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggacaccct gatgatcagc
780

cggacccccg aagtgacctg cgtggtggtg gatgtgtccc acgaggaccc tgaagtgaag
840

ttcaattggt acgtggacgg ggtggaagtg cataacgcca agaccaagcc cagagaggaa
900

cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgacag tgctgcacca ggactggctg
960

aacggcaaag agtacaagtg caaagtgtcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgagaaa
1020

accatcagca aggccaaggg ccagccccgc gaaccccagg tgtacacact gcccccaagc
1080

agggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tcgtgaaagg cttctacccc
1140

tccgatatcg ccgtggaatg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc
1200

ccccctgtgc tggacagcga cggctcattc ttcctgtact ccaagctgac cgtggacaag
1260

tcccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac
1320

cactacaccc agaagtccct gagcctgagc cccggctga
1359

<210> 40
<211> 645
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de LC mAb2

<400> 40
caggctgtcg tgacacagag cccctctagc ctgcctgcca gcgtgggcga cagagtgacc
60

atcacctgta gagccagcca ggacatccgg aacaacctgg gctggtatca gcagaagccc
120

ggcaaggccc ccgagagact gatctacggc accagcaatc tgcagtccgg cgtgcccagc
180

agattttccg gctctggcag cggcaccgag ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc
240

gaggacttcg ccacctacta ctgcctgcag cacaacagct acccccccac ctttggcaga
300

ggcaccaagg tggaaatcaa gcggacagtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccacct
360

agcgacgagc agctgaagtc cggcacagcc tctgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac
420

ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaatgccc tgcagtctgg caacagccag
480

gaaagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgtccag caccctgacc
540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc
600

ctgagcagcc ctgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gctga
645

<210> 41
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC mAb8

<400> 41

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Leu
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

```
Gly Gly Ser Glu Arg Glu Asp Gly Glu Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Glu Asp Thr Ser Ile Glu Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Met Ile Gly Gly Asn Gly Val Asp Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255
```

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly
450

<210> 42
<211> 1359
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de HC mAb8

<400> 42
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg
60

tcctgcaagg tgtccggcta catcctgagc aagctgagcg tgcactgggt gcgccaggcc
120

cctggaaaag gcctggaatg gatgggcggc agcgagcgcg aagatggcga gacagtgtac
180

gcccagaagt tccagggccg gatcagcctg accgaggaca cctctatcga gacagcctac
240

atggaactga gcagcctgtc cagcgaggat accgccgtgt actactgtgc caccggcggc
300

ttttggagca tgatcggcgg aaacggcgtg gactattggg gccagggaac cctcgtgacc
360

gtgtctagcg ccagcacaaa gggccccagc gtgttccctc tggcccctag cagcaagagc
420

acatctggcg gaacagccgc cctgggctgc ctcgtgaagg actactttcc cgagcccgtg
480

acagtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggcgtgc acacatttcc agccgtgctg
540

cagagcagcg gcctgtactc tctgagcagc gtcgtgactg tgcccagcag cagcctggga
600

acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag
660

gtggaaccca agagctgcga caagacccac acctgtcccc cttgtcctgc ccctgaactg
720

ctgggaggcc cttccgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggacaccct gtacatcacc
780

cgcgagcccg aagtgacctg cgtggtggtg gatgtgtccc acgaggaccc tgaagtgaag
840

ttcaattggt acgtggacgg ggtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa
900

cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgacag tgctgcacca ggactggctg
960

aacggcaaag agtacaagtg caaagtgtcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgagaaa
1020

accatcagca aggccaaggg ccagccccgc gaaccccagg tgtacacact gcccccaagc
1080

agggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tcgtgaaagg cttctacccc
1140

tccgatatcg ccgtggaatg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc
1200

ccccctgtgc tggacagcga cggctcattc ttcctgtact ccaagctgac cgtggacaag
1260

tcccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgtagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac
1320

cactacaccc agaagtccct gagcctgagc cccggctga
1359

<210> 43
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC mAb9

<400> 43

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Leu
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ser Glu Arg Glu Asp Gly Glu Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe

```
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Glu Asp Thr Ser Ile Glu Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Met Ile Gly Gly Asn Gly Val Asp Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
```

260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly
450

<210> 44

<211> 1359
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de HC mAb9

<400> 44
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg
60

tcctgcaagg tgtccggcta catcctgagc aagctgagcg tgcactgggt gcgccaggcc
120

cctggaaaag gcctggaatg gatgggcggc agcgagcgcg aagatggcga gacagtgtac
180

gcccagaagt tccagggccg gatcagcctg accgaggaca cctctatcga gacagcctac
240

atggaactga gcagcctgtc cagcgaggat accgccgtgt actactgtgc caccggcggc
300

ttttggagca tgatcggcgg aaacggcgtg gactattggg gccagggaac cctcgtgacc
360

gtgtctagcg ccagcacaaa gggccccagc gtgttccctc tggcccctag cagcaagagc
420

acatctggcg gaacagccgc cctgggctgc ctcgtgaagg actactttcc cgagcccgtg
480

acagtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggcgtgc acacatttcc agccgtgctg
540

cagagcagcg gcctgtactc tctgagcagc gtcgtgactg tgcccagcag cagcctggga
600

acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag
660

gtggaaccca agagctgcga caagacccac acctgtcccc cttgtcctgc ccctgaactg
720

ctgggaggcc cttccgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggacaccct gatgatcagc
780

cggacccccg aagtgacctg cgtggtggtg gatgtgtccc acgaggaccc tgaagtgaag
840

ttcaattggt acgtggacgg ggtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa
900

cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgacag tgctgcacca ggactggctg
960

aacggcaaag agtacaagtg caaagtgtcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgagaaa
1020

accatcagca aggccaaggg ccagccccgc gaaccccagg tgtacacact gcccccaagc
1080

agggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tcgtgaaagg cttctacccc
1140

tccgatatcg ccgtggaatg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc
1200

ccccctgtgc tggacagcga cggctcattc ttcctgtact ccaagctgac cgtggacaag
1260

tcccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgtagcgtgc tgcacgaggc cctgcacagc
1320

cactacaccc agaagtccct gagcctgagc cccggctga
1359

<210> 45
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC mAb10

<400> 45

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Leu
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ser Glu Arg Glu Asp Gly Glu Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Glu Asp Thr Ser Ile Glu Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Ile Ile Gly Gly Asn Gly Val Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly
450

<210> 46
<211> 1359
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de HC mAb10

<400> 46
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg
60

tcctgcaagg tgtccggcta catcctgagc aagctgagcg tgcactgggt gcgccaggcc
120

cctggaaaag gcctggaatg gatgggcggc agcgagcgcg aagatggcga gacagtgtac
180

gcccagaagt tccagggccg gatcagcctg accgaggaca cctctatcga gacagcctac
240

atggaactga gcagcctgtc cagcgaggat accgccgtgt actactgtgc caccggcggc
300

ttttggagca tcatcggcgg aaacggcgtg gactattggg gccagggaac cctcgtgacc
360

gtgtctagcg cctctacaaa gggccccagc gtgttccctc tggcccctag cagcaagagc
420

acatctggcg gaacagccgc cctgggctgc ctcgtgaagg actactttcc cgagcccgtg
480

acagtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggagtgc ataccttttcc agccgtgctg
540

cagagcagcg gcctgtactc tctgagcagc gtcgtgactg tgcccagcag cagcctggga
600

acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag
660

gtggaaccca agagctgcga caagacccac acctgtcccc cttgtcctgc ccctgaactg
720

ctgggaggcc cttccgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggacaccct gatgatcagc
780

cggacccccg aagtgacctg cgtggtggtg gatgtgtccc acgaggaccc tgaagtgaag
840

ttcaattggt acgtggacgg ggtggaagtg cataacgcca agaccaagcc cagagaggaa
900

cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgacag tgctgcacca ggactggctg
960

aacggcaaag agtacaagtg caaagtgtcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgagaaa
1020

accatcagca aggccaaggg ccagccccgc gaaccccagg tgtacacact gcccccaagc
1080

agggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tcgtgaaagg cttctacccc
1140

tccgatatcg ccgtggaatg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc
1200

ccccctgtgc tggacagcga cggctcattc ttcctgtact ccaagctgac cgtggacaag
1260

tcccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac
1320

cactacaccc agaagtccct gagcctgagc cccggctga
1359

<210> 47
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC mAb11

<400> 47

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Leu
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ser Glu Arg Glu Asp Gly Glu Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Glu Asp Thr Ser Ile Glu Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Met Ile Gly Gly Gln Gly Val Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly
450

<210> 48
<211> 1359
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de HC mAb11

<400> 48
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg
60

tcctgcaagg tgtccggcta catcctgagc aagctgagcg tgcactgggt gcgccaggcc
120

cctggaaaag gcctggaatg gatgggcggc agcgagcgcg aagatggcga gacagtgtac
180

gcccagaagt tccagggccg gatcagcctg accgaggaca cctctatcga gacagcctac
240

atggaactga gcagcctgtc cagcgaggat accgccgtgt actactgtgc caccggcggc
300

ttttggagca tgatcggcgg acagggcgtg gactattggg gccagggaac cctcgtgacc
360

gtgtctagcg cctctacaaa gggccccagc gtgttccctc tggcccctag cagcaagagc
420

acatctggcg gaacagccgc cctgggctgc ctcgtgaagg actactttcc cgagcccgtg
480

acagtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggagtgc ataccttttcc agccgtgctg
540

cagagcagcg gcctgtactc tctgagcagc gtcgtgactg tgcccagcag cagcctggga
600

acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag
660

gtggaaccca agagctgcga caagacccac acctgtcccc cttgtcctgc ccctgaactg
720

ctgggaggcc cttccgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggacaccct gatgatcagc
780

cggacccccg aagtgacctg cgtggtggtg gatgtgtccc acgaggaccc tgaagtgaag
840

ttcaattggt acgtggacgg ggtggaagtg cataacgcca agaccaagcc cagagaggaa
900

cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgacag tgctgcacca ggactggctg
960

aacggcaaag agtacaagtg caaagtgtcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgagaaa
1020

accatcagca aggccaaggg ccagccccgc gaaccccagg tgtacacact gcccccaagc
1080

agggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tcgtgaaagg cttctacccc
1140

tccgatatcg ccgtggaatg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc
1200

ccccctgtgc tggacagcga cggctcattc ttcctgtact ccaagctgac cgtggacaag
1260

tcccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac
1320

cactacaccc agaagtccct gagcctgagc cccggctga
1359

<210> 49
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC mAb12

<400> 49

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Leu
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ser Glu Arg Glu Asp Gly Glu Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Glu Asp Thr Ser Ile Glu Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Met Ile Gly Gly Asn Ala Val Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly
450

<210> 50
<211> 1359
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de HC mAb12

<400> 50
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg

60

tcctgcaagg tgtccggcta catcctgagc aagctgagcg tgcactgggt gcgccaggcc
120

cctggaaaag gcctggaatg gatgggcggc agcgagcgcg aagatggcga gacagtgtac
180

gcccagaagt tccagggccg gatcagcctg accgaggaca cctctatcga gacagcctac
240

atggaactga gcagcctgtc cagcgaggat accgccgtgt actactgtgc caccggcggc
300

ttttggagca tgatcggcgg aaacgccgtg gactattggg gccagggaac cctcgtgacc
360

gtgtctagcg cctctacaaa gggccccagc gtgttccctc tggcccctag cagcaagagc
420

acatctggcg gaacagccgc cctgggctgc ctcgtgaagg actactttcc cgagcccgtg
480

acagtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggagtgc ataccttttcc agccgtgctg
540

cagagcagcg gcctgtactc tctgagcagc gtcgtgactg tgcccagcag cagcctggga
600

acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag
660

gtggaaccca agagctgcga caagacccac acctgtcccc cttgtcctgc ccctgaactg
720

ctgggaggcc cttccgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggacaccct gatgatcagc
780

cggacccccg aagtgacctg cgtggtggtg gatgtgtccc acgaggaccc tgaagtgaag
840

ttcaattggt acgtggacgg ggtggaagtg cataacgcca agaccaagcc cagagaggaa
900

cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgacag tgctgcacca ggactggctg
960

aacggcaaag agtacaagtg caaagtgtcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgagaaa
1020

accatcagca aggccaaggg ccagccccgc gaaccccagg tgtacacact gcccccaagc
1080

agggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tcgtgaaagg cttctacccc
1140

tccgatatcg ccgtggaatg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc
1200

ccccctgtgc tggacagcga cggctcattc ttcctgtact ccaagctgac cgtggacaag
1260

tcccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac
1320

cactacaccc agaagtccct gagcctgagc cccggctga
1359

<210> 51
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC mAb13

<400> 51

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Leu
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ser Glu Arg Glu Asp Gly Glu Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Glu Asp Thr Ser Ile Glu Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Met Ile Gly Gly Gln Gly Val Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly
450

<210> 52
<211> 1359
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de HC mAb13

<400> 52
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg
60

tcctgcaagg tgtccggcta catcctgagc aagctgagcg tgcactgggt gcgccaggcc

120

cctggaaaag gcctggaatg gatgggcggc agcgagcgcg aagatggcga gacagtgtac
180

gcccagaagt tccagggccg gatcagcctg accgaggaca cctctatcga gacagcctac
240

atggaactga gcagcctgtc cagcgaggat accgccgtgt actactgtgc caccggcggc
300

ttttggagca tgatcggcgg acagggcgtg gactattggg gccagggaac cctcgtgacc
360

gtgtctagcg ccagcacaaa gggccccagc gtgttccctc tggcccctag cagcaagagc
420

acatctggcg gaacagccgc cctgggctgc ctcgtgaagg actactttcc cgagcccgtg
480

acagtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggcgtgc acacatttcc agccgtgctg
540

cagagcagcg gcctgtactc tctgagcagc gtcgtgactg tgcccagcag cagcctggga
600

acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag
660

gtggaaccca agagctgcga caagacccac acctgtcccc cttgtcctgc ccctgaactg
720

ctgggaggcc cttccgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggacaccct gtacatcacc
780

cgcgagcccg aagtgacctg cgtggtggtg gatgtgtccc acgaggaccc tgaagtgaag
840

ttcaattggt acgtggacgg ggtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa
900

cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgacag tgctgcacca ggactggctg
960

aacggcaaag agtacaagtg caaagtgtcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgagaaa
1020

accatcagca aggccaaggg ccagccccgc gaaccccagg tgtacacact gcccccaagc
1080

agggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tcgtgaaagg cttctacccc
1140

tccgatatcg ccgtggaatg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc
1200

ccccctgtgc tggacagcga cggctcattc ttcctgtact ccaagctgac cgtggacaag
1260

tcccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgtagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac
1320

cactacaccc agaagtccct gagcctgagc cccggctga
1359

<210> 53
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HC mAb14

<400> 53

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Leu
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ser Glu Arg Glu Asp Gly Glu Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Glu Asp Thr Ser Ile Glu Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Met Ile Gly Gly Gln Gly Val Asp Tyr
100 105 110

```
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        275                 280                 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    290                 295                 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305                 310                 315                 320
```

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly
450

<210> 54
<211> 1359
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico de HC mAb14

<400> 54
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg
60

tcctgcaagg tgtccggcta catcctgagc aagctgagcg tgcactgggt gcgccaggcc
120

cctggaaaag gcctggaatg gatgggcggc agcgagcgcg aagatggcga gacagtgtac

180

gcccagaagt tccagggccg gatcagcctg accgaggaca cctctatcga gacagcctac
240

atggaactga gcagcctgtc cagcgaggat accgccgtgt actactgtgc caccggcggc
300

ttttggagca tgatcggcgg acagggcgtg gactattggg gccagggaac cctcgtgacc
360

gtgtctagcg ccagcacaaa gggccccagc gtgttccctc tggcccctag cagcaagagc
420

acatctggcg gaacagccgc cctgggctgc ctcgtgaagg actactttcc cgagcccgtg
480

acagtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggcgtgc acacatttcc agccgtgctg
540

cagagcagcg gcctgtactc tctgagcagc gtcgtgactg tgcccagcag cagcctggga
600

acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag
660

gtggaaccca agagctgcga caagacccac acctgtcccc cttgtcctgc ccctgaactg
720

ctgggaggcc cttccgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggacaccct gatgatcagc
780

cggacccccg aagtgacctg cgtggtggtg gatgtgtccc acgaggaccc tgaagtgaag
840

ttcaattggt acgtggacgg ggtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa
900

cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgacag tgctgcacca ggactggctg
960

aacggcaaag agtacaagtg caaagtgtcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgagaaa
1020

accatcagca aggccaaggg ccagccccgc gaaccccagg tgtacacact gcccccaagc
1080

agggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tcgtgaaagg cttctacccc
1140

tccgatatcg ccgtggaatg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc
1200

cccccctgtgc tggacagcga cggctcattc ttcctgtact ccaagctgac cgtggacaag
1260

tcccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgtagcgtgc tgcacgaggc cctgcacagc
1320

cactacaccc agaagtccct gagcctgagc cccggctga
1359

<210> 55
<211> 329
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región constante de IgG1

<400> 55

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 56
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VH mAb10

<400> 56

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Leu
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ser Glu Arg Glu Asp Gly Glu Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Glu Asp Thr Ser Ile Glu Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Ile Ile Gly Gly Asn Gly Val Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 57
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VH mAb11

<400> 57

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Leu
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ser Glu Arg Glu Asp Gly Glu Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Glu Asp Thr Ser Ile Glu Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Met Ile Gly Gly Gln Gly Val Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 58
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VH mAb12

<400> 58

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Leu
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ser Glu Arg Glu Asp Gly Glu Thr Val Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Glu Asp Thr Ser Ile Glu Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Gly Phe Trp Ser Met Ile Gly Gly Asn Ala Val Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 59
<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> A región Fc de IgG1

<400> 59

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

<210> 60
<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> AAA región Fc de IgG1

<400> 60

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Ala Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Ala Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

<210> 61

<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> QL región Fc de IgG1

<400> 61

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

<210> 62
<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YTE región FC de IgG1

<400> 62

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

115 120 125

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

<210> 63
<211> 221
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LS región FC de IgG1

<400> 63

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

```
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65                  70                  75                  80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
                85                  90                  95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
            100                 105                 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
        115                 120                 125

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
    130                 135                 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145                 150                 155                 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
                165                 170                 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
            180                 185                 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His
        195                 200                 205

Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    210                 215                 220
```