

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 784**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

C07K 14/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2008 E 08850112 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2012 EP 2220116**

54 Título: **Composiciones y métodos para la terapia y diagnosis de la influenza**

30 Prioridad:

12.11.2007 US 987355 P

12.11.2007 US 987353 P

16.05.2008 US 53840 P

08.09.2008 US 95208 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2013

73 Titular/es:

THERACLONE SCIENCES, INC. (100.0%)

1124 Columbia Street, Suite 300

Seattle, WA 98104, US

72 Inventor/es:

GRANDEA, ANDRES G.;

KING, GORDON;

COX, THOMAS;

OLSEN, OLE;

MITCHAM, JENNIFER y

MOYLE, MATTHEW

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 395 784 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la terapia y diagnóstico de la influenza

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere generalmente a la terapia, diagnóstico y control de la infección por influenza. La invención se refiere más específicamente a anticuerpos específicos de la proteína de la matriz 2 de influenza completamente humanos aislados y a su fabricación y uso. Dichos anticuerpos son útiles en composiciones farmacéuticas para la prevención y el tratamiento de la influenza, y para la diagnóstico y el control de la infección por influenza.

Antecedentes de la Invención

10 El virus de la influenza infecta a 5-20% de la población y produce 30.000-50.000 muertes cada año en los Estados Unidos. Aunque la vacuna de la influenza es el método primario de prevención de la infección, solamente se encuentran disponibles cuatro fármacos antivirales en los Estados Unidos: amantadina, rimantadina, oseltamivir y zanamivir. En Diciembre de 2005, solamente se recomienda oseltamivir (TAMIFLU™) para el tratamiento de la influenza A debido a la resistencia creciente del virus a la amantadina y la rimantidina resultante de una sustitución de aminoácidos en la proteína M2 del virus.

15 La enfermedad causada por las infecciones virales de influenza A está tipificada por su naturaleza cíclica. La deriva y el desplazamiento antigénicos permiten que emerjan diferentes cepas A cada año. Sumado a esto, la amenaza de cepas altamente patogénicas que se introducen en la población general ha acentuado la necesidad de terapias novedosas para las infecciones por gripe. La fracción predominante de los anticuerpos neutralizadores está dirigida a las regiones polimorfas de las proteínas hemaglutinina y neuraminidasa. De este modo, dicho MAb neutralizador elegiría presumiblemente como diana solamente una o unas pocas cepas. Últimamente el centro de atención ha sido la proteína de la matriz 2 (M2) relativamente invariable. Potencialmente, un MAb neutralizador para M2 sería una terapia adecuada para todas las cepas de influenza A.

20 La proteína M2 se encuentra en un homotetrámero que forma un canal iónico y se piensa que ayuda en la pérdida de la envoltura del virus tras la entrada en la célula. Tras la infección, se puede encontrar M2 en abundancia en la superficie de la célula. Ésta se incorpora con posterioridad a la envoltura del virión, en donde solamente comprende aproximadamente 2% de la proteína de la envoltura total. El dominio extracelular de M2 (M2e) es corto, con los aminoácidos 2-24 amino terminales desplegados fuera de la célula. Los MAb anti-M2 se han dirigido hasta la fecha hacia esta secuencia lineal. De este modo, pueden no mostrar las propiedades de unión deseadas para la M2 expresada celularmente, incluyendo determinantes conformacionales sobre la M2 nativa.

25 Por ejemplo, el documento WO 2006/061723 describe el anticuerpo monoclonal Z3G1 totalmente humano obtenido de ratones transgénicos que albergan regiones del gen de la inmunoglobulina humana inmunizados con el polipéptido M2. El anticuerpo Z3G1 se une a un determinante dentro de la secuencia LLTEVETPIR y es terapéuticamente eficaz contra la infección por influenza A en ratones.

30 Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica, hace mucho tiempo, de nuevos anticuerpos que se unan a la M2 expresada en la célula y a los determinantes conformacionales sobre la M2 nativa.

Compendio de la Invención

35 La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales completamente humanos aislados dirigidos específicamente contra M2e y que tienen las secuencias CDR mostradas en la reivindicación 1. Opcionalmente, el anticuerpo se aísla de una célula B de un donante humano. Los anticuerpos monoclonales ilustrativos incluyen 8i10, 21B15 y 23K12 descritos en la presente memoria. Los anticuerpos son referidos respectivamente en la presente memoria como anticuerpos para huM2e. El anticuerpo para huM2e tiene una o más de las siguientes características: a) se une a un epítipo en el dominio extracelular del polipéptido del ectodominio de la matriz 2 (M2e) de un virus de influenza; b) se une a células infectadas con influenza A; o c) se une al virus influenza A.

40 El epítipo al que se une el anticuerpo para huM2e es un epítipo no lineal de un polipéptido M2. Preferiblemente, el epítipo incluye la región amino terminal del polipéptido M2e. Más preferiblemente el epítipo incluye total o parcialmente la secuencia de aminoácidos SLLTEV (SEQ ID NO: 42). Lo más preferiblemente, el epítipo incluye el aminoácido de las posiciones 2, 5 y 6 del polipéptido M2e cuando se numera de acuerdo con el SEQ ID NO: 1. El aminoácido de la posición 2 es una serina; el de la posición 5 es una treonina; y el de la posición 6 es un ácido glutámico.

45 Un anticuerpo para huM2e contiene una cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos de los SEQ ID NOS: 44 o 50 y una cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos de los SEQ ID NOS: 46 o 52. Las tres CDR de la cadena pesada incluyen las secuencias de aminoácidos NYYWS (SEQ ID NO: 72), FIYYGGNTKYNPSLKS (SEQ ID NO: 74), y ASCSGGYCILD (SEQ ID NO: 76), o SNYMS (SEQ ID NO: 103), VIYSGGSTYYADSVK (SEQ ID NO: 105), y CLSRMRGYGLDV (SEQ ID NO: 107) (determinadas mediante el método

de Kabat) y una cadena ligera con tres CDR que incluyen las secuencias de aminoácidos RASQNIYKYLN (SEQ ID NO: 59), AASGLQS (SEQ ID NO: 61), y QQSYSPPLT (SEQ ID NO: 63); o RTSQSISSYLN (SEQ ID NO: 92), AASSLQSGVPSRF (SEQ ID NO: 94), QQSYSPMPA (SEQ ID NO: 96) (determinadas mediante el método de Kabat). El anticuerpo se une a M2e.

- 5 En otro aspecto la invención proporciona una composición que incluye un anticuerpo para huM2e de acuerdo con la invención. En varios aspectos la composición incluye adicionalmente un fármaco anti-viral, un inhibidor de la entrada viral o un inhibidor del anclaje viral. El fármaco anti-viral es por ejemplo un inhibidor de neuraminidasa, un inhibidor de HA, un inhibidor de ácido siálico o un inhibidor del canal iónico M2. El inhibidor del canal iónico M2 es por ejemplo amantadina o rimantadina. El inhibidor de neuraminidasa es por ejemplo zanamivir, o fosfato de oseltamivir. En un aspecto adicional la composición incluye adicionalmente un segundo anticuerpo anti-influenza A.

En un aspecto adicional los anticuerpos para huM2e de acuerdo con la invención están conectados operablemente a un agente terapéutico o una marca detectable.

- 15 También se incluye en la invención un método para determinar la presencia de una infección por el virus de la influenza en un paciente, poniendo en contacto una muestra biológica obtenida del paciente con un anticuerpo de la invención; detectando la cantidad del anticuerpo que se une a la muestra biológica; y comparando la cantidad de anticuerpo que se une a la muestra biológica con un valor de control.

La invención proporciona adicionalmente un kit de diagnóstico que comprende un anticuerpo para huM2e.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones y se describen por medio de las mismas.

20 Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 muestra la unión de tres anticuerpos de la presente invención y el anticuerpo de control hu14C2 a células HEK 293 transfectadas con un constructo de expresión o vector de control de M2, en presencia o ausencia de péptido M2 libre.

- 25 Las Figuras 2A y B son gráficos que muestran la unión del anticuerpo monoclonal humano a influenza A/Puerto Rico/8/32.

La Figura 3A es un diagrama que muestra secuencias de aminoácidos de dominios extracelulares de variantes de M2.

Las Figuras 3B y C son diagramas de barras que muestran la unión del anticuerpo anti-influenza monoclonal humano que se une a variantes de M2 mostradas en la Figura 3A.

- 30 Las Figuras 4A y B son diagramas de barras que muestran la unión del anticuerpo anti-influenza monoclonal humano que se une a péptidos M2 sometidos a mutagénesis de barrido con alanina.

La Figura 5 es una serie de diagramas de barras que muestran la unión de los MAb 8i10 y 23K12 a la proteína M2 que representa la secuencia A/HK/483/1997 de la cepa de influenza que fue expresada establemente en la línea de células CHO DG44.

- 35 La Figura 6A es un diagrama que muestra la unión por reactividad cruzada de anticuerpos anti-M2 a péptidos M2 variantes.

La Figura 6B es un diagrama que muestra la actividad de unión de anticuerpos para M2 a péptidos M2 truncados.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la supervivencia de ratones infectados con influenza tratados con anticuerpos monoclonales anti-influenza humanos.

- 40 La Figura 8 es una ilustración que demuestra que los anticuerpos anti-M2 se unen a una región altamente conservada en el extremo N de M2e.

La Figura 9 es un gráfico que muestra los clones de rHMAb anti-M2 de sobrenadante bruto unido a influenza en un ELISA, mientras el mAb anti-M2e de control 14C2 no se unía fácilmente al virus.

- 45 La Figura 10 es una serie de fotografías que muestra rHMAb anti-M2 unidos a células infectadas con influenza. Las células MDCK fueron infectadas o no con influenza A/PR/8/32 y se sometió a ensayo la unión de Ab de sobrenadante bruto 24 horas más tarde. Los datos se recabaron del escáner de placa FMAT.

- 50 La Figura 11 es un gráfico que muestra clones de rHMAb anti-M2 de sobrenadante bruto unidos a células transfectadas con proteínas M2 de los subtipos de influenza H3N2, HK483, y VN 1203. Los plásmidos que codifican los ADNc completos de M2 correspondientes a las cepas de influenza H3N2, HK483, y VN 1203, así como un control plasmídico simulado, fueron transfectados transitoriamente en células 293. Los mAb 14C2, 8i10, 23K12, y

21B15 se sometieron a ensayo para determinar la unión a los transfectantes, y fueron detectados con un anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado con AF647. Se muestran las intensidades de fluorescencia medias del mAB específico unido después del análisis FACS.

Descripción Detallada

- 5 La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales completamente humanos aislados específicos contra el dominio extracelular del polipéptido de la matriz 2 (M2) y que tienen las secuencias CDR definidas en la reivindicación 1. Los anticuerpos son referidos respectivamente en la presente memoria como anticuerpos para huM2e.
- 10 M2 es una proteína transmembrana de 96 aminoácidos presente como homotetrámero sobre la superficie del virus influenza y en las células infectadas viralmente. M2 contiene un ectodominio de 23 aminoácidos (M2e) que está altamente conservado en todas las cepas de influenza A. Se han producido pocos cambios de aminoácidos desde la cepa pandémica de 1918, por lo tanto M2e es una diana atractiva para las terapias contra la influenza. En estudios anteriores, se obtuvieron anticuerpos monoclonales específicos para el ectodominio de M2 (M2e) tras las inmunizaciones con un péptido correspondiente a la secuencia lineal de M2e. En contraste, la presente invención
- 15 proporciona un procedimiento novedoso por medio del cual la M2 completa es expresada en líneas celulares, lo que permite la identificación de anticuerpos humanos que se unen a esta M2e expresada en las células. Se ha demostrado que los anticuerpos para huM2e se unen a determinantes conformacionales sobre las células transfectadas con M2, así como M2 nativa, o bien sobre células infectadas con influenza, o bien sobre el propio virus. Los anticuerpos para huM2e no se unían al péptido M2e lineal, pero se unen a diversas variantes de M2
- 20 naturales, también expresadas tras la transfección de ADNc en líneas celulares. Por lo tanto, esta invención ha permitido la identificación y producción de anticuerpos monoclonales humanos que muestran una especificidad novedosa para una gama muy amplia de cepas de virus de influenza A. Estos anticuerpos se pueden utilizar diagnósticamente para identificar la infección por influenza A y terapéuticamente para tratar la infección por influenza A.
- 25 Los anticuerpos para huM2e de la invención tienen una o más de las siguientes características: el anticuerpo para huM2e se une a a) un epítipo en el dominio extracelular del polipéptido de la matriz 2 (M2) de un virus de influenza; b) se une a células infectadas con influenza A; y/o c) se une al virus de la influenza A (es decir, viriones). Los anticuerpos para huM2e de la invención eliminan las células infectadas con influenza por medio de mecanismos efectores inmunitarios tales como ADCC y promueve el aclaramiento viral directo uniéndose a los viriones de la
- 30 influenza. Los anticuerpos para huM2e de la invención se unen a la región amino terminal del polipéptido M2e. Preferiblemente, los anticuerpos para huM2e de la invención se unen a la región amino terminal del polipéptido M2e en donde el residuo de metionina N terminal está ausente. Las secuencias de M2e ilustrativas incluyen aquellas secuencias enumeradas en la Tabla I de más abajo.

Tabla I

Tipo	Nombre	Subtipo	Secuencia de M2E	SEQ ID NO
A	BREVI G MISSION.1.1918	H1N1	MSLLTEVETPTRNEWGCRCNDSSD	SEQ ID NO: 1
A	FORT MONMOUTH.1.1947	H1N1	MSLLTEVETPTKNEWGCRCNDSSD	SEQ ID NO: 2
A	.SINGAPORE.02.2005	H3N2	MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	SEQ ID NO: 3
A	WISCONSIN.10.98	H1N1	MSLLTEVETPIRNGWECKCNDSSD	SEQ ID NO: 4
A	WISCONSIN.301.1976	H1N1	MSLLTEVETPIRSEWGCRCNDSSD	SEQ ID NO: 5
A	PANAMA.1.66	H2N2	MSFLPEVETPIRNEWGCRCNDSSD	SEQ ID NO: 6
A	NEW YORK.321.1999	H3N2	MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSN	SEQ ID NO: 7
A	CARACAS.1.71	H3N2	MSLLTEVETPIRKEWGCRCNDSSD	SEQ ID NO: 8
A	TAIWAN.3.71	H3N2	MSFLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	SEQ ID NO: 9
A	WUHAN.359.95	H3N2	MSLPTEVETPIRSEWGCRCNDSSD	SEQ ID NO: 10
A	HONG KONG.1144.99	H3N2	MSLLPEVETPIRNEWGCRCNDSSD	SEQ ID NO: 11
A	HONG KONG.1180.99	H3N2	MSLLPEVETPIRNGWGCRCNDSSD	SEQ ID NO: 12
A	HONG KONG.1774.99	H3N2	MSLLTEVETPTRNGWECRCGSSD	SEQ ID NO: 13
A	NEW YORK.217.02	H1N2	MSLLTEVETPIRNEWYRCNDSSD	SEQ ID NO: 14
A	NEW YORK.300.2003	H1N2	MSLLTEVETPIRNEWYRCSDSSD	SEQ ID NO: 15

Tipo	Nombre	Subtipo	Secuencia de M2E	SEQ ID NO
A	SWINE.SPAIN.54008.20 04	H3N2	MSLLTEVETPTRNGWECRYSDSSD	SEQ ID NO: 16
A	GUANGZHOU.333.99	H9N2	MSFLTEVETLTRNGWECRCSDSSD	SEQ ID NO: 17
A	HONG KONG.1073.99	H9N2	MSLLTEVETLTRNGWECKCRDSSD	SEQ ID NO: 18
A	HONG KONG.1.68	H3N2	MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	SEQ ID NO: 19
A	SWINE.HONG KONG.126.1982	H3N2	MSLLTEVETPIRSEWGCRCNDSGD	SEQ ID NO: 20
A	NEW YORK.703.1995	H3N2	MSLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD	SEQ ID NO: 21
A	SWINE.QUEBEC.192.81	H1N1	MSLPTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	SEQ ID NO: 22
A	PUERTO RICO.8.34	H1N1	MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD	SEQ ID NO: 23
A	HONG KONG.485.97	H5N1	MSLLTEVDTLTRNGWGCRCDSSD	SEQ ID NO: 24
A	HONG KONG.542.97	H5N1	MSLLTEVETLTKNWGCRCSDSSD	SEQ ID NO: 25
A	SILKY CHICKEN.SHANTOU.1826 .2004	H9N2	MSLLTEVETPTRNGWECKCDSSD	SEQ ID NO: 26
A	CHICKEN.TAIWAN.0305. 04	H6N1	MSLLTEVETHTRNGWECKCDSSD	SEQ ID NO: 27
A	QUAIL.ARKANSAS.16309 - 7.94	H7N3NSA	MSLLTEVKTPTRNGWECKCDSSD	SEQ ID NO: 28
A	HONG KONG.486.97	H5N1	MSLLTEVETLTRNGWGCRCDSSD	SEQ ID NO: 29
A	CHICKEN.PENNSYLVANIA .13552-1.98	H7N2NSB	MSLLTEVETPTRDGWECKCDSSD	SEQ ID NO: 30
A	CHICKEN.HEILONGJIANG .48.01	H9N2	MSLLTEVETPTRNGWGCRCDSSD	SEQ ID NO: 31
A	SWINE.KOREA.S5.2005	H1N2	MSLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD	SEQ ID NO: 32
A	HONG KONG.1073.99	H9N2	MSLLTEVETLTRNGWECKCDSSD	SEQ ID NO: 33
A	WISCONSIN.3523.88	H1N1	MSLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD	SEQ ID NO: 34
A	X-31 VACCINE STRAIN	H3N2	MSFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD	SEQ ID NO: 35
A	CHICKEN.ROSTOCK.8.19 34	H7N1	MSLLTEVETPTRNGWECRCNDSSD	SEQ ID NO: 36
A	ENVIRONMENT.NEW YORK.16326-1.2005	H7N2	MSLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD	SEQ ID NO: 37
A	INDONESIA.560H.2006	H5N1	MSLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD	SEQ ID NO: 38
A	CHICKEN.HONG KONG.SF1.03	H9N2	MSLLTGVEHTRNGWGCKCDSSD	SEQ ID NO: 39
A	CHICKEN.HONGKONG.YU4 27.03	H9N2	MSLLPEVETHTRNGWGCRCDSSD	SEQ ID NO: 40

En una realización, los anticuerpos para huM2e de la invención se unen a una M2e que incluye totalmente o parcialmente los residuos de aminoácido desde la posición 2 a la posición 7 de M2e cuando se numera de acuerdo con el SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, los anticuerpos para huM2e de la invención se unen totalmente o parcialmente a la secuencia de aminoácidos SLLTEVET (SEQ ID NO: 41). Lo más preferiblemente, los anticuerpos para HuM2e de la invención se unen totalmente o parcialmente a la secuencia de aminoácidos SLLTEV (SEQ ID NO: 42). Preferiblemente, los anticuerpos para HuM2e de la invención se unen al epítipo no lineal de la proteína M2e. Por ejemplo, los anticuerpos para huM2e se unen a un epítipo que comprende las posiciones 2, 5, y 6 del polipéptido para M2e cuando se numeran de acuerdo con el SEQ ID NO: 1 en donde el aminoácido a) de la posición 2 es una serina; b) de la posición 5 es una treonina; y c) de la posición 6 es un ácido glutámico. Los anticuerpos monoclonales para huM2e ilustrativos que se unen a este epítipo son los anticuerpos 8110, 21B15 o 23K12 descritos en la presente memoria.

El anticuerpo 8110 incluye una región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 44) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada más abajo en el SEQ ID NO: 43, y una región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 46)

codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en el SEQ ID NO: 45.

Los aminoácidos que abarcan las CDR definidas por Chothia, C. et al. (1989, Nature, 342: 877-883) están subrayados y los definidos por Kabat E.A. et al. (1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edic., Publicación NIH núm. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services) se destacan en negrita en las secuencias de más abajo.

Las CDR de la cadena pesada del anticuerpo 8I10 tienen las siguientes secuencias por la definición de Kabat: NYYWS (SEQ ID NO: 72), FIYYGGNTKYNPS LKS (SEQ ID NO: 74) y ASCSGGYCILD (SEQ ID NO: 76). Las CDR de la cadena ligera del anticuerpo 8I10 tienen las siguientes secuencias por la definición de Kabat: RASQNIYKYLN (SEQ ID NO: 59), AA SGLQS (SEQ ID NO: 61) y QQSYPPLT (SEQ ID NO: 63).

Las CDR de la cadena pesada del anticuerpo 8I10 tienen las siguientes secuencias por la definición de Chothia: GSSISN (SEQ ID NO: 109), FIYYGGNTK (SEQ ID NO: 110) y ASCSGGYCILD (SEQ ID NO: 76). Las CDR de la cadena ligera del anticuerpo 8I10 tienen las siguientes secuencias por la definición de Chothia: RASQNIYKYLN (SEQ ID NO: 59), AASGLQS (SEQ ID NO: 61) y QQSYPPLT (SEQ ID NO: 63).

>Secuencia de nucleótidos de VH de 8I10: (SEQ ID NO: 43)

CAGGTGCAATTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCAC
CTGCACTGTCTCTGGTTTCGTCCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGTCCCCAG
GGAAGGGAAGTGGAGTGGATTGGGTTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAGTACAATCCCCTCC
CTCAAGAGCCGCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAAGAGTCAGGTCTCCCTGACGATGAG
CTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTTCTGTGCGAGAGCGTCTTGTAGTGGTGGTT
ACTGTATCCTTGACTACTGGGGCCAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG

>Secuencia de aminoácidos de VH de 8I10: (SEQ ID NO: 44)

Kabat Negrita, Chothia subrayado

Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T
C	T	V	S	G	S	S	I	S	N	Y	Y	W	S	W	I	R	Q	S	P	G
K	G	L	E	<u>W</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	F	I	Y	Y	G	G	N	T	K	Y	N	P	S	L
K	S	R	V	T	I	S	Q	D	T	S	K	S	Q	V	S	L	T	M	S	S
V	T	A	A	E	S	A	V	Y	F	C	A	R	A	S	C	S	G	G	Y	C
<u>I</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S							

>Secuencia de nucleótidos de VL de 8I10: (SEQ ID NO: 45)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGCCGGGCGAGTCAGAACATTTACAAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGA
AAGCCCCTAAGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTC
AGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTT
TGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAGGG
TGGAGATCAAAC

>Secuencia de aminoácidos de VL de 8I10: (SEQ ID NO: 46)

Kabat Negrita, Chothia subrayado

D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I
T	C	R	A	S	Q	N	I	Y	K	Y	L	N	W	Y	Q	Q	R	P	G	K
A	P	K	G	L	I	S	A	A	S	G	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S
G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	T	S	L	Q	P	E	D	F	A
T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	F	G	G	G	T	R	V	E
I	K																			

El anticuerpo 21B15 incluye una región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 44) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada más abajo en el SEQ ID NO: 47, y la región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 46) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en el SEQ ID NO: 48.

Los aminoácidos que abarcan las CDR definidas por Chothia et al. 1989, están subrayados y las definidas por Kabat et al., 1991 están destacados en negrita en las secuencias de más abajo.

Las CDR de la cadena pesada del anticuerpo 21B15 tienen las siguientes secuencias por la definición de Kabat:

NYWWS (SEQ ID NO: 72), FIYYGGNTKYNPSLKS (SEQ ID NO: 74) y ASCSGGYCILD (SEQ ID NO: 76). Las CDR de la cadena ligera del anticuerpo 21B15 tienen las siguientes secuencias por la definición de Kabat: RASQNIYKYLN (SEQ ID NO: 59), AASGLQS (SEQ ID NO: 61) y QQSYSPPLT (SEQ ID NO: 63).

- 5 Las CDR de la cadena pesada del anticuerpo 21B15 tienen las siguientes secuencias por la definición de Chothia: GSSISN (SEQ ID NO: 111), FIYYGGNTK (SEQ ID NO: 110) y ASCSGGYCILD (SEQ ID NO: 76). Las CDR de la cadena ligera del anticuerpo 21B15 tienen las siguientes secuencias por la definición de Chothia: RASQNIYKYLN (SEQ ID NO: 59), AASGLQS (SEQ ID NO: 61) y QQSYSPPLT (SEQ ID NO: 63).

>Secuencia de nucleótidos de VH de 21B15: (SEQ ID NO: 47)

CAGGTGCAATTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCAC
CTGCACTGTCTCTGGTTCGTCCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGTCCCCAG
GGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAGTACAATCCCTCC
CTCAAGAGCCGCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAAGAGTCAGGTCTCCCTGACGATGAG
CTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTTCTGTGCGAGAGCGTCTTGTAGTGGTGGTT
ACTGTATCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCG

- 10 >Secuencia de aminoácidos de VH de 21B15: (SEQ ID NO: 44)

Kabat Negrita, Chothia subrayado

Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T
C	T	V	S	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	N	Y	Y	W	S	W	I	R	Q	S	P	G
K	G	L	E	<u>W</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	F	I	Y	Y	G	G	N	T	K	Y	N	P	S	L
K	S	R	V	T	I	S	<u>Q</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>S</u>
V	T	A	A	E	S	A	V	Y	F	C	A	R	A	S	C	S	G	G	Y	C
I	L	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	<u>S</u>							

>Secuencia de nucleótidos de VL de 21B15: (SEQ ID NO: 48)

GACATCCAGGTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGCCGCGCGAGTCAGAACATTTACAAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGA
AAGCCCCTAAGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTT
AGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTT
TGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAGGG
TGGATATCAAAC

- 15 >Secuencia de aminoácidos de VL de 21B15: (SEQ ID NO: 46)

Kabat Negrita, Chothia subrayado

D	I	Q	V	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I
T	C	R	A	S	Q	N	I	Y	K	Y	L	N	W	Y	Q	Q	R	P	G	K
A	P	K	G	L	I	S	A	A	S	G	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S
G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	T	S	L	Q	P	E	D	F	A
T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	F	G	G	G	T	R	V	D
I	K																			

- 20 El anticuerpo 23K12 incluye una región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 50) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada más abajo en el SEQ ID NO: 49, y una región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 52) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en el SEQ ID NO: 51.

Los aminoácidos que abarcan las CDR definidas por Chothia et al., 1989 están subrayados y las definidas por Kabat et al., 1991 están destacados en negrita en las secuencias de más abajo.

- 25 Las CDR de la cadena pesada del anticuerpo 23K12 tienen las siguientes secuencias por la definición de Kabat: SNYMS (SEQ ID NO: 103), VIYSGGSTYYADSVK (SEQ ID NO: 105) y CLSRMRGYGLDV (SEQ ID NO: 107). Las CDR de la cadena ligera del anticuerpo 23K12 tienen las siguientes secuencias por la definición de Kabat: RTSQSISSYLN (SEQ ID NO: 92), AASSLQSGVPSRF (SEQ ID NO: 94) y QQSYSPPLT (SEQ ID NO: 96).

Las CDR de la cadena pesada del anticuerpo 23K12 tienen las siguientes secuencias por la definición de Chothia: GFTVSSN (SEQ ID NO: 112), VIYSGGSTY (SEQ ID NO: 113) y CLSRMRGYGLDV (SEQ ID NO: 107). Las CDR de

la cadena ligera del anticuerpo 23K12 tienen las siguientes secuencias por la definición de Chothia: RTSQSISSYLN (SEQ ID NO: 92), AASSLQSGVPSRF (SEQ ID NO: 94) y QQSYMPA (SEQ ID NO: 96).

>Secuencia de nucleótidos de VH de 23K12: (SEQ ID NO: 49)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAATCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTACCGTCAGTAGCAACTACATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCC
GTGAAGGGCAGATTCTCCTTCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACACAGTGTTTCTTCAAATGAA
CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATGTCTGAGCAGGATGCGGG
GTTACGGTTTACAGCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCG

5 >Secuencia de ácido nucleico de VH de 23K12: (SEQ ID NO: 50)

Kabat Negrita, Chothia subrayado

E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	I	S
C	A	A	S	G	F	T	V	S	S	N	Y	M	S	W	V	R	Q	A	P	G
K	G	L	E	W	V	S	<u>V</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>V</u>
K	G	R	F	S	F	S	R	D	N	S	K	N	T	V	F	L	Q	M	N	S
L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>M</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>
<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S							

>Secuencia de nucleótidos de VL de 23K12: (SEQ ID NO: 51)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGCCGGACAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
AAGCCCCATAAATCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTC
AGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGATTT
TGCAACCTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTATGCCTGCCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG
AGATCAAA

10

>Secuencia de aminoácidos de VL de 23K12: (SEQ ID NO: 52)

Kabat Negrita, Chothia subrayado

D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I
T	C	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	W	Y	Q	Q	K	P	G	K
A	P	K	L	L	I	Y	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>F</u>	S
G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	G	L	Q	P	E	D	F	A
T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>P</u>	<u>A</u>	F	G	Q	G	T	K	L	E	I

A menos que se definan de otro modo, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que son comúnmente concebidos por un experto en la técnica. Adicionalmente, a menos que se requiera de otro modo por el contexto, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, y química e hibridación de proteínas y oligo- o poli-nucleótidos descritas en la presente memoria son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se utilizan mecanismos convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación de tejidos (*p. ej.*, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y los mecanismos de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se llevan a cabo comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de virología, inmunología, microbiología, biología molecular y mecanismos de ADN recombinante en el ámbito del conocimiento práctico de la técnica, muchos de los cuales se describen más abajo con fines ilustrativos. Dichos mecanismos se explican a fondo en la bibliografía. Véanse, *p. ej.*, Sambrook, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Edición, 1989); Maniatis et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984).

Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y los mecanismos de laboratorio de, la química analítica, la química sintética orgánica, y la química médica y farmacéutica descritos en la presente memoria son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Los mecanismos convencionales se utilizan para las

síntesis químicas, los análisis químicos, la preparación farmacéutica, la formulación y la liberación, y el tratamiento de pacientes.

Las siguientes definiciones son útiles para comprender la presente invención:

5 El término "anticuerpo" (Ab) según se utiliza en la presente memoria incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (*p. ej.*, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) se utiliza indistintamente con "anticuerpo" en la presente memoria.

10 Un "anticuerpo aislado" es aquel que ha sido separado y/o recuperado de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían en los usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purifica: (1) hasta más de 95% en peso de anticuerpo determinado mediante el método de Lowry, y lo más preferiblemente más de 99% en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria; o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por medio de al menos una etapa de purificación.

20 La unidad del anticuerpo de cuatro cadenas básicas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y por lo tanto contiene 10 sitios de unión a antígenos, mientras los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las 4 unidades de cadenas básicas junto con la cadena J. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas tiene por lo general aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L está conectada a una cadena H por medio de un enlace disulfuro covalente, mientras las dos cadenas H están conectadas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena H tiene en el extremo N, un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alienado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que residuos de aminoácidos concretos forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L juntos forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, *p. ej.*, Basic and Clinical Immunology, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba 1. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, página 71, y Capítulo 6.

35 La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede ser asignada a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes (C_L). Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, que tienen cadenas pesadas denominadas alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases basándose en diferencias relativamente minoritarias en la secuencia y la función de C_H , *p. ej.*, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, y IgA2.

45 El término "variable" hace referencia al hecho de que ciertos segmentos de los dominios V difieren considerablemente en la secuencia entre anticuerpos. El dominio V media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo concreto para su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida en el tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En lugar de eso, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración en lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura en lámina β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas en íntima proximidad por medio de las FR y, con las regiones marco de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

60 El término "región hipervariable" cuando se utiliza en la presente memoria hace referencia a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende generalmente residuos de aminoácido de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (*p. ej.*, en

torno a aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el V_L, y en torno a aproximadamente 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el V_H cuando se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)); y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (p. ej., los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el V_L, y 26-32 (H1), 52-56 (H2) y 95-101 (H3) en el V_H cuando se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Chothia; Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)); y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable"/CDR (p. ej., los residuos 27-38 (L1), 56-65 (L2) y 105-120 (L3) en el V_L, y 27-38 (H1), 56-65 (H2) y 105-120 (H3) en el V_H cuando se numeran de acuerdo con el sistema de numeración IMGT; Lefranc, M.P. et al. Nucl. Acids Res. 27:209-212 (1999), Ruiz, M. et al. Nucl. Acids Res. 28:219-221 (2000)). Opcionalmente el anticuerpo tiene inserciones asimétricas en uno o más de los siguientes puntos 28, 36 (L1), 63, 74-75 (L2) y 123 (L3) en el V_L, y 28, 36 (H1), 63, 74-75 (H2) y 123 (H3) en el V_H cuando se numeran de acuerdo con AHO; Honneger, A. and Plunkthun, A. J. Mol. Biol. 309:657-670 (2001)).

Por "residuo de ácido nucleico de la línea germinal" se quiere significar el residuo de ácido nucleico que existe naturalmente en un gen de la línea germinal que codifica una región constante o variable. "Gen de la línea germinal" es el ADN encontrado en una célula germinal (es decir, una célula destinada a convertirse en un óvulo o en un espermatozoide). Una "mutación de la línea germinal" hace referencia a un cambio hereditario en un ADN concreto que se ha producido en una célula germinal o en el cigoto en la fase de una sola célula, y cuando se transmite a un vástago, dicha mutación se incorpora a cada célula del organismo. Una mutación de la línea germinal contrasta con una mutación somática que es adquirida por una sola célula del organismo. En algunos casos, los nucleótidos de una secuencia de ADN de la línea germinal que codifica una región variable son mutados (es decir, una mutación somática) y sustituidos por un nucleótido diferente.

El término "anticuerpo monoclonal" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen de forma natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos a un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que pueden ser sintetizados sin estar contaminados por otros anticuerpos. No se debe considerar que el modificador "monoclonal" requiera la producción del anticuerpo mediante algún método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención se pueden preparar mediante la metodología del hibridoma descrita por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o se pueden preparar utilizando métodos de ADN recombinante en células bacterianas, eucarióticas o vegetales (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567). Los "anticuerpo monoclonales" también se pueden aislar de genotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas por Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen "anticuerpos quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica y homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a un clase o subclase de anticuerpo concreta, mientras el resto de la cadena o las cadenas son idénticas u homólogas a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (véanse la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). La presente descripción proporciona secuencias de unión al antígeno en el dominio variable derivadas de anticuerpos humanos. Por consiguiente, los anticuerpos quiméricos de principal interés en la presente memoria incluyen anticuerpos que tienen una o más secuencias de unión al antígeno humanas (p. ej., CDR) y que contienen una o más secuencias derivadas de un anticuerpo no humano, p. ej., una secuencia de FR o de la región C. Además, los anticuerpos quiméricos de principal interés en la presente memoria incluyen aquellos que comprenden una secuencia de unión al antígeno en el dominio variable humano de una clase o subclase de anticuerpo y otra secuencia, p. ej., secuencia de FR o de la región C, derivada de otra clase o subclase de anticuerpo. Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria también incluyen aquellos que contienen secuencias de unión al antígeno en el dominio variable relacionadas con las descritas en la presente memoria o derivadas de una especie diferente, tal como un primate no humano (p. ej., Mono del Viejo Mundo, Simio, etc). Los anticuerpos quiméricos también incluyen anticuerpos primatizados y humanizados.

Además, los anticuerpos quiméricos pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. Para más detalles, véanse Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

Generalmente se considera que un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo humano que tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácido no humanos son referidos a menudo como residuos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable "importado". La humanización se realiza tradicionalmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536

(1988)), sustituyendo por secuencias de la región hipervariable importada las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567) en donde se ha sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto

5 Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que contiene solamente secuencias presentes en un anticuerpo producido naturalmente por un ser humano. Sin embargo, según se utiliza en la presente memoria, los anticuerpos humanos pueden comprender residuos o modificaciones no encontrados en un anticuerpo humano de origen natural, incluyendo aquellas modificaciones y secuencias variantes descritas en la presente memoria. Estas se realizan típicamente para perfeccionar o intensificar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo.

10 Un anticuerpo "intacto" es aquel que comprende un sitio de unión a antígeno así como un dominio C_L y al menos los dominios constantes de la cadena pesada, $C_H 1$, $C_H 2$ y $C_H 3$. Los dominios constantes pueden ser dominios constante de la secuencia nativa (*p. ej.*, dominios constantes de la secuencia nativa humana) o una secuencia de aminoácidos variante de la misma. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

15 Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, y Fv; los diacuerpos; los anticuerpos lineales (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.641.870; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); las moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y los anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

20 La expresión "fragmento o análogo funcional" de un anticuerpo es un compuesto que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo completo. Por ejemplo, un fragmento o análogo funcional de un anticuerpo anti-IgE es el que se puede unir a una inmunoglobulina IgE de tal manera que evita o reduce sustancialmente la idoneidad de dicha molécula para tener la capacidad de unirse al receptor de alta afinidad, $Fc\epsilon RI$.

25 La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad para cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada ($C_H 1$). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es *decir*, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento grande $F(ab')_2$ que corresponde más o menos a dos fragmentos Fab conectados por disulfuro que tienen una actividad de unión al antígeno divalente y todavía son capaces de presentar reacción cruzada con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener unos pocos residuos más en el extremo carboxi del dominio $C_H 1$ incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente memoria para un Fab' en el que el residuo o los residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ originalmente fueron producidos como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas de la bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

35 El fragmento "Fc" comprende las porciones carboxi terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan por medio de las secuencias de la región Fc, cuya región es también la parte reconocida por los receptores de Fc (FcR) encontrados en ciertos tipos de células.

40 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión al antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de la región variable de una cadena pesada y una ligera en asociación íntima, no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (tres bucles de cada cadena H y L) que aportan los residuos de aminoácido para la unión al antígeno y confieren al anticuerpo la especificidad para el antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para el antígeno) tiene la capacidad de reconocer el antígeno y unirse a él, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

45 Los "Fv de cadena sencilla" también abreviados como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios del anticuerpo V_H y V_L conectados en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido sFv comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv, véanse Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moorc eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, más abajo.

50 El término "diacuerpos" hace referencia a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con conectores cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L de manera que se logra un emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, dando como resultado un fragmento bivalente, es *decir*, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígenos. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "entrecruzados" en los cuales los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen con más detalle, por ejemplo, en la Patente Europea EP Núm. 404.097; el documento WO 93/11161; y Hollinger et

al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Según se utiliza en la presente memoria, un anticuerpo que se "internaliza" es uno que es absorbido por (*es decir*, entra en) la célula tras la unión a un antígeno en una célula de mamífero (*p. ej.*, un polipéptido o receptor de la superficie celular). El anticuerpo internalizante incluirá por supuesto fragmentos de anticuerpos, anticuerpos humanos o quiméricos, y productos conjugados de anticuerpos. Para ciertas aplicaciones terapéuticas, se contempla la internalización *in vivo*. El número de moléculas de anticuerpo internalizadas será suficiente o adecuado para destruir una célula o inhibir su crecimiento, especialmente una célula infectada. Dependiendo de la potencia del anticuerpo o producto conjugado de anticuerpo, en algunos casos, la absorción de una única molécula de anticuerpo en la célula es suficiente para destruir la célula diana a la cual se une el anticuerpo. Por ejemplo, algunas toxinas son altamente potentes en la destrucción, de manera que la internalización de una molécula de la toxina conjugada con el anticuerpo es suficiente para destruir la célula infectada.

Según se utiliza en la presente memoria, se dice que un anticuerpo es "inmunospecífico", "específico para" o "se une específicamente a" un antígeno si éste reacciona a un nivel detectable con el antígeno, preferiblemente con una constante de afinidad, K_a , mayor o igual a aproximadamente 10^4 M^{-1} , o mayor o igual a aproximadamente 10^5 M^{-1} , mayor o igual a aproximadamente 10^6 M^{-1} , mayor o igual a aproximadamente 10^7 M^{-1} , o mayor o igual a 10^8 M^{-1} . La afinidad de un anticuerpo por su antígeno cognado también es expresada comúnmente en forma de una constante de disociación K_D , y en algunas realizaciones, el anticuerpo para HuM2e se une específicamente a M2e si éste se une con una K_D menor de o igual a 10^{-4} M , menor de o igual a aproximadamente 10^{-5} M , menor de o igual a aproximadamente 10^{-6} M , menor de o igual a 10^{-7} M , o menor de o igual a 10^{-8} M . Las afinidades de los anticuerpos se pueden determinar fácilmente utilizando mecanismos convencionales, por ejemplo, los descritos por Scatchard et al. (Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51:660 (1949)).

Las propiedades de unión de un anticuerpo a sus antígenos, células o tejidos se pueden determinar y evaluar generalmente utilizando métodos de inmunodetección que incluyen, por ejemplo, análisis basados en inmunofluorescencia, tales como inmuno-histoquímica (IHC) y/o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Un anticuerpo que tiene una "característica biológica" de un anticuerpo señalado es uno que posee una o más de las características biológicas de ese anticuerpo que lo distingue de otros anticuerpos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un anticuerpo con una característica biológica de un anticuerpo señalado se unirá al mismo epítipo que se une el anticuerpo señalado y/o tendrá una función efectora común con el anticuerpo señalado.

El término anticuerpo "antagonista" se utiliza en el sentido más amplio, e incluye un anticuerpo que bloquea, inhibe o neutraliza parcialmente o totalmente una actividad biológica de un epítipo, polipéptido, o célula al que se une específicamente. Los métodos para identificar anticuerpos antagonistas pueden comprender poner en contacto un polipéptido o célula unidos específicamente por un anticuerpo antagonista candidato con el anticuerpo antagonista candidato y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas asociadas normalmente con el polipéptido o célula.

Un "anticuerpo que inhibe el crecimiento de células infectadas" o un "anticuerpo inhibidor del crecimiento" es uno que se une y da como resultado una inhibición medible del crecimiento de las células infectadas que expresan o son capaces de expresar un epítipo M2e unido por un anticuerpo. Los anticuerpos inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de las células infectadas en más de 20%, preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 50%, e incluso más preferiblemente, en más de 50% (*p. ej.*, de aproximadamente 50% a aproximadamente 100%) en comparación con el control apropiado, siendo típicamente el control células infectadas no tratadas con el anticuerpo que se está sometiendo a ensayo. La inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,1 a 30 $\mu\text{g/ml}$ o de aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células infectadas al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de las células infectadas *in vivo* se puede determinar de diferentes maneras conocidas en la técnica. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal produce una reducción del porcentaje de células infectadas o del número total de células infectadas en aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, y preferiblemente en aproximadamente 5 a 30 días.

Un anticuerpo que "induce apoptosis" es uno que induce la muerte celular programada determinada por la unión de la anexina V, la fragmentación del ADN, la contracción celular, la dilatación del retículo endoplásmico, la fragmentación celular, y/o la formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). Preferiblemente la célula es una célula infectada. Se encuentran disponibles diferentes métodos para evaluar los eventos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, se puede medir la translocación de la fosfatidil serina (PS) por medio de la unión de la anexina; se puede evaluar la fragmentación del ADN por medio del escalonamiento del ADN; y la condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación del ADN se pueden evaluar por medio del incremento en las células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo que induce la apoptosis es el que da como resultado una inducción de la unión de anexina de aproximadamente de 2 a 50 veces, preferiblemente aproximadamente de 5 a 50 veces, y lo más preferiblemente aproximadamente de 10 a 50 veces, con respecto a una célula no tratada en un análisis de unión de anexina.

Las "funciones efectoras" de un anticuerpo hacen referencia a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de una secuencia nativa o una región Fc variante de una secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de las funciones efectoras de los anticuerpos incluyen: la unión Clq y la citotoxicidad dependiente del complemento; la unión al receptor de Fc; la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); la fagocitosis; la regulación a la baja de los receptores de la superficie celular (*p. ej.*, receptor de células B); y la activación de células B.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" hace referencia a una forma de citotoxicidad en la cual la Ig secretada unida a los receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (*p. ej.*, células Asesinas Naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígenos y con posterioridad destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y son necesarios para dicha destrucción. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan solamente FcγRIII, mientras los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR sobre células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede llevar a cabo un análisis de ADCC *in vitro*, tal como el que se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.500.362 o la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales análisis incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, se puede evaluar la actividad ADCC de la molécula de interés *in vivo*, *p. ej.*, en un modelo animal tal como el descrito por Clynes et al., en *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

El "receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el FcR es un FcR humano de secuencia nativa. Por otra parte, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y alternativamente formas empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico. (véase la revisión M. in Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR han sido revisados por Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo aquellos que se vayan a identificar en el futuro, están incluidos en el término "FcR" en la presente memoria. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen PBMC, células NK, monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; siendo preferidas las PBMC y las células NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, *p. ej.*, de sangre.

La "citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" hace referencia a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (Clq) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que se unen a su antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un análisis de CDC, *p. ej.*, como describen Gazzano-Santoro et al., en *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

Los términos "influenza A" y "virus de Influenza A" hacen referencia a un género de la familia de virus Orthomyxoviridae. El virus de Influenza A incluye solamente una especie: el virus de influenza A que causa la influenza en aves, seres humanos, cerdos, y caballos. Se han aislado cepas de todos los subtipos del virus de influenza A de aves silvestres, aunque la enfermedad es poco común. Algunos productos aislados del virus de influenza A causan una enfermedad grave tanto en la volatería doméstica, como, raramente, en seres humanos.

Un "mamífero" para el tratamiento de una infección, hace referencia a cualquier mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológicos, de deporte, o mascotas, tales como perros, gatos, ganado vacuno, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

"Tratar" o "tratamiento" o "alivio" hacen referencia tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas; donde el objeto es prevenir o ralentizar (atenuar) el estado patológico o trastorno elegido como diana. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así a aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se va a prevenir el trastorno. Un sujeto o mamífero se "trata" satisfactoriamente contra una infección si, después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo de acuerdo con los métodos de la presente invención, el paciente muestra una reducción observable y/o medible en ausencia de uno o más de los siguientes: reducción en el número células infectadas o ausencia de células infectadas; reducción en el porcentaje de células totales que están infectadas; y/o alivio en cierta medida en uno o más de los síntomas asociados con la

infección específica; reducción de la morbilidad y la mortalidad, y mejora en cuestiones de la calidad de vida. Los parámetros anteriores para evaluar el tratamiento satisfactorio y la mejora en la enfermedad son fácilmente medibles mediante procedimientos rutinarios familiares para un médico.

- 5 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a una cantidad de un anticuerpo o fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. Véase la definición de "tratamiento" anterior.

Administración "crónica" hace referencia a la administración del agente o los agentes de un modo continuo en oposición a un modo agudo, con el fin de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un período de tiempo prolongado. La administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza de manera consecutiva sin interrupción, si no con una naturaleza cíclica.

- 10 Las administración "combinada con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concomitante) y sucesiva en cualquier orden.

"Portadores" según se utiliza en la presente memoria incluye portadores, excipientes, o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el animal que están siendo expuesto a ellos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa con el pH tamponado. Los ejemplos de los portadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS™.

25 El término "agente citotóxico" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (p. ej., At²¹¹, I¹¹¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos p. ej., metotrexato, adriamicina, alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y sus fragmentos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diferentes agentes antitumorales o anticancerosos descritos más abajo. Otros agentes citotóxicos se describen más abajo.

35 Cuando se utiliza "agente inhibidor del crecimiento" en la presente memoria hace referencia a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los ejemplos de los agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el progreso del ciclo celular, tales como los agentes que inducen la parada de G1 y la parada en la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen los alcaloides de vinca (vincristina, vinorelbina y vinblastina), los taxanos, y los inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido, y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se extienden a la parada de la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes de ADN tales como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbazina, mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo, y la ara-C. Se puede encontrar información adicional en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami et al. (W B Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerosos derivados ambos del tejo. El docetaxel (TAXOTERE™, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo Europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de los dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.

50 "Marca" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a un compuesto o composición detectable que están conjugados directamente o indirectamente con el anticuerpo con el fin de generar un anticuerpo "marcado". La marca puede ser detectable por sí misma (p. ej., marcas de radioisótopo o marcas fluorescentes) o, en el caso de un marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o una composición sustrato que sea detectable.

55 El término "epítipo etiquetado" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a un polipéptido químérico que comprende un polipéptido fusionado a un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el cual se puede elaborar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto de manera que no interfiere en la actividad del polipéptido al cual está fusionado. El polipéptido etiqueta también es preferiblemente absolutamente único de manera que el anticuerpo no presenta sustancialmente reacción cruzada con otros epítipos. Generalmente los polipéptidos etiqueta adecuados tienen al menos seis residuos de aminoácido y normalmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácido (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácido).

Una "molécula pequeña" se define en la presente memoria por tener un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan indistintamente en la presente memoria para hacer referencia a polímeros de ARN, ADN o mixtos de cadena sencilla o doble. Los polinucleótidos pueden incluir secuencias genómicas, extra-genómicas y plasmídicas, y segmentos génicos diseñados más pequeños que expresan, o se pueden adaptar para que expresen polipéptidos.

Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico que está sustancialmente separado de otras secuencias de ADN del genoma así como proteínas o complejos tales como ribosomas y polimerasas, que acompañan naturalmente a una secuencia nativa. El término incluye una secuencia de ácido nucleico que ha sido retirada de su entorno natural, e incluye productos aislados de ADN recombinantes o clonados y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos. Un ácido nucleico sustancialmente puro incluye formas aisladas del ácido nucleico. Por supuesto, esto hace referencia al ácido nucleico aislado originalmente y no excluye genes o secuencias añadidas más tarde al ácido nucleico aislado por la mano del hombre.

El término "polipéptido" se utiliza con su significado convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no están limitados a una longitud específica del producto. Los péptidos, oligopéptidos, y proteínas están incluidos en la definición de polipéptido, y tales términos se pueden utilizar indistintamente en la presente memoria a menos que se indique específicamente de otro modo. Este término no hace referencia, ni excluye modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural.

Un polipéptido puede ser una proteína completa, o una subsecuencia de la misma. Los polipéptidos particulares de interés en el contexto de esta invención son subsecuencias de aminoácidos que comprenden CDR y que son capaces de unirse a un antígeno o célula infectada por Influenza A.

Un "polipéptido aislado" es el que ha sido identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. En realizaciones preferidas, el polipéptido aislado se purificará (1) más de 95% en peso del polipéptido determinado mediante el método de Lowry, y lo más preferiblemente más 99% en peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras utilizando azul de Coomassie, o preferiblemente, tinción con plata. Un polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del polipéptido no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un polinucleótido de "secuencia nativa" es aquel que tiene la misma secuencia de nucleótidos que un polinucleótido obtenido de la naturaleza. Un polipéptido de "secuencia nativa" es aquel que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (*p. ej.*, anticuerpo) obtenido de la naturaleza (*p. ej.*, de cualquier especie). Dichos polinucleótidos y polipéptidos de secuencia nativa pueden ser aislados de la naturaleza o puede ser producidos mediante métodos recombinantes o sintéticos.

Una "variante" de polinucleótido, según se utiliza el término en la presente memoria, es un polinucleótido que difiere típicamente de un polinucleótido descrito específicamente en la presente memoria en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes pueden ser de origen natural o pueden ser generadas sintéticamente, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias de polinucleótido de la invención y evaluando una o más actividades biológicas del polipéptido codificado como se describe en la presente memoria y/o utilizando cualquiera de los numerosos mecanismos bien conocidos en la técnica.

Una "variante" de polipéptido, según se utiliza el término en la presente memoria, es un polipéptido que difiere típicamente de un polipéptido descrito específicamente en la presente memoria en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Tales variantes pueden ser de origen natural o pueden ser generadas sintéticamente, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias de polipéptidos anteriores de la invención y evaluando una o más actividades biológicas del polipéptido como se describe en la presente memoria y/o utilizando cualquiera de los numerosos mecanismos bien conocidos en la técnica.

Se pueden realizar modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención y obtener todavía una molécula funcional que codifica un polipéptido variante o derivado con características deseables. Cuando se desea alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear un equivalente, o incluso una variante o porción mejoradas de un polipéptido de la invención, un experto en la técnica cambiará típicamente uno o más de los codones de la secuencia de ADN codificante.

Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin una pérdida apreciable en su capacidad para unirse a otros polipéptidos (*p. ej.*, antígenos) o células. Puesto que es la capacidad de unión y la naturaleza de una proteína la que define la actividad funcional biológica de una proteína, se pueden realizar ciertas sustituciones en la secuencia de aminoácidos en una secuencia de proteína, y, por supuesto, su secuencia codificante de ADN subyacente, y sin embargo obtener una proteína con propiedades

similares. De este modo se contempla que se pueden realizar diferentes cambios en las secuencias peptídicas de las composiciones descritas, las correspondientes secuencias de ADN que codifican dichos péptidos sin una pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica.

En muchos casos, una variante de polipéptido contendrá una o más sustituciones conservativas. Una "sustitución conservativa" es aquella en la que un aminoácido es sustituido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido quedaran sustancialmente inalteradas.

Al realizar dichos cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos al conferir una función biológica interactiva a una proteína es generalmente conocida en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se admite que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en sus características de hidrofobia y carga (Kyte y Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparragina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Se sabe en la técnica que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático o puntuación similares y todavía dar como resultado una proteína con una actividad biológica similar, es decir todavía obtener una proteína con una funcionalidad biológica equivalente. Al realizar tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están en ± 2 , son particularmente preferidos aquellos que están en ± 1 , y son incluso particularmente preferidos aquellos que están en $\pm 0,5$. También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar eficazmente basándose en la hidrofilia. En la Patente de los Estados Unidos 4.554.101 se establece que la mayor hidrofilia media local de una proteína, determinada por la hidrofobia de sus aminoácidos adyacentes, se corresponde con una propiedad biológica de la proteína.

Como se detalla en la Patente de los Estados Unidos 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a los residuos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparragina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido se puede sustituir por otro que tenga un valor de hidrofilia similar y todavía tener una proteína biológicamente equivalente, y en particular, una proteína inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia están en ± 2 , son particularmente preferidos aquellos que están en ± 1 , e incluso son más particularmente preferidos aquellos que están en $\pm 0,5$.

Como se ha esbozado más arriba, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de las cadenas laterales de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño, y similares. Las sustituciones ilustrativas que tienen en consideración las diferentes características precedentes son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparragina; y valina, leucina e isoleucina.

Las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar adicionalmente basándose en la similitud en la polaridad, la carga, la solubilidad, la hidrofobia, la hidrofilia, y/o la naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar no cargada que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparragina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que puede representar cambios conservativos incluyen: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. Una variante también puede contener, o alternativamente contiene, cambios no conservativos. En una realización preferida, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia nativa por la sustitución, delección o adición de cinco aminoácidos o menos. Las variantes también pueden estar (o alternativamente están) modificadas, por ejemplo, por la delección o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima en la inmunogenicidad, la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido.

Los polipéptidos pueden comprender una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína, que dirige co-traduccionalmente o post-traduccionalmente la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede estar conjugado con un conector u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (p. ej., poli-His), o para potenciar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, se puede conjugar un polipéptido con una región Fc de una inmunoglobulina.

Cuando se comparan secuencias de polinucleótidos y polipéptidos, se dice que dos secuencias son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de las dos secuencias son la misma cuando se alinean para una máxima correspondencia, como se describe más abajo. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan típicamente

comparando las secuencias a lo largo de una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, normalmente de 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en la cual se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se hayan alineado óptimamente.

Se puede llevar a cabo el alineamiento óptimo de secuencias para su comparación utilizando el programa Megalign del grupo de soporte lógico de bioinformática Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), empleando los parámetros por defecto. Este programa incorpora numerosos esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Supl. 3, págs. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenies págs. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. y Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Alternativamente, el alineamiento óptimo de secuencias para su comparación se puede llevar a cabo mediante el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman (1981) Add. APL. Math 2:482, mediante el algoritmo de alineamiento de identidad de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, mediante la búsqueda de métodos de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA del Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Un ejemplo preferido de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y de similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que son descritos por Altschul et al. (1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 y Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. Se pueden utilizar BLAST y BLAST 2.0, por ejemplo con los parámetros descritos en la presente memoria, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los polinucleótidos y polipéptidos de la invención. El soporte lógico para realizar los análisis BLAST se encuentra disponible al público a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica.

En un ejemplo ilustrativo, se pueden calcular las puntuaciones acumulativas utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos emparejados; siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos emparejados erróneamente; siempre <0). La extensión de los éxitos de la palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa cae en una cantidad X desde su máximo valor alcanzado; la puntuación acumulativa tiende a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, y una expectativa (E) de 10, y alineamientos con la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915), (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras.

Para las secuencias de aminoácidos, se puede utilizar una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los éxitos de palabra en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa cae en una cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa tiende a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento.

En un enfoque, se termina el "porcentaje de identidad de la secuencia" comparando dos secuencias alineadas óptimamente a lo largo de una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, donde la porción de la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, espacios) de 20 por ciento o menos, normalmente de 5 a 15 por ciento, o de 10 a 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las cuales existen bases de ácido nucleico o residuos de aminoácido idénticos en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para dar el porcentaje de identidad de la secuencia.

"Homología" hace referencia al porcentaje de residuos de la variante de la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos que son idénticos a la secuencia no variante después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de homología. En realizaciones concretas, las variantes de polinucleótidos y polipéptidos tienen una homología de polinucleótidos o polipéptidos de al menos 70%, al menos

75%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos 99% con un polinucleótido o polipéptido descrito en la presente memoria.

"Vector" incluye vectores lanzadera y de expresión. Típicamente, el constructo plasmídico también incluirá un origen de replicación (p. ej., el origen de replicación de ColE 1) y un marcador seleccionable (p. ej., resistencia a la ampicilina o tetraciclina), para la replicación y selección, respectivamente, de los plásmidos en bacterias. Un "vector de expresión" hace referencia a un vector que contiene las secuencias de control o los elementos reguladores necesarios para la expresión de los anticuerpos incluyendo un fragmento de anticuerpo de la invención, en células bacterianas o eucarióticas. Los vectores adecuados se describen más abajo.

Según se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen las referencias plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo designado en la presente memoria como 8i10, 21B15, o 23K12. Estos anticuerpos se unen preferentemente o se unen específicamente a células infectadas con influenza A en comparación con células de control no infectadas del mismo tipo celular.

En realizaciones concretas, los anticuerpos de la presente invención se unen a la proteína M2. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos para HuM2e que se unen a epítomos de M2e que solamente están presentes en la conformación nativa, es decir, como se expresan en las células. En realizaciones concretas, estos anticuerpos no logran unirse específicamente a un polipéptido M2e aislado, p. ej., el fragmento de M2e de 23 residuos de aminoácido. Se entiende que estos anticuerpos reconocen uno o varios epítomos no lineales (es decir, conformacionales) del péptido M2.

Estos epítomos conformacionales específicos de la proteína M2, y particularmente de M2e, se pueden utilizar como vacunas para prevenir el desarrollo de la infección por influenza en un sujeto.

Como comprenderá un experto en la técnica, la descripción general de los anticuerpos en la presente memoria y los métodos para preparar y utilizar los mismos también se aplican a constituyentes polipeptídicos del anticuerpo individuales y a fragmentos de anticuerpos.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales. No obstante, en las realizaciones preferidas, son monoclonales. Los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos totalmente humanos. Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales son conocidos en la técnica y se describen generalmente, p. ej., en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.824.780. Típicamente, los anticuerpos de la presente invención se producen recombinantemente, utilizando vectores y métodos disponibles en la técnica, como se describe adicionalmente más abajo. También se pueden generar anticuerpos humanos por medio de células B activadas *in vitro* (véanse las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.567.610 y 5.229.275).

También se pueden producir anticuerpos humanos en animales transgénicos (p. ej., ratones) que son capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de ensamblaje de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal produce una completa inhibición de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de la línea germinal humana a dichos ratones mutantes de la línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la sensibilización con antígeno. Véanse, p. ej., Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.545.807; y el documento WO 97/17852. Tales animales pueden ser diseñados genéticamente para producir anticuerpos humanos que comprenden un polipéptido de la presente invención.

Como se ha indicado más arriba, los anticuerpos (o inmunoglobulinas) se pueden dividir en cinco clases diferentes, basándose en las diferencias de las secuencias de aminoácidos en la región constante de las cadenas pesadas. Todas las inmunoglobulinas de una clase dada tienen regiones constantes de la cadena pesada muy similares. Estas diferencias pueden ser detectadas mediante estudios de secuencias o más comúnmente mediante métodos serológicos (es decir mediante el uso de anticuerpos dirigidos a estas diferencias). Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la presente invención pueden ser de cualquier clase, y por lo tanto, pueden tener una cadena pesada gamma, mu, alfa, delta, o épsilon. Una cadena gamma puede ser gamma 1, gamma 2, gamma 3, o gamma 4; y una cadena alfa puede ser alfa 1 o alfa 2.

En una realización preferida, un anticuerpo de la presente invención, o un fragmento del mismo, es una IgG. Se considera que la IgG es la inmunoglobulina más versátil, debido a que es capaz de llevar a cabo todas las funciones de las moléculas de inmunoglobulina. La IgG es la principal Ig en el suero, y la única clase de Ig que atraviesa la placenta. La IgG también fija el complemento, aunque la subclase IgG4 no lo hace. Los macrófagos, los monocitos, los PMN y algunos linfocitos tienen receptores de Fc para la región Fc de la IgG. No todas las clases se unen igual de bien; IgG2 e IgG4 no se unen a los receptores de Fc. Una consecuencia de la unión a los receptores de Fc en los PMN, los monocitos y los macrófagos es que la célula puede internalizar mejor ahora el antígeno. La IgG es una opsonina que intensifica la fagocitosis. La unión de la IgG a los receptores de Fc sobre otros tipos de células da

como resultado la activación de otras funciones. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser de cualquier subclase de IgG.

En otra realización preferida, un anticuerpo, o fragmento del mismo, de la presente invención es una IgE. La IgE es la Ig menos común en el suero puesto que se une muy íntimamente a los receptores de Fc sobre los basófilos y los mastocitos incluso antes de interactuar con el antígeno. Como consecuencia de su unión a basófilos y mastocitos, la IgE está implicada en reacciones alérgicas. La unión del alérgeno a la IgE sobre las células da como resultado la liberación de diferentes mediadores farmacológicos que producen síntomas alérgicos. La IgE también juega un papel en las enfermedades por helmintos parásitos. Los eosinófilos tienen receptores de Fc para la IgE y la unión de los Eosinófilos a helmintos recubiertos con IgE da como resultado la destrucción del parásito. La IgE no fija el complemento.

En diferentes realizaciones, los anticuerpos de la presente invención, y los fragmentos de los mismos, comprenden una cadena ligera variable que es kappa o lambda. La cadena lambda puede ser de cualquier subtipo, incluyendo, p. ej., lambda 1, lambda 2, lambda 3, y lambda 4.

Como se ha observado más arriba, la presente invención proporciona adicionalmente fragmentos de anticuerpo de los anticuerpos de la presente invención. En ciertas circunstancias existen ventajas por el uso de fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. Por ejemplo, el tamaño más pequeño de los fragmentos permite un rápido aclaramiento, y puede conducir a un mejor acceso a ciertos tejidos, tales como tumores sólidos. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpos incluyen: fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; anticuerpos de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Se han desarrollado diferentes técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos fueron obtenidos por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, p. ej., Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). No obstante, estos fragmentos pueden ser producidos ahora directamente por células anfitrionas recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv pueden ser expresados en y secretados todos a partir de E. coli, permitiendo de este modo una fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos Fab'-SH pueden ser recuperados directamente de E. coli y acoplados químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar fragmentos F(ab')₂ directamente del cultivo de células anfitrionas recombinantes. Se describen fragmentos Fab y F(ab')₂ con una vida media *in vivo* incrementada que comprenden residuos de un epítipo de unión a un receptor de recuperación en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.869.046. Otros mecanismos para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la técnica.

En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véanse el documento WO 93/16185; las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.571.894; y 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistas de regiones constantes. De este modo, son adecuados para una unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. Se pueden construir proteínas de fusión con sFv para ofrecer la fusión de una proteína efectora en cualquiera de los extremos amino o carboxi de un sFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, más arriba. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", p. ej., como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.641.870 por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención son biespecíficos o multiespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos se pueden unir a dos epítopos diferentes de un único antígeno. Otros de tales anticuerpos pueden combinar un primer sitio de unión a antígeno con un sitio de unión para un segundo antígeno. Alternativamente, se puede combinar un brazo anti-M2e con un brazo que se une a una molécula activadora sobre un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (p. ej., CD3), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγR1 (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), con el fin de centrar y localizar los mecanismos de defensa celular para la célula infectada. También se pueden utilizar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos para las células infectadas. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a M2e y un brazo que se une al agente citotóxico (p. ej., saporina, anti-interferon-α, alcaloide de vinca, cadena de ricina A, metotrexato o un hapteno de un isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar en forma de anticuerpos completos o de fragmentos de anticuerpos (p. ej., anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). En el documento WO 96/16673 se describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRIII y en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.837.234 se describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγR1. Se muestra un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fcα en el documento WO98/02463. La Patente de los Estados Unidos Núm. 5.821.337 ilustra un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-CD3.

Los métodos para elaborar anticuerpos biespecíficos son bien conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos completos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la selección al azar de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solamente

una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, se fusionan dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. Preferiblemente, la fusión es con un dominio constante de la cadena pesada de Ig, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C_H2, y C_H3. Se prefiere tener una primera región constante de la cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se co-transfectan en una célula anfitriona adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en las realizaciones cuando proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. No obstante, es posible insertar las secuencias codificantes para las dos o tres cadenas de polipéptido en un único vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da como resultado elevados rendimientos o cuando las proporciones no tienen un efecto significativo sobre el rendimiento de la combinación de cadenas deseada.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpo biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina solamente en la mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se describe en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede ser diseñada para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio C_H 3. En este método, se rempazan una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo por cadenas laterales más grandes (*p. ej.*, tirosina o triptófano). Se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o parecido a las cadenas laterales grandes remplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes por unas más pequeñas (*p. ej.*, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero por encima de otros productos finales no deseados tales como los homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del producto heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden elaborar utilizando cualquiera de los métodos de entrecruzamiento convenientes. Los agentes de entrecruzamiento adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.676.980, junto con numerosos mecanismos de entrecruzamiento.

Los mecanismos para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también han sido descritos en la bibliografía. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en donde se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar los ditiolos próximos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte después en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden ser utilizados como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento Fab' fue secretado por separado de *E. coli* y sometido a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado era capaz de unirse a células que expresaban en exceso el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de cáncer de mama humano.

También se han descrito diferentes mecanismos para elaborar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun fueron ligados a porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L por medio de un conector que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena. Por consiguiente, se fuerza el emparejamiento de los dominios V_H y V_L de un fragmento con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígenos. También se ha informado sobre otra estrategia para elaborar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991). Se puede internalizar (y/o catabolizar) un anticuerpo multivalente más rápido que un anticuerpo bivalente por medio de una célula que expresa un antígeno al cual se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes con tres o más sitios de unión a antígenos (*p. ej.*, anticuerpos tetravalentes), que pueden ser fácilmente producidos mediante la expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígenos. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígenos amino terminales con respecto a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en la presente memoria comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de unión a antígenos. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), en donde la cadena o las cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, en donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la cadena o las cadenas de polipéptido pueden comprender: VH-CH1-conector flexible-VH-CH1-cadena de la región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de la región Fc. El anticuerpo multivalente en la presente memoria comprende preferiblemente además al menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente en la presente memoria puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de la cadena ligera y, opcionalmente, además comprenden un dominio C_L .

Los anticuerpos de la presente invención incluyen adicionalmente anticuerpos de cadena sencilla.

En realizaciones concretas, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos internalizantes.

Se contemplan la modificación o las modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en un polinucleótido que codifica el anticuerpo, o una cadena del mismo, o mediante síntesis peptídica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones, y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de delección, inserción, y sustitución para llegar al anticuerpo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar procesos post-traduccionales del anticuerpo, tales como cambiar el número o posición de los sitios de glicosilación. Cualquiera de las variaciones y modificaciones descritas más arriba para los polipéptidos de la presente descripción puede ser incluida en los anticuerpos de la presente invención.

Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones de un anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido con alanina" descrito por Cunningham y Wells en Science, 244:1081-1085 (1989). Aquí, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (*p. ej.*, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferiblemente alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con el antígeno PSCA. Esas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se afinan después introduciendo variantes adicionales u otras variantes en o para, los sitios de sustitución. De este modo, si bien el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos es predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación *per se* sea predeterminada. Por ejemplo, para analizar el funcionamiento de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo la mutagénesis de barrido con alanina o al azar en el codón o la región diana y las variantes de anti-anticuerpo expresadas se escrutan para determinar la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que tienen una

longitud que oscila entre un residuo y polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de uno o múltiples residuos de aminoácido. Los ejemplos de las inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes insercionales de un anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o C del anticuerpo a una enzima (*p. ej.*, ADEPT) o un polipéptido que incrementa la vida media en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante por sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo aminoácido de la molécula de anticuerpo remplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones de FR. Se contemplan las sustituciones conservativas y no conservativas.

Las modificaciones sustanciales de las propiedades biológicas del anticuerpo se logran seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, una lámina o una conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral.

También se puede sustituir cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar un entrecruzamiento aberrante. Por el contrario, se pueden añadir uno o más enlaces cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (concretamente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo de variante por sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental. Generalmente, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para su desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental del cual se generaron. Un modo conveniente para generar dichas variantes por sustitución implica la maduración de afinidad utilizando la presentación en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de la región hipervariable (*p. ej.*, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se presentan de una manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado en el interior de cada partícula. Las variantes presentadas en los fagos se escrutan después para determinar su actividad biológica (*p. ej.*, afinidad de unión) como se describe en la presente memoria. Con el fin de identificar los sitios de la región hipervariable candidato para la modificación, se puede realizar la mutagénesis de barrido con alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede resultar beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y un antígeno o una célula infectada. Tales residuos de contacto y los residuos cercanos son candidatos para la sustitución de acuerdo con los mecanismos elaborados en la presente memoria. Una vez que se han generado tales variantes, el panel de variantes se somete a escrutinio como se describe en la presente memoria y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más análisis relevantes pueden ser seleccionados para su desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por alterar se quiere significar suprimir uno o más radicales carbohidratados encontrados en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de anticuerpos está típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N hace referencia al anclaje del radical carbohidratado a la cadena lateral de un residuo de asparragina. Las secuencias tripeptídicas asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para el anclaje enzimático del radical carbohidratado a la cadena lateral de asparragina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. Glicosilación ligada a O hace referencia al anclaje de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para los sitios de glicosilación ligados a N). La alteración se puede realizar mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glicosilación ligados a O).

El anticuerpo de la invención se modifica con respecto a la función efectora, *p. ej.*, para intensificar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígenos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede lograr introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, se pueden introducir uno o varios residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una destrucción de células mediada por el complemento y una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementadas. Véanse Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con una actividad anti-infección mejorada

utilizando entrecruzadores heterobifuncionales como describen Wolff et al., en Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y de ese modo se puede intensificar la lisis del complemento y las capacidades de ADCC. Véase Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

5 Para incrementar la vida media en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de recuperación al anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.739.277, por ejemplo. Según se utiliza en la presente memoria, el término "epítipo de unión al receptor de recuperación" hace referencia a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (*p. ej.*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable del incremento de la vida media en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

10 Los anticuerpos de la presente invención también se pueden modificar para que incluyan una etiqueta epitópica o marca, *p. ej.*, para su uso en la purificación o aplicaciones de diagnóstico. La invención también se refiere a la terapia con productos inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente anticanceroso tal como un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales productos inmunoconjugados se han descrito más arriba.

15 Los productos conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como calicheamicina, maitansinoides, tricoteno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en la presente memoria.

20 En una realización preferida, un anticuerpo (completo o fragmentos) de la invención se conjuga con una o más moléculas de maitansinoides. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló primero del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (Patente de los Estados Unidos Núm. 3.896.111). Con posterioridad, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como el maitansinol y los ésteres de maitansinol C-3 (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 25 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

30 En un intento para mejorar su índice terapéutico, se han conjugado maitansina y maitansinoides con anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los productos inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.208.020, 5.416.064 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1. Liu et al., en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describen productos inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado DM1 conectado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se encontró que el producto conjugado era altamente citotóxico para las células de cáncer de colon cultivadas, y mostraba actividad antitumoral en un análisis de crecimiento tumoral *in vivo*.

35 Los productos conjugados de anticuerpo-maitansinoide se preparan uniendo químicamente un anticuerpo con una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula de maitansinoide. Se demostró que una media de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo es eficaz al aumentar la citotoxicidad de las células diana sin afectar negativamente a la función o la solubilidad del anticuerpo, aunque cabría esperar que incluso una molécula de toxina/anticuerpo intensificara la citotoxicidad por encima de la utilización del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la 40 técnica y se pueden sintetizar mediante mecanismos conocidos o se pueden aislar de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.208.020 y en otras patentes y publicaciones no de patente referidas más arriba en la presente memoria. Los maitansinoides preferidos son el maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diferentes ésteres de maitansinol.

45 Existen muchos grupos conectores conocidos en la técnica para elaborar productos conjugados de anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, aquellos descritos en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.208.020 o en la Patente EP 0 425 235 B1, y Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos conectores incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles con ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles con peptidasa, o grupos lábiles con esterasa, como se describe en las patentes identificadas más arriba, prefiriéndose los grupos disulfuro y tioéter.

50 Los productos inmunoconjugados se pueden elaborar utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro. Por

ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como describen Vitetta et al., en Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno-triaminopentaacetico (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ilustrativo para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilite la liberación del fármaco citotóxico en la célula.

5 Por ejemplo, se puede utilizar un conector lábil al ácido, Cancer Research 52: 127-131 (1992); Patente de los Estados Unidos Núm. 5.208.020).

Otro producto inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia de antibióticos de la calicheamicina es capaz de producir roturas en el ADN de doble hebra a concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de los productos conjugados de la familia de la calicheamicina, véanse las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Otro fármaco con el cual se puede conjugar el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la calicheamicina y como QFA tienen sitios de acción intracelulares y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la absorción celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos intensifica enormemente sus efectos citotóxicos.

10 Los ejemplos de otros agentes que se pueden conjugar con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.053.394, 5.770.710, así como las esperamicinas (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen, p. ej., la cadena A de la difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232.

25 Los autores de la presente invención también describen un producto inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (p. ej., una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; ADNasa).

Para la destrucción selectiva de células infectadas, el anticuerpo incluye un átomo altamente radiactivo. Se encuentra disponible una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos anti-PSCA radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Rc^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el producto conjugado se utiliza para el diagnóstico, éste puede comprender un átomo radiactivo de estudios escintigráficos, por ejemplo tc^{99m} o I^{123} , o una marca de espín para la formación de imágenes mediante resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, mri), tales como yodo-123, yodo-131, indio-111, fluor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

30 La marca radiactiva u otra marca se incorpora al producto conjugado de la manera conocida. Por ejemplo, el péptido puede ser biosintetizado o puede ser sintetizado mediante síntesis química de aminoácidos atizando precursores de aminoácidos adecuados que impliquen, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Las marcas tales como tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} se pueden anclar por medio de un residuo de cisteína al péptido. El Itrio-90 se puede anclar a través de un residuo de lisina. Se puede utilizar el método IODOGEN (Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 para incorporar yodo-123. En "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) se describen otros métodos con detalle.

40 La marca radiactiva u otra marca se incorpora al producto conjugado de la manera conocida. Por ejemplo, el péptido puede ser biosintetizado o puede ser sintetizado mediante síntesis química de aminoácidos atizando precursores de aminoácidos adecuados que impliquen, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Las marcas tales como tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} se pueden anclar por medio de un residuo de cisteína al péptido. El Itrio-90 se puede anclar a través de un residuo de lisina. Se puede utilizar el método IODOGEN (Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 para incorporar yodo-123. En "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) se describen otros métodos con detalle.

Alternativamente, se elabora una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico, p. ej., mediante mecanismos recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del producto conjugado ya sean adyacentes entre sí ya sean separadas por una región que codifica un péptido conector que no destruye las propiedades deseadas del producto conjugado.

Los anticuerpos de la presente invención también se utilizan en la terapia con profármacos mediada por enzima dependiente de anticuerpo (ADET) conjugando el anticuerpo con una enzima activadora del profármaco que convierte el profármaco (p. ej., un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO 81/01145) en un fármaco anticanceroso activo (véase, p. ej., el documento WO 88/07378 y la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.975.278).

El componente enzimático del producto inmunoconjugado útil para la ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal manera que lo convierta en una forma citotóxica, más activa. Las enzimas que son útiles en el método de esta invención incluyen, pero no están limitadas a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de *Serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en

fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácido; enzimas que escinden carbohidratos tales como β -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir grupos glicosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasa, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos aminados con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "aczimas", para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, *p. ej.*, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los productos conjugados de anticuerpo-aczima se pueden preparar como se describe en la presente memoria para la liberación de la aczima en una población de células infectadas.

Las enzimas de esta descripción se pueden unir covalentemente a los anticuerpos mediante mecanismos bien conocidos en la técnica tales como el uso de los reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales comentados más arriba. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión al antígeno de un anticuerpo de la invención conectado a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima de la descripción se pueden construir utilizando mecanismos de ADN recombinante bien conocidos en la técnica (véase, *p. ej.*, Neuberger et al., Nature, 312: 604-608 (1984).

Se contemplan en la presente memoria otras modificaciones del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar unido a una variedad de polímeros no proteínicos, *p. ej.*, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede estar atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente), en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales mecanismos se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también se formulan en forma de inmunoliposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por diferentes tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para liberar un fármaco en un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen generalmente en una formación en bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos por Epstein et al., en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.485.045 y 4.544.545; y en el documento WO 97/38731 publicado el 23 de Octubre, 1997. Se describen liposomas con un tiempo de circulación mejorado en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.013.556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas son extruidos a través de filtros con un tamaño de poro definido para dar liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas descritos por Martin et al., en J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está opcionalmente contenido en el interior del liposoma. Véase Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989).

Los anticuerpos de la presente invención, o los fragmentos de los mismos, pueden poseer cualquiera de una variedad de características biológicas o funcionales. En ciertas realizaciones, estos anticuerpos son anticuerpos específicos para la Influenza A o específicos de la proteína M2, indicando que se unen específicamente o se unen preferentemente a Influenza A o a la proteína M2 de la misma, respectivamente, en comparación con una célula de control normal. En realizaciones concretas, los anticuerpos son anticuerpos para HuM2e, indicando que se unen específicamente a una proteína M2e, preferiblemente a un epítipo del dominio M2e que solamente está presente cuando la proteína M2 es expresada en células o está presente en un virus, en comparación con una célula de control normal.

En realizaciones concretas, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo antagonista, que bloquea o inhibe parcialmente o totalmente una actividad biológica de un polipéptido o célula a la cual se une específicamente o preferentemente. En otras realizaciones, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo inhibidor del crecimiento, que bloquea parcialmente o completamente o inhibe el crecimiento de una célula infectada a la cual se une. En otra realización más, un anticuerpo de la presente invención induce o promueve la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o la citotoxicidad dependiente del complemento.

Métodos para Identificar y Producir Anticuerpos Específicos para el Virus de la Influenza

Los autores de la presente invención también describen métodos novedosos para la identificación de anticuerpos para HuM2e, como se ilustra en el Ejemplo 4. Estos métodos se pueden adaptar fácilmente para identificar anticuerpos específicos para otros polipéptidos expresados sobre la superficie celular por agentes infecciosos, o incluso polipéptidos expresados sobre la superficie del propio agente infeccioso.

En general, los métodos incluyen la obtención de muestras de suero procedente de pacientes que han sido infectados con o vacunados contra un agente infeccioso. Estas muestras de suero se escrutan después para identificar aquellas que contienen anticuerpos específicos para un polipéptido concreto asociado con el agente infeccioso, tales como, p. ej., un polipéptido expresado específicamente sobre la superficie de las células infectadas con el agente infeccioso, pero no de células no infectadas. En realizaciones concretas, las muestras de suero se escrutan poniendo en contacto las muestras con una célula que ha sido transfectada con un vector de expresión que expresa el polipéptido expresado sobre la superficie de células infectadas.

Una vez que el paciente ha sido identificado por tener suero que contiene un anticuerpo específico para el polipéptido del agente infeccioso de interés, se utilizan las células mononucleares y/o B obtenidas del mismo paciente para identificar una célula o un clon de la misma que produce el anticuerpo, utilizando cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria o disponible en la técnica. Una vez que se identifica una célula B que produce el anticuerpo, se pueden clonar los ADNc que codifican las regiones variables o los fragmentos de las mismas del anticuerpo utilizando vectores para la RT-PCR convencionales y cebadores específicos para las secuencias de anticuerpos conservadas, y subclonar en los vectores de expresión utilizados para la producción recombinante de anticuerpos monoclonales específicos para el polipéptido del agente infeccioso de interés.

Un método para identificar un anticuerpo que se une específicamente a células infectadas por influenza A, puede comprometer: la puesta en contacto de un virus de Influenza A o una célula que expresa la proteína M2 con una muestra biológica obtenida de un paciente que ha sido infectado por Influenza A; la determinación de una cantidad de anticuerpo en la muestra biológica que se une a la célula; y la comparación de la cantidad determinada con un valor de control, en donde si el valor determinado es al menos dos veces mayor que el valor de control, está indicado un anticuerpo que se une específicamente a células infectadas por influenza A. Las células que expresan una proteína M2 pueden ser células infectadas con un virus de Influenza A o células que han sido transfectadas con un polinucleótido que expresa la proteína M2. Alternativamente, las células pueden expresar una porción de la proteína M2 que incluye el dominio M2e y suficiente secuencia M2 adicional para que la proteína permanezca asociada con la célula y el dominio M2e se presente sobre la superficie celular de la misma manera que cuando está presente en la proteína M2 completa. Los métodos para preparar un vector de expresión de M2 y transfectar una célula apropiada, incluyendo aquellos descritos en la presente memoria, se pueden completar fácilmente, habida cuenta de la secuencia M2 que se encuentra públicamente disponible. Véase, por ejemplo, la Base de Datos de Secuencias de Influenza (ISD por sus siglas en inglés) (flu.lanl.gov en World Wide Web, descrita por Macken et al., 2001, "The value of a database in surveillance and vaccine selection" en *Options for the Control of Influenza IV*. A.D.M.E., Osterhaus & Hampson (Eds.), Elsevier Science, Amsterdam, págs. 103-106) y el Centro de Secuenciación Microbiana (MSC) del Instituto para la Investigación genómica (TIGR por sus siglas en Inglés) (tigr.org/msc/inf_a_virus.shtml on the World Wide Web).

Las células o virus que expresan M2e descritas más arriba se utilizan para escrutar la muestra biológica obtenida de un paciente infectado con influenza A para determinar la presencia de anticuerpos que se unen preferentemente a la célula que expresa el polipéptido M2 utilizando técnicas biológicas convencionales. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden marcar, y detectar la presencia de la marca asociada con la célula, p. ej., utilizando el análisis FMAT o FACs. En realizaciones concretas, la muestra biológica es sangre, suero, plasma, lavado bronquial, o saliva. Los métodos descritos más arriba se pueden poner en práctica utilizando técnicas de elevado rendimiento.

Después los anticuerpos humanos identificados se pueden caracterizar adicionalmente. Por ejemplo los epítomos conformacionales concretos con la proteína M2e que son necesarios o suficientes para la unión del anticuerpo se pueden determinar, p. ej., utilizando la mutagénesis dirigida al sitio de polipéptidos M2e expresados. Estos métodos se pueden adaptar fácilmente para identificar anticuerpos humanos que se unen a cualquier proteína expresada sobre una superficie celular. Además, estos métodos se pueden adaptar para determinar la unión del anticuerpo al propio virus, en oposición a una célula que expresa M2e recombinante o infectada con el virus.

Las secuencias de polinucleótidos que codifican los anticuerpos, las regiones variables de los mismos, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden subclonar en vectores de expresión para la producción recombinante de anticuerpos para HuM2e. En una realización, esto se logra obteniendo células mononucleares del paciente procedentes del suero que contiene el anticuerpo para HuM2e identificado; produciendo clones de células B de las células mononucleares; induciendo las células B para que se vuelvan células de plasma productoras de anticuerpo; y escrutando los sobrenadantes producidos por las células del plasma para determinar si contiene el anticuerpo para HuM2e. Una vez que se identifica un clon de célula B que produce el anticuerpo para HuM2e, se lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para clonar los ADN que codifican las regiones variables o porciones de las mismas del anticuerpo para HuM2e. Estas secuencias se subclonan después en vectores de expresión adecuados para la producción recombinante de anticuerpos contra HuM2e humanos. La especificidad de unión se puede confirmar determinando la capacidad del anticuerpo para unirse a células que expresan el polipéptido M2e.

En los métodos descritos en la presente memoria, se clasifican las células B aisladas de sangre periférica o ganglios linfáticos, p. ej., basándose en que son CD 19 positivas, y se cultivan en placa, p. ej., a una especificidad tan baja como una sola célula por pocillo, p. ej., en configuraciones de 96, 384, o 1536 pocillos. Se induce la diferenciación de las células a células productoras de anticuerpos, p. ej., células de plasma, y se recogen los sobrenadantes de

cultivo y se someten a ensayo para determinar la unión a células que expresan el polipéptido del agente infeccioso sobre su superficie utilizando, p. ej., el análisis FMAT o FACS. Después se someten los pocillos positivos a RT-PCR de todo el pocillo para amplificar las regiones variables de la cadena pesada y ligera de la molécula de IgG expresada por células de plasma hijas clónicas. Los productos resultantes de la PCR que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera, o porciones de las mismas, se subclonan en vectores de expresión de anticuerpos humanos para su expresión recombinante. Los anticuerpos recombinantes resultantes se someten a ensayo después para confirmar su especificidad de unión original y se pueden someter a un ensayo adicional para determinar la pan-especificidad a través de diferentes cepas de productos aislados del agente infeccioso.

De este modo, se puede poner en práctica un método de identificación de anticuerpos contra HuM2e como sigue. En primer lugar, se transfectan ADNc de M2 completos o aproximadamente completos en una línea celular para la expresión de la proteína M2. En segundo lugar, se someten a ensayo muestras de plasma o suero humano individuales para determinar los anticuerpos que se unen a la M2 expresada en las células. Y por último, se caracterizan los MAb obtenidos de individuos con plasma positivo o suero positivo para determinar la unión a la M2 expresada por la misma célula. En este punto se puede realizar una definición adicional de las sutiles especificidades de los MAb.

Estos métodos se pueden poner en práctica para identificar una variedad de anticuerpos contra HuM2e diferentes, incluyendo anticuerpos específicos para (a) epítomos en un péptido M2e lineal, (b) epítomos comunes en múltiples variantes de M2e, (c) determinantes conformacionales de un homotetrámero M2, y (d) determinantes conformacionales comunes de múltiples variantes del homotetrámero M2. La última categoría es particularmente deseable, ya que esta especificidad es quizás específica para todas las cepas A de influenza.

Los polinucleótidos que codifican los anticuerpos contra HuM2e o porciones de los mismos se pueden aislar de células que expresan anticuerpos contra HuM2e, de acuerdo con los métodos disponibles en la técnica y descritos en la presente memoria, incluyendo la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores específicos para las regiones conservadas de los polipéptidos de anticuerpos humanos. Por ejemplo, las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada se pueden clonar a partir de una célula B de acuerdo con los mecanismos de la biología molecular descritos en el documento WO 92/02551; la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.627.052; o Babcook et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48 (1996). Los polinucleótidos que codifican toda o una región de ambas regiones variables de la cadena pesada y ligera de la molécula de IgG expresada por las células de plasma hijas clónicas que expresan el anticuerpo contra HuM2e se pueden subclonar y secuenciar. La secuencia del polipéptido codificado se puede determinar fácilmente a partir de la secuencia del polinucleótido. Los polinucleótidos aislados que codifican tales polipéptidos se pueden subclonar en un vector de expresión para producir recombinantemente los anticuerpos y polipéptidos de la presente invención, utilizando los procedimientos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria.

Las propiedades de unión de un anticuerpo (o fragmento del mismo) a M2e o a células o tejidos infectados se pueden determinar y evaluar generalmente utilizando métodos de inmunodetección incluyendo, por ejemplo, análisis basados en inmunofluorescencia, tales como inmuno-histoquímica (IHC) y/o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Los métodos de inmunoanálisis pueden incluir controles y procedimientos para determinar si los anticuerpos se unen específicamente a M2e de una o más cepas específicas de Influenza A, y no reconocen o presentan reacción cruzada con células de control normales.

Después del pre-escrutinio del suero para identificar los pacientes que producen anticuerpos para un agente infeccioso o un polipéptido del mismo, p. ej., M2, los métodos descritos en la presente memoria incluyen típicamente el aislamiento o purificación de células B procedentes de una muestra biológica obtenida previamente de un paciente o sujeto. El paciente o sujeto puede estar diagnosticado actualmente o anteriormente o se puede sospechar que tiene una enfermedad o infección concreta, o se puede considerar que el paciente o sujeto está libre de una enfermedad o infección concreta. Típicamente, el paciente o sujeto es un mamífero y, en realizaciones concretas, un ser humano. La muestra biológica puede ser cualquier muestra que contenga células B, incluyendo pero no limitada a, ganglios linfáticos o tejido de ganglios linfáticos, efusiones pleurales, sangre periférica, ascitis, tejido tumoral, o fluido cerebroespinal (FCE). En varias realizaciones, se aíslan células B de diferentes tipos de muestras biológicas, tales como una muestra biológica afectada por una enfermedad o infección concreta. Sin embargo, se entiende que se puede utilizar cualquier muestra biológica que comprenda células B.

Una vez aisladas, se induce la producción de anticuerpos por las células, p. ej., cultivando células B en condiciones que apoyen la proliferación o el desarrollo de células B en un plasmacito, plasmablasto, o célula plasmática. Después se escrutan los anticuerpos, típicamente utilizando técnicas de alto rendimiento, para identificar un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno diana, p. ej., un tejido, célula, agente infeccioso, o polipéptido concretos. El antígeno específico, p. ej., un polipéptido de la superficie celular unido por el anticuerpo puede no ser conocido, alternativamente, el antígeno unido específicamente por el anticuerpo es conocido.

Las células B pueden ser aisladas de una muestra biológica, p. ej., una muestra de tumor, tejido, sangre periférica o ganglio linfático, mediante cualquier método conocido y disponible en la técnica. Las células B se clasifican típicamente mediante FACS basándose en la presencia sobre su superficie de un marcador específico de células b, p. ej., CD19, CD138, y/o IgG de superficie. No obstante, se pueden emplear otros métodos conocidos en la técnica,

tales como, p. ej., la purificación en columna utilizando cuentas magnéticas para CD19 o cuentas magnéticas específicas de IgG, seguido de elución de la columna. Sin embargo, el aislamiento magnético de células B utilizando cualquier marcador puede producir la pérdida de ciertas células B. Por lo tanto, preferiblemente, las células aisladas no se clasifican sino, en lugar de eso, las células mononucleares purificadas con ficol aisladas de tumores se cultivan en placa directamente hasta un número apropiado o deseado de especificidades por pocillo.

Con el fin de identificar las células B que producen un anticuerpo específico de un agente infeccioso, las células B se cultivan en placa típicamente a una baja densidad (p. ej., una especificidad de una sola célula por pocillo, 1-10 células por pocillo, 10-100 células por pocillo, 1-100 células por pocillo, menos de 10 células por pocillo, o menos de 100 células por pocillo) en placas de múltiples pocillos o de microtitulación, p. ej., en configuraciones de 96, 384, o 1536 pocillos.

Cuando las células B se cultivan inicialmente en placa a una densidad mayor de una célula por pocillo, los métodos de la presente invención pueden incluir la etapa de diluir con posterioridad las células en un pocillo identificado como productor de un anticuerpo específico del antígeno, hasta lograr una especificidad de una sola célula por pocillo, facilitando de ese modo la identificación de la célula B que produce el anticuerpo específico del antígeno. Los sobrenadantes celulares o una porción de los mismos y/o las células pueden ser congelados y almacenados para un futuro ensayo y una posterior recuperación de los polinucleótidos del anticuerpo.

Opcionalmente, las células B se cultivan en condiciones que favorecen la producción de anticuerpos por las células B. Por ejemplo, las células B pueden ser cultivadas en condiciones favorables para la proliferación y diferenciación de las células B para dar un plasmablasto, plasmacitos, o células plasmáticas productores de anticuerpo. Las células B se pueden cultivar en presencia de un mitógeno para las células B, tal como un lipopolisacárido (LPS) o un ligando CD40. Opcionalmente, las células B se diferencian en células productoras de anticuerpos cultivándolas con células alimento y/u otros activadores de células B, tales como el ligando CD40.

Los sobrenadantes de los cultivos celulares o los anticuerpos obtenidos de ellos se pueden someter a ensayo para determinar su capacidad para unirse a un antígeno diana, utilizando métodos rutinarios disponibles en la técnica, incluyendo los descritos en la presente memoria. Los sobrenadantes de cultivo se pueden someter a ensayo para determinar la presencia de anticuerpos que se unen a un antígeno diana utilizando métodos de alto rendimiento. Por ejemplo, se pueden cultivar células B en placas de microtitulación de múltiples pocillos, de manera que se puedan utilizar manipuladores de placa robóticos para tomar muestras simultáneamente de múltiples sobrenadantes celulares y someterlos a ensayo para determinar la presencia de anticuerpos que se unen a un antígeno diana. Los antígenos se pueden unir a cuentas (p. ej., cuentas paramagnéticas o de látex) para facilitar la captura de los complejos de anticuerpo/antígeno. Alternativamente, los antígenos y anticuerpos se marcan fluorescentemente (con diferentes marcas) y se realiza un análisis FACS para identificar la presencia de anticuerpos que se unen al antígeno diana. En otra alternativa, la unión al anticuerpo se determina utilizando el análisis y el instrumental FMAT(TM) (Applied Biosystems, Foster City, CA). FMAT(TM) es una plataforma macroconfocal de fluorescencia para un escrutinio de alto rendimiento, que mezcla y lee análisis no radiactivos utilizando células vivas o cuentas.

En el contexto de la comparación de la unión de un anticuerpo a un antígeno diana concreto (p. ej., una muestra biológica tal como tejido o células infectados, o agentes infecciosos) en comparación con una muestra de control (p. ej., una muestra biológica tal como células no infectadas, o un agente infeccioso diferente), se considera que el anticuerpo se une preferentemente a un antígeno diana concreto si se une al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cinco veces, o al menos diez veces más anticuerpo al antígeno diana concreto en comparación con la cantidad que se une a una muestra de control.

Los polinucleótidos que codifican las cadenas de anticuerpos, las regiones variables de las mismas, o sus fragmentos, se pueden aislar de células utilizando cualquier método disponible en la técnica. Los polinucleótidos se pueden aislar utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), p. ej., la PCR con transcripción inversa (RT-PCR) utilizando cebadores oligonucleotídicos que se unen específicamente a las cadenas pesada o ligera que codifican secuencias de polinucleótidos o sus complementos utilizando procedimientos rutinarios disponibles en la técnica. Los pocillos positivos se pueden someter a RT-PCR de todo el pocillo para amplificar las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la molécula de IgG expresada por las células plasmáticas hijas clónicas. Estos productos de la PCR se pueden secuenciar.

Los productos resultantes de la PCR que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera o porciones de las mismas se subclonan después en vectores de expresión de anticuerpos humanos y se expresan recombinantemente de acuerdo con procedimientos rutinarios en la técnica (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.112.439). Las moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo específico para un tumor o un fragmento del mismo, según se describe en la presente memoria, se pueden propagar y expresar de acuerdo con cualquiera de una variedad de procedimientos bien conocidos para la escisión, ligación, transformación, y transfección de ácidos nucleicos. De este modo, se puede preferir la expresión de un fragmento de anticuerpo en una célula anfitriona procariótica, tal como *Escherichia coli* (véase, p. ej., Pluckthun et al, Methods Enzymol. 178:497-515 (1989)). Alternativamente, se puede preferir la expresión del anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo en una célula eucariótica, incluyendo levadura (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Pichia pastoris*); células animales (incluyendo células de mamífero); o células

vegetales. Los ejemplos de las células animales adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, células de mieloma, COS, CHO, o de hibridoma. Los ejemplos de las células vegetales incluyen células de tabaco, maíz, soja, y arroz. Por medio de métodos conocidos para los expertos en la técnica y basados en la presente descripción, se puede diseñar un vector de ácido nucleico para expresar secuencias foráneas en un sistema anfitrión adecuado, y después se pueden insertar secuencias de polinucleótidos que codifican el anticuerpo específico del tumor (o un fragmento del mismo). Los elementos reguladores variarán de acuerdo con el anfitrión concreto.

Se pueden preparar uno o más vectores de expresión replicables que contienen un polinucleótido que codifica una región variable y/o constante y utilizarlos para transformar una línea celular apropiada, por ejemplo, una línea celular de mieloma no productora, tal como una línea NSO de ratón o una bacteria, tal como *E. coli*, en la cual tendrá lugar la producción del anticuerpo. Con el fin de obtener una transcripción y una traducción eficaces, la secuencia de polinucleótidos de cada vector debe incluir secuencias reguladoras apropiadas, concretamente un promotor y una secuencia líder conectados operablemente a la secuencia del dominio variable. Los métodos concretos para producir anticuerpo de este modo son generalmente bien conocidos y utilizados rutinariamente. Por ejemplo, los procedimientos de la biología molecular son descritos por Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989; véase también Sambrook et al., 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, (2001)). Aunque no es necesario, se pueden secuenciar las regiones de polinucleótidos que codifican los anticuerpos recombinantes. La secuenciación del ADN se puede realizar como describen Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463 (1977)) y el Manual de Secuenciación Amersham International plc e incluyendo las mejoras del mismo.

Los anticuerpos recombinantes resultantes o los fragmentos de los mismos se pueden someter a ensayo después para confirmar su especificidad original y se pueden someter a ensayo adicionalmente para determinar su pan-especificidad, p. ej., con agentes infecciosos relacionados. Por ejemplo, un anticuerpo identificado o producido de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se puede someter a ensayo para determinar la destrucción celular a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o la apoptosis, y/o también su capacidad para internalizarse.

Polinucleótidos

Los autores de la presente invención también describen composiciones de polinucleótidos. Preferiblemente, estos polinucleótidos codifican un polipéptido, p. ej., una región de una cadena variable de un anticuerpo de la invención que se une a M2, o M2e de Influenza A. Los polinucleótidos de la descripción son moléculas de ADN de hebra sencilla (codificante o antisentido) o de doble hebra (genómico, ADNc o sintético) o de ARN. Las moléculas de ARN incluyen, pero no están limitadas a, moléculas de ARNHn, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de una manera unívoca, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Alternativamente, o además, se encuentran presentes en un polinucleótido secuencias codificantes o no codificantes. También alternativamente, o además, un polinucleótido está conectado a otras moléculas y/o materiales de soporte. Se pueden utilizar polinucleótidos, p. ej., en el análisis de hibridación para detectar la presencia de un anticuerpo contra Influenza A en una muestra biológica, y en la producción recombinante de polipéptidos.

Por lo tanto, los autores de la presente invención describen composiciones de polinucleótidos que incluyen una parte o toda una secuencia de polinucleótidos mostrada en el Ejemplo 1, complementos de una secuencia de polinucleótidos mostrados en el Ejemplo 1, y variantes degeneradas de una secuencia de polinucleótidos mostradas en el Ejemplo 1. Preferiblemente, las secuencias de polinucleótidos mostradas en la presente memoria codifican polipéptidos capaces de unirse preferentemente a células infectadas por Influenza A en comparación con una célula no infectada de control normal, incluyendo un polipéptido que tiene una secuencia mostrada en los Ejemplos 1 o 2. Además, los autores de la presente invención describen todos los polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido de la presente descripción.

Los autores de la presente invención también describen, variantes de polinucleótidos que tienen una identidad sustancial con las secuencias mostradas en la Figura 1, por ejemplo aquellos que comprenden una identidad de secuencia de al menos 70%, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% o más en comparación con una secuencia de polinucleótidos de esta descripción, determinada utilizando los métodos descritos en la presente memoria, (p. ej., análisis BLAST utilizando parámetros convencionales). Un experto en esta técnica reconocerá que estos valores se pueden ajustar apropiadamente para determinar la correspondiente identidad de las proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos tomando en consideración la degeneración de codones, la similitud de aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura, y similares.

Típicamente, las variantes de polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones, delecciones y/o inserciones, preferiblemente de manera que las propiedades de la unión inmunogénica del polipéptido codificado por el polinucleótido variante no disminuyan sustancialmente con respecto a un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótidos específicamente mostrada en la presente memoria.

Por lo tanto los autores de la presente invención describen fragmentos de polinucleótidos que comprenden diferentes longitudes de tramos contiguos de secuencia idénticos o complementarios a una o más de las secuencias

descritas en la presente memoria. Por ejemplo, se describen los polinucleótidos que comprenden al menos aproximadamente 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 o 1000 o más nucleótidos contiguos de una o más de las secuencias descritas en la presente memoria así como todas las longitudes intermedias entre ellas. Según se utiliza en la presente memoria, el término "longitudes intermedias" pretende describir cualquier longitud entre los valores citados, tales como 16, 17, 18, 19, etc.; 21, 22, 23, etc.; 30, 31, 32, etc.; 50, 51, 52, 53, etc.; 100, 101, 102, 103, etc.; 150, 151, 152, 153, etc.; incluyendo todos los números enteros hasta 200-500; 500-1.000, y similares.

Se describen composiciones de polinucleótidos que son capaces de hibridar en condiciones de restricción moderadas a elevadas con una secuencia de polinucleótidos proporcionada en la presente memoria, o un fragmento de la misma, o una secuencia complementaria de la misma. Los mecanismos de hibridación son bien conocidos en la técnica de la biología molecular. Con fines ilustrativos, las condiciones moderadamente restrictivas adecuadas para someter a ensayo la hibridación de un polinucleótido de esta invención con otros polinucleótidos incluyen prelavado en una solución de 5 X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a 50°C-60°C, 5 X SSC, durante la noche; seguido de lavado dos veces a 65°C durante 20 minutos con cada uno de 2X, 0,5X y 0,2X SSC que contienen SDS al 0,1%. Un experto en la técnica comprenderá que la restricción de la hibridación se puede manipular fácilmente, por ejemplo alterando el contenido de sal de la solución de hibridación y/o la temperatura a la cual se lleva a cabo la hibridación. Por ejemplo, las condiciones de hibridación altamente restrictivas incluyen las descritas más arriba, con la excepción de que se aumenta la temperatura de hibridación, p. ej., a 60-65°C o a 65-70°C.

Preferiblemente, el polipéptido codificado por la variante de polinucleótidos o fragmento tiene la misma especificidad de unión (es decir, específicamente o preferentemente se une al mismo epítipo o cepa de Influenza A) que el polipéptido codificado por el polinucleótido nativo. Más preferiblemente, los polinucleótidos descritos más arriba, p. ej., las variantes de polinucleótidos, los fragmentos y las secuencias hibridantes, codifican polipéptidos que tienen un nivel de actividad de unión de al menos aproximadamente 50%, preferiblemente al menos aproximadamente 70%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de la de la secuencia de polipéptidos específicamente mostrada en la presente memoria.

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria, o los fragmentos de los mismos, con independencia de la longitud de la propia secuencia codificante, se pueden combinar con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios para enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes, y similares, de manera que su longitud total puede variar considerablemente. Se emplea un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando limitada preferiblemente la longitud total por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante pretendido. Por ejemplo, se incluyen segmentos de polinucleótidos ilustrativos con longitudes totales de aproximadamente 10.000, aproximadamente 5.000, aproximadamente 3.000, aproximadamente 2.000, aproximadamente 1.000, aproximadamente 500, aproximadamente 200, aproximadamente 100, aproximadamente 50 pares de bases de longitud, y similares, (incluyendo todas las longitudes intermedias).

Los expertos en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, existen múltiples secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en la presente memoria. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. Sin embargo, se contemplan específicamente los polinucleótidos que codifican un polipéptido de la presente invención pero que varían debido a diferencias en el uso de codones. Adicionalmente, también se contemplan los alelos de los genes que incluyen las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente memoria. Los alelos son genes endógenos que están alterados como resultado de una o más mutaciones, tales como delecciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden tener, pero no es necesario, una estructura o función alteradas. Los alelos pueden ser identificados utilizando mecanismos convencionales (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias de las bases de datos).

Se puede realizar una mutagénesis de las secuencias de polinucleótido descritas para alterar una o más propiedades del polipéptido codificado, tales como su especificidad de unión o su fuerza de unión. Los mecanismos para la mutagénesis son bien conocidos en la técnica, y se utilizan ampliamente para crear variantes tanto de polipéptidos como de polinucleótidos. Se emplea un enfoque de mutagénesis, tal como la mutagénesis de sitio específico, para la preparación de variantes y/o derivados de los polipéptidos descritos en la presente memoria. Por medio de este enfoque, se realizan modificaciones específicas en una secuencia de polipéptidos por medio de mutagénesis de los polinucleótidos subyacentes que los codifican. Estos mecanismos proporcionan un enfoque sencillo para preparar y someter a ensayo variantes de secuencia, por ejemplo, incorporando una o más de las consideraciones anteriores, al introducir uno o más cambios en la secuencia de nucleótidos del polinucleótido.

La mutagénesis específica del sitio permite la producción de mutantes a través del uso de secuencias específicas de oligonucleótidos incluida la secuencia de nucleótidos de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia cebadora con un tamaño y una complejidad de secuencia suficientes para formar un dúplex estable en ambos lados de la conexión por delección que está siendo atravesada. Se emplean mutaciones en una secuencia de polinucleótidos seleccionada para mejorar, alterar, disminuir, modificar, o cambiar de otro modo las propiedades del propio polinucleótido, y/o alterar las propiedades, la actividad,

la composición, la estabilidad, o la secuencia primaria del polipéptido codificado.

Las secuencias de polinucleótidos descritas en la presente memoria se pueden utilizar como sondas o cebadores para la hibridación de ácidos nucleicos, p. ej., como cebadores para la PCR. La capacidad de tales sondas de ácido nucleico para hibridar específicamente con una secuencia de interés les permite detectar la presencia de secuencias complementarias en una muestra dada. Sin embargo, también son posibles otros usos, tales como el uso de la información de la secuencia para la preparación de cebadores de especies mutantes, o cebadores para su uso en la preparación de otras construcciones genéticas. Como tales, son particularmente útiles los segmentos de ácido nucleico que incluyen una región de secuencia de secuencia contigua de al menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud que tiene la misma secuencia que, o es complementaria a, una secuencia contigua de 15 nucleótidos de longitud descrita en la presente memoria. También se pueden utilizar secuencias idénticas o complementarias contiguas más largas, p. ej., las de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000 (incluyendo todas las longitudes intermedias) incluyendo las secuencias completas, y todas las longitudes intermedias.

Las moléculas de polinucleótidos que tienen regiones de secuencia que consisten en tramos de nucleótidos contiguos de 10-14, 15-20, 30, 50, o incluso de uno 100-200 nucleótidos (incluyendo también las longitudes intermedias), idénticos o complementarios a una secuencia de polinucleótidos descrita en la presente memoria, se contemplan particularmente como sondas de hibridación para su uso, p. ej., en la transferencia Southern y Northern, y/o cebadores para su uso, p. ej., en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El tamaño total del fragmento, así como el tamaño del tramo o los tramos complementarios, depende por último del uso o la aplicación pretendidos del segmento de ácido nucleico concreto. Generalmente se utilizan fragmentos más pequeños en la hibridación, en donde la longitud de la región complementaria contigua se puede variar, por ejemplo entre aproximadamente 15 y aproximadamente 100 nucleótidos, pero se pueden utilizar tramos complementarios contiguos más largos, de acuerdo con la longitud de las secuencias complementarias que se desea detectar.

El uso de una sonda de hibridación de aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud permite la formación de una molécula dúplex que es tanto estable como selectiva. Generalmente se prefieren moléculas que tienen secuencias complementarias contiguas a lo largo de tramos de más de 12 bases de longitud, aunque, con el fin de incrementar la estabilidad y la selectividad del híbrido, y de ese modo mejorar la calidad y el grado de especificidad de las moléculas híbridas específicas obtenidas. Generalmente se prefieren moléculas de ácido nucleico que tienen tramos complementarios del gen de 15 a 25 nucleótidos contiguos, o incluso más largas cuando se desee.

Las sondas de hibridación se seleccionan a partir de cualquier porción de cualquiera de las secuencias descritas en la presente memoria. Todo lo que se requiere es revisar las secuencias mostradas en la presente memoria, o cualquier porción continua de las secuencias, de aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud hasta e incluyendo la secuencia completa, que se desea utilizar como sonda o cebador. La elección de las secuencias de la sonda y el cebador está regida por diversos factores. Por ejemplo, se puede desear emplear cebadores desde los extremos de la secuencia total.

Los polinucleótidos o los fragmentos o variantes de los mismos, se preparan fácilmente, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento mediante métodos químicos, como se pone en práctica comúnmente utilizando un sintetizador de oligonucleótidos automatizado. Asimismo, se obtienen fragmentos mediante la aplicación de la tecnología de reproducción de ácidos nucleicos, tales como la tecnología de PCR(TM) de la Patente de los Estados Unidos 4.683.202, introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para la producción recombinante, y mediante otros mecanismos de ADN recombinante generalmente conocidos por los expertos en la técnica de la biología molecular.

Vectores, Células Anfitrionas y Métodos Recombinantes

Los autores de la presente invención también describen vectores y células anfitrionas que comprenden un ácido nucleico descrito en la presente memoria, así como mecanismos recombinantes para la producción de un polipéptido de la presente descripción. Los vectores incluyen aquellos susceptibles de replicación en cualquier tipo de célula u organismo, incluyendo, p. ej., plásmidos, fagos, cósmidos, y minicromosomas. Los vectores pueden ser adecuados para la propagación o replicación de un polinucleótido, o vectores adecuados para expresar un polipéptido de la presente descripción. Tales vectores son conocidos en la técnica y asequibles comercialmente.

Los polinucleótidos se sintetizan, enteros o en partes que después se combinan, y se insertan en un vector utilizando los mecanismos rutinarios de la biología molecular y celular, incluyendo, p. ej., la subclonación del polinucleótido en un vector linealizado utilizando sitios de restricción y enzimas de restricción apropiados. Los polinucleótidos se amplifican mediante reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores oligonucleótidos complementarios a cada hebra del polinucleótido. Estos cebadores también incluyen sitios de escisión para enzimas de restricción para facilitar la subclonación en un vector. Los componentes replicables del vector incluyen generalmente, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, y uno o más genes marcadores o seleccionables.

Con el fin de expresar un polipéptido de la presente descripción, se insertan las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido, o equivalentes funcionales, en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que

contiene los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificante insertada. Se utilizan los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control de la transcripción y la traducción apropiados. Estos métodos incluyen mecanismos de ADN recombinante *in vitro*, mecanismos sintéticos, y recombinación genética *in vivo*. Dichos mecanismos los describen, por ejemplo, Sambrook, J., et al. (1989) en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., y Ausubel, F. M. et al. (1989) en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.

Se utiliza una variedad de sistemas de vector de expresión/anfitrión para que contengan y expresen secuencias de polinucleótidos. Estos incluyen, pero no están limitados a, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófagos recombinantes, plásmidos, o vectores de expresión de ADN cosmídico; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus (p. ej., baculovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión de virus (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacteriana (p. ej., plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales. En una realización las regiones variables de un gen que expresa un anticuerpo monoclonal de interés se amplifican a partir de una célula de hibridoma utilizando cebadores nucleotídicos. Estos cebadores son sintetizados por un experto en la técnica, o pueden ser adquiridos de fuentes disponibles en el mercado (véase, p. ej., Stratagene (La Jolla, California), que comercializan cebadores para amplificar regiones variables de ratón y humanas. Los cebadores se utilizan para amplificar regiones variables de la cadena pesada o ligera, que después se insertan en vectores tales como ImmunoZAP(TM) H o ImmunoZAP™ L (Stratagene), respectivamente. Estos vectores se introducen después en *E. coli*, levadura, o sistemas basados en mamíferos para su expresión. Utilizando estos métodos se producen grandes cantidades de una proteína de cadena sencilla que contiene una fusión de los dominios V_H y V_L (véase Bird et al, Science 242:423-426 (1988)).

Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no traducidas del vector, p. ej., intensificadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3', que interaccionan con las proteínas celulares del anfitrión para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Tales elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema vector y del anfitrión utilizados, se utiliza cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles.

Los ejemplos de los promotores adecuados para su uso con anfitriones procarióticos incluyen el promotor phoA, los sistemas promotores de β-lactamasa y de lactosa, el promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp), y promotores híbridos tales como el promotor tac. No obstante, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contienen normalmente una secuencia de Shine-Dalgarno conectada operablemente al ADN que codifica el polipéptido. Se utilizan promotores inducibles tales como el promotor lacZ híbrido del fagémido PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, Calif.) o el plásmido PSORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) y similares.

Se conoce una variedad de secuencias promotoras para eucariotas y se puede utilizar cualquiera en los vectores descritos en la presente memoria. Virtualmente todos los genes eucarióticos tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases aguas arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada 70 a 80 bases aguas arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayor parte de los genes eucarióticos se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en los vectores de expresión eucarióticos.

En los sistemas celulares de mamíferos, se prefieren generalmente promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. La expresión de polipéptidos a partir de vectores en células anfitrionas de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del poliovirus, el virus de la viruela aviar, adenovirus (p. ej., Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (CMV), un retrovirus, virus de la hepatitis B y lo más preferiblemente Virus de Simios 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, p. ej., el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de la célula anfitriona. Si es necesario generar una línea celular que contiene múltiples copias de la secuencia que codifica un polipéptido, se pueden utilizar ventajosamente vectores basados en SV40 o EBV con un marcador seleccionable apropiado. Un ejemplo de un vector de expresión adecuado es pcDNA-3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), que incluye un promotor de CMV.

Se encuentran disponibles numerosos sistemas de expresión basados en virus para la expresión de polipéptidos en mamíferos. Por ejemplo, en los casos en los que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, se pueden ligar las secuencias que codifican un polipéptido de interés en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y una secuencia líder tripartita. Se puede utilizar la inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral para obtener un virus viable que es capaz de expresar el polipéptido en células anfitrionas infectadas (Logan, J. y Shenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659). Además, se pueden utilizar intensificadores de la transcripción, tales como el intensificador del virus del sarcoma de Rous (RSV), para incrementar la expresión en células anfitrionas de mamífero.

En sistemas bacterianos, se selecciona cualquiera de los numerosos vectores de expresión dependiendo del uso

pretendido para el polipéptido expresado. Por ejemplo, cuando se desean grandes cantidades, se utilizan los vectores que dirigen la expresión de elevado nivel de las proteínas de fusión que son fácilmente purificadas. Tales vectores incluyen, pero no están limitados a, los vectores de clonación y expresión de *E. coli* multifuncionales tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en los que se puede ligar la secuencia que codifica del polipéptido de interés en el vector en marco con las secuencias para la Met amino terminal y los 7 residuos subsiguientes de β -galactosidasa, de manera que se produce una proteína híbrida; los vectores pIN (Van Heeke, G. y S. M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509); y similares. También se utilizan los Vectores pGEX (Promega, Madison, WI) para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatona S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente de las células lisadas mediante adsorción a cuentas de glutatona-agarosa seguido de elución en presencia de glutatona libre. Las proteínas elaboradas en tales sistemas se diseñan para que incluyan heparina, trombina, o sitios de escisión para la proteasa factor XA de manera que los polipéptidos clonados de interés puedan ser liberados del radical GST a voluntad.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se utilizan numerosos vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como el factor alfa, la alcohol oxidasa, y PGH. Los ejemplos de otras secuencias promotoras adecuadas para su uso con anfitriones de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucoasa isomerasa, y glucoquinasa. Para las revisiones, véanse Ausubel *et al.* (más arriba) y Grant *et al.* (1987) Methods Enzymol. 153:516-544. Otros promotores de levadura que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento incluyen las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en la Patente Europea EP 73.657. Los intensificadores de levadura también se utilizan ventajosamente con los promotores de levadura.

En los casos en los que se utilizan vectores de expresión de plantas, la expresión de las secuencias que codifican los polipéptidos está dirigida por cualquiera de numerosos promotores. Por ejemplo, se utilizan promotores virales tales como los promotores 35S y 19S de CaMV solos o combinados con la secuencia líder omega de TMV (Takamatsu, N. (1987) EMBO J. 6:307-311. Alternativamente, se utilizan promotores de plantas como los promotores de la subunidad pequeña de RUBISCO o de choque térmico (Coruzzi, G. *et al.* (1984) EMBO J. 3:1671-1680; Broglie, R. *et al.* (1984) Science 224:838-843; y Winter, J., *et al.* (1991) Results Probl. Cell Differ. 17:85-105). Estos constructos se pueden introducir en células vegetales mediante transformación directa de ADN o transfección mediada por patógenos. Tales mecanismos se describen en numerosas revisiones generalmente disponibles (véase, *p. ej.*, Hobbs, S. o Murry, L. E. en McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, Nueva York, N.Y.; págs. 191-196).

También se utiliza un sistema de insecto para expresar un polipéptido de interés. Por ejemplo, en uno de tales sistemas, se utiliza el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes foráneos en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican el polipéptido se clonan en una región no esencial del virus, tal como el gen de la polihedrina, y se colocan bajo el control del promotor de la polihedrina. La inserción satisfactoria de la secuencia que codifica el polipéptido deja inactivo el gen de la polihedrina y produce virus recombinantes carentes de proteína de la envoltura. Después se utilizan los virus recombinantes para infectar, por ejemplo, células de *S. Frugiperda* o larvas de *Trichoplusia*, en las cuales se expresa el polipéptido de interés (Engelhard, E. K. *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:3224-3227).

También se utilizan señales de iniciación específicas para lograr una traducción más eficaz de las secuencias que codifican un polipéptido de interés. Tales señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. En los casos en los que las secuencias que codifican el polipéptido, su codón de iniciación, y las secuencias aguas arriba se insertan en el vector de expresión apropiado, pueden no ser necesarias señales de control de la transcripción o la traducción adicionales. Sin embargo, en los casos en los que solamente se inserta la secuencia codificante, o una porción de la misma, se proporcionan señales de control de la traducción exógenas incluyendo el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación está en el marco de lectura correcto para asegurar una traducción correcta del polinucleótido insertado. Los elementos traduccionales y los codones de iniciación exógenos son de diferentes orígenes, tanto naturales como sintéticos.

La transcripción de un ADN que codifica un polipéptido a menudo resulta incrementada insertando una secuencia intensificadora en el vector. Se conocen muchas secuencias intensificadoras, incluyendo, *p. ej.*, las identificadas en los genes que codifican la globina, la elastasa, la albúmina, la α -fetoproteína, y la insulina. Típicamente, sin embargo, se utiliza un intensificador de un virus de una célula eucariótica. Los ejemplos incluyen el intensificador de SV40 del lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el intensificador del promotor temprano de citomegalovirus, el intensificador del poliovirus del lado tardío del origen de replicación, y los intensificadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre los elementos intensificadores para la activación de los promotores eucarióticos. El intensificador se empalma en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia que codifica el polipéptido, pero preferiblemente se localiza en un sitio 5' con respecto al promotor.

Los vectores de expresión utilizados en células anfitrionas eucarióticas (células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos, o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contienen típicamente las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARN. Tales secuencias se encuentran disponibles comúnmente de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos en forma de fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo anti-PSCA. Un componente de la terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO 94/11026 y el vector de expresión allí descrito.

Las células anfitrionas adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en la presente memoria son las células de procariotas, de levadura, de plantas o de eucariotas superiores descritas más arriba. Los ejemplos de los procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, p. ej., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, p. ej., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, p. ej., *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (p. ej., *B. licheniformis* 41P descrito en el documento DD 266.710 publicado el 12 Abr. 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un anfitrión de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

El más ampliamente utilizada entre los microorganismos anfitriones eucarióticos inferiores es *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura panadera común. Sin embargo, se encuentran disponibles comúnmente otros numerosos géneros, especies, y cepas y se utilizan en la presente memoria, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; anfitriones de *Kluyveromyces* tales como, p. ej., *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (Patente Europea EP 402,226); *Pichia pastoris*. (Patente Europea EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (Patente Europea EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, p. ej., anfitriones de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Se puede seleccionar una cepa de una célula anfitriona por su capacidad para modular la expresión de las secuencias deseadas o para procesar la proteína expresada de la manera deseada. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no están limitadas a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación, y acilación. El procesamiento post-traducciona que escinde una forma "prepro" de la proteína también se utiliza para facilitar la inserción, el plegamiento y/o la función correctos. Se seleccionan diferentes células anfitrionas tales como CHO, COS, HeLa, MDCK, HEK293, y WI38, que tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades post-traduccionales, para asegurar una correcta modificación y procesamiento de la proteína foránea.

Los métodos y reactivos adaptados específicamente para la expresión de anticuerpos o fragmentos de los mismos también son conocidos y se encuentran disponibles en la técnica, incluyendo los descritos, p. ej., en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4816567 y 6331415. Las cadenas pesadas y ligeras, o los fragmentos de las mismas, se pueden expresar a partir del mismo vector de expresión o de vectores de expresión separados. Opcionalmente, ambas cadenas se expresan en la misma célula, facilitando de ese modo la formación de un anticuerpo funcional o fragmento del mismo.

Los anticuerpos completos, los fragmentos de anticuerpos, y las proteínas de fusión con anticuerpos se producen en bacterias, en particular cuando no son necesarias la glicosilación y la función efectora de Fc, por ejemplo cuando se conjuga el anticuerpo terapéutico con un agente citotóxico (p. ej., una toxina) y el producto inmunoconjugado muestra por sí mismo eficacia en la destrucción de las células infectadas. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véanse, p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.648.237, 5.789.199, y 5.840.523, que describen la región de inicio de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y la secreción. Después de la expresión, se aísla el anticuerpo de la pasta celular de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar, p. ej. a través de una columna de proteína A o G dependiendo de su isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo utilizando un proceso similar al utilizado para purificar anticuerpos expresados p. ej., en células CHO.

Las células anfitrionas adecuadas para la expresión de polipéptidos y anticuerpos glicosilados se obtienen de organismos multicelulares. Los ejemplos de las células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y las correspondientes células anfitrionas de insectos permisivos de anfitriones tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Se encuentra disponible al público una variedad de cepas virales para la transfección, p. ej., la variante L-I de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus se utilizan como virus, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, y tabaco también se utilizan como anfitriones.

Se describen los métodos de propagación de los polipéptidos de anticuerpos y los fragmentos de los mismos en

células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos). Los ejemplos de las líneas celulares de anfitriones mamíferos que se pueden utilizar son la línea CVI de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATGC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); las células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); las células de ovario de hámster Chino-DHFR (CHO, Urlaub et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); las células Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); las células de riñón de mono (CVI ATCC CCL 70); las células de riñón de mono verde Africano (VERO-76, ATCC CRL- 1587); las células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); las células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); las células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); las células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); las células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); las células TRI (Mather et al, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); las células MRC 5; las células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células anfitrionas se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para la producción del polipéptido y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Para la producción con un elevado rendimiento, a largo plazo de proteínas recombinantes, generalmente se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan establemente un polinucleótido de interés se transforman utilizando vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales y/o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable en el mismo vector o en un vector separado. Después de la introducción del vector, se permite el crecimiento de las células durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas a medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de las células que expresan satisfactoriamente las secuencias introducidas. Los clones resistentes de las células transformadas establemente se hacen proliferar utilizando técnicas para el cultivo de tejidos apropiadas para el tipo de célula.

Se utiliza una pluralidad de sistemas de selección para recuperar las líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero no están limitados a, los genes de la timidina quinasa del virus herpes simplex (Wigler, M. et al. (1977) Cell 11:223-32) y de la adenina fosforibosiltransferasa (Lowy, I. et al. (1990) Cell 22:817-23) que se emplean en células tk- o aprt^r, respectivamente. Asimismo, se utiliza la resistencia a, antimetabolitos, antibióticos o herbicidas como base para la selección; por ejemplo, dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, M. et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3567-70); npt, que confiere resistencia a los aminoglicósidos, neomicina y G-418 (Colbere-Garapin, F. et al. (1981) J. Mol. Biol. 150:1-14); y als o pat, que confieren resistencia a clorsulfuron y fosfotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murry, más arriba). Se han descrito genes seleccionables adicionales. Por ejemplo, trpB permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano, e hisD permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman, S. C. y R. C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8047-51). El uso de marcadores visibles ha ganado popularidad con marcadores tales como antocianinas, beta-glucuronidasa y su sustrato GUS, y luciferasa y su sustrato luciferina, que están siendo utilizados ampliamente no solo para identificar transformantes, si no también para cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable atribuible a un sistema vector específico (Rhodes, C. A. et al. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131).

Aunque la presencia/ausencia de expresión del gen marcador sugiere que el gen de interés también está presente, se confirma su presencia y su expresión. Por ejemplo, si la secuencia que codifica un polipéptido está insertada en una secuencia de un gen marcador, se identifican las células recombinantes que contienen las secuencias por medio de la ausencia de una función del gen marcador. Alternativamente, un gen marcador se coloca en tándem con una secuencia que codifica un polipéptido bajo el control de un único promotor. La expresión del gen marcador en respuesta a la inducción o selección indica normalmente también la expresión del gen en tándem.

Alternativamente, las células anfitrionas que contienen y expresan una secuencia de polinucleótidos deseada se identifican por medio de una variedad de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no están limitados a, hibridaciones ADN-ADN o ADN-ARN y mecanismos de bioanálisis o inmunoanálisis de proteínas que incluyen, por ejemplo, tecnologías basadas en membranas, soluciones, o chips para la detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos o proteínas.

Se conoce en la técnica una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de productos codificados por polinucleótidos, utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el producto. Los ejemplos no limitantes incluyen el análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), el radioinmunoanálisis (RIA), y la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se prefiere un inmunoanálisis basado en anticuerpos monoclonales, de dos sitios que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos con dos epítomos que no interfieren sobre un polipéptido para algunas aplicaciones, pero también se puede emplear un análisis de unión competitivo. Estos y otros análisis se describen, entre otros sitios, en Hampton, R. et al. (1990; *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St Paul, Minn.) y Maddox, D. E. et al. (1983; *J. Exp. Med.* 158:1211-1216).

Diferentes marcas y mecanismos de conjugación son conocidos por los expertos en la técnica y se utilizan en varios análisis de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los métodos para producir la hibridación marcada o las sondas para la PCR para detectar secuencias relacionadas con polinucleótidos incluyen el oligomarcage, el traslado de muescas, el marcate de extremos o la amplificación por PCR utilizando un nucleótido marcado. Alternativamente, las secuencias,

o cualquiera de sus porciones se clonan en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Tales vectores son conocidos en la técnica, se encuentran disponibles en el mercado, y se utilizan para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de una ARN polimerasa apropiada tal como T7, T3, o SP6 y nucleótidos marcados. Estos procedimientos se llevan a cabo utilizando una variedad de kits disponibles en el mercado. Las moléculas informadoras o marcas adecuadas que se utilizan incluyen, pero no están limitadas a, radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminescentes, o cromogénicos así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas, y similares.

El polipéptido producido por una célula recombinante es secretado o está contenido intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector utilizados. Los vectores de expresión que contienen polinucleótidos descritos en la presente memoria se diseñan para que contengan secuencias señal que dirijan la secreción del polipéptido codificado a través de una membrana celular procariótica o eucariótica.

Se puede producir un polipéptido de la descripción como un polipéptido de fusión que incluye adicionalmente un dominio polipeptídico que facilita la purificación de proteínas solubles. Tales dominios que facilitan la purificación incluyen, pero no están limitados a, péptidos quelantes metálicos tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de extensión/purificación por afinidad FLAGS (Amgen, Seattle, WA). La inclusión de secuencias conectoras escindibles tales como aquellas específicas para el Factor XA o la enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, CA) entre el dominio de purificación y el polipéptido codificado se utilizan para facilitar la purificación. Un vector de expresión ilustrativo proporciona la expresión de una proteína de fusión que contiene un polipéptido de interés y un ácido nucleico que codifica 6 residuos de histidina que precede una tiorredoxina o un sitio de escisión de enteroquinasa. Los residuos de histidina facilitan la purificación sobre IMIAC (cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados) como describen Porath, J. et al. (1992, Prot. Exp. Purif. 3:263-281) mientras el sitio de escisión de enteroquinasa proporciona un método para purificar el polipéptido deseado a partir de la proteína de fusión. Se proporciona un debate sobre los vectores utilizados para producir proteínas de fusión en Kroll, D. J. et al. (1993; DNA Cell Biol. 12:441-453).

Opcionalmente, se fusiona un polipéptido de la presente descripción con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o polipéptido. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula anfitriona. Para las células anfitrionas procarióticas, la secuencia señal se selecciona, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, la penicilinas, 1pp, o los líderes de enterotoxina II estables al calor. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal se selecciona, *p. ej.*, entre el líder de invertasa de levadura, el líder del factor α (incluyendo los líderes de factores de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión en células de mamíferos, se encuentran disponibles secuencias señal de mamífero así como líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simplex.

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el polipéptido o anticuerpo son producidos intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretados directamente al medio. Si el polipéptido o anticuerpo son producidos intracelularmente, como primera etapa, el desecho particulado, ya sean células anfitrionas o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, se descongela la pasta celular en presencia de acetato de sodio (pH 3.5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a lo largo de aproximadamente 30 min. El desecho celular se elimina por centrifugación. Cuando el polipéptido o el anticuerpo son secretados al medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se concentran primero generalmente utilizando un filtro de concentración de proteína disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Opcionalmente, se incluye un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se incluyen antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de polipéptido o anticuerpo preparada a partir de las células se purifica utilizando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el polipéptido o anticuerpo. La proteína A se utiliza para purificar anticuerpos o fragmentos de los mismos que se basan en cadenas pesadas γ_1 , γ_2 , o γ_4 humanas (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para γ_3 humana (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la cual se ancla el ligando de afinidad es muy a menudo agarosa, pero se encuentran disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como el vidrio de poro controlado o el poli(estireno-divinil)benzeno permiten velocidades de flujo mayores y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden alcanzar con agarosa. Cuando el polipéptido o el anticuerpo comprenden un dominio C_H3 , resulta útil para la purificación la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como el fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, la precipitación en etanol, la HPLC en Fase Inversa, la cromatografía sobre sílice, la cromatografía sobre heparina-SEPHAROSE™ sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poli(ácido aspártico), el cromatoforfoque, la SDS-PAGE, y la precipitación con sulfato de

amonió también se encuentran disponibles dependiendo del polipéptido o anticuerpo que se vaya a recuperar.

Después de cualquiera de las etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el polipéptido o anticuerpo de interés y los contaminantes se somete a cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferiblemente realizada a baja concentración de sal (*p. ej.*, una concentración de sal de aproximadamente 0-0,25 M).

Composiciones Farmacéuticas

La invención incluye adicionalmente formulaciones farmacéuticas que incluyen un anticuerpo de la presente invención, con un grado de pureza deseado, y un portador, excipiente, o estabilizador farmacéuticamente aceptable (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980)). En ciertas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas se preparan para aumentar la estabilidad del anticuerpo durante el almacenamiento, *p. ej.*, en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes, o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, *p. ej.*, tampones tales como acetato, Tris, fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametanio; cloruro de benzalconio; cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como serralbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparragina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; agentes isotónicos tales como trehalosa y cloruro de sodio; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensioactivos tales como polisorbato; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (*p. ej.* complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG). En ciertas realizaciones, la formulación terapéutica comprende preferiblemente el anticuerpo a una concentración entre 5-200 mg/ml, preferiblemente entre 10-100 mg/ml.

Las formulaciones en la presente memoria también contienen uno o más agentes terapéuticos adicionales adecuados para el tratamiento de la indicación concreta, *p. ej.* la infección que esté siendo tratada, o para prevenir efectos secundarios no deseados. Preferiblemente, el agente terapéutico adicional tiene una actividad complementaria al anticuerpo de la presente invención, y los dos no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, además del anticuerpo de la invención, se añade a la formulación un segundo anticuerpo o anticuerpo adicional, agente anti-viral, agente anti-infectivo y/o cardioprotector. Tales moléculas están presentes adecuadamente en la formulación farmacéutica en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos, *p. ej.* los anticuerpos de la invención, y otros agentes terapéuticos, también son atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por medio de técnicas de coacervación o por medio de polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se preparan preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de las preparaciones de liberación sostenida incluyen, pero no están limitadas a, matrices semi-permeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, *p. ej.*, películas, o microcápsulas. Los ejemplos no limitantes de las matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de los Estados Unidos Núm. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutílico.

Las formulaciones que se van a utilizar para la administración *in vivo* son preferiblemente estériles. Esto se puede lograr fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Usos Diagnósticos

Los anticuerpos y sus fragmentos, y las composiciones terapéuticas de la invención se unen específicamente o se unen preferentemente a células o tejido infectados, en comparación con las células y tejido de control normales. Así, estos anticuerpos de influenza A se utilizan para detectar células o tejidos infectados en un paciente, muestra biológica o población celular, utilizando cualquiera de una variedad de métodos diagnósticos y pronósticos, incluyendo los descritos en la presente memoria. La capacidad de un anticuerpo específico anti-M2e para detectar células infectadas depende de su especificidad de unión, que es determinada fácilmente sometiendo a ensayo su capacidad para unirse a células o tejidos infectados obtenidos de diferentes pacientes, y/o de pacientes infectados por diferentes cepas de Influenza A. Los métodos diagnósticos generalmente implican poner en contacto una muestra biológica obtenida de un paciente, tal como, *p. ej.*, sangre, suero, saliva, orina, esputo, una muestra de frotis

celular, o una biopsia de tejido, con un anticuerpo p. ej., contra HuM2e de Influenza A, y determinar si el anticuerpo se une preferentemente a la muestra en comparación con una muestra de control o un valor de corte predeterminado, indicando de ese modo la presencia de células infectadas. En realizaciones concretas, se unen al menos dos veces, tres veces, o cinco veces más anticuerpo contra HuM2e a una célula infectada en comparación con una muestra de célula o tejido normal de control apropiados. Un valor de corte predeterminado se determina, p. ej., promediando la cantidad de anticuerpo contra HuM2e que se une a varias muestras de control apropiadas diferentes en las mismas condiciones utilizadas para realizar el análisis diagnóstico de la muestra biológica que se está sometiendo a ensayo.

El anticuerpo unido se detecta utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria y conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, los métodos diagnósticos de las descripción se ponen en práctica utilizando anticuerpos HuM2e que son conjugados a una marca detectable, p. ej., un fluoróforo, para facilitar la detección de anticuerpo unido. Sin embargo, también se ponen en práctica utilizando métodos de detección secundarios del anticuerpo. Estos incluyen, por ejemplo, RIA, ELISA, precipitación, aglutinación, fijación del complemento e inmunofluorescencia.

En ciertos procedimientos, se marcan los anticuerpos contra HuM2e. La marca se detecta directamente. Las marcas ilustrativas que se detectan directamente incluyen, pero no están limitadas a, radiomarcas y fluorocromos. Alternativamente, o además, las marcas son radicales, tales como enzimas, que se deben hacer reaccionar o derivatizar para ser detectadas. Los ejemplos no limitantes de las marcas isotópicas son ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P y ^{35}S . Las sustancias fluorescentes que se utilizan incluyen, pero no están limitadas, por ejemplo, a fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, auramina, dansilo, umbeliferona, luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, lisozima, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Una marca enzimática se detecta mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas o gasométricas utilizadas en la actualidad. Muchas enzimas que se utilizan en estos procedimientos son conocidas y utilizadas por los métodos de la invención. Los ejemplos no limitantes son peroxidasa, fosfatasa alcalina, β -glucuronidasa, β -D-glucosidasa, β -D-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa más peroxidasa, galactosa oxidasa más peroxidasa y fosfatasa ácida.

Los anticuerpos se etiquetan con tales marcas mediante métodos conocidos. Por ejemplo, se utilizan agentes de acoplamiento tales como aldehídos, carbodiimidas, dimaleimida, imidatos, succinimidas, bid-benzidina diazotada y similares para etiquetar los anticuerpos con las marcas fluorescentes, quimioluminescentes, y enzimáticas anteriormente descritas. Una enzima se combina típicamente con un anticuerpo utilizando moléculas formadoras de puentes tales como carbodiimidas, peryodato, diisocianatos, glutaraldehído y similares. Morrison, en *Methods in Enzymology* 32b, 103 (1974), Syvanen et al., *J. Biol. Chem.* 284, 3762 (1973) y Bolton y Hunter, *Biochem J.* 133, 529(1973) describen diversas técnicas de marcaje.

Los anticuerpos contra HuM2e de la presente invención son capaces de diferenciar entre pacientes con y pacientes sin una infección por Influenza A, y determinar si un paciente tiene o no una infección, utilizando los análisis representativos proporcionados en la presente memoria. De acuerdo con un método, se obtiene una muestra biológica a partir de un paciente que se sospecha que tiene o se sabe que tiene una infección por Influenza A. En realizaciones preferidas, la muestra biológica incluye células del paciente. La muestra se pone en contacto con un anticuerpo contra HuM2e, p. ej., durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que anticuerpo contra HuM2e se una a las células infectadas presentes en la muestra. Por ejemplo, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo contra HuM2e durante 10 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 3 días o cualquier punto intermedio. La cantidad de anticuerpo contra HuM2e unido se determina y se compara con un valor de control, que puede ser, p. ej., un valor pre-determinado o un valor determinado a partir de una muestra de tejido normal. Un aumento de la cantidad de anticuerpo unido a la muestra del paciente en comparación con la muestra de control es indicativo de la presencia de células infectadas en la muestra del paciente.

En un método relacionado, una muestra biológica obtenida de un paciente se pone en contacto con un anticuerpo contra HuM2e durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el anticuerpo se una a las células infectadas. A continuación se detecta el anticuerpo unido, y la presencia de anticuerpo unido indica que la muestra contiene células infectadas. Esta realización es particularmente útil cuando el anticuerpo contra HuM2e no se une a células normales a un nivel detectable.

Diferentes anticuerpos contra HuM2e poseen diferentes características de unión y especificidad. Dependiendo de estas características, se utilizan anticuerpos contra HuM2e concretos para detectar la presencia de una o más cepas de Influenza A. Por ejemplo, ciertos anticuerpos se unen específicamente solo a una o varias cepas del virus de la Influenza, mientras que otros se unen a todas o a la mayoría de las diferentes cepas del virus de la Influenza. Los anticuerpos específicos para solo una cepa de Influenza A se utilizan para identificar la cepa de una infección.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos que se unen a una célula infectada generan preferiblemente una señal que indica la presencia de una infección en al menos aproximadamente 20% de pacientes en los que se está detectando la infección, más preferiblemente al menos aproximadamente 30% de pacientes. Alternativamente, o además, el

anticuerpo genera una señal negativa que indica la ausencia de la infección en al menos aproximadamente 90% de individuos sin que se esté detectando infección. Cada anticuerpo satisface los criterios anteriores; no obstante, los anticuerpos de la presente invención se utilizan combinados para mejorar la sensibilidad.

La presente invención también incluye kits útiles para la realización de análisis diagnósticos y pronósticos utilizando los anticuerpos de la presente invención. Los kits de la invención incluyen un recipiente adecuado que comprende un anticuerpo contra HuM2e de la invención en forma marcada o no marcada. Además, cuando el anticuerpo se suministra en una forma marcada adecuada para un análisis de unión indirecto, el kit incluye adicionalmente reactivos para realizar el análisis indirecto apropiado. Por ejemplo, el kit incluye uno o más recipientes adecuados que incluyen sustratos enzimáticos o agentes derivatizantes, dependiendo de la naturaleza de la marca. También se incluyen muestras de control y/o instrucciones.

Usos Terapéuticos/Profilácticos

Se ha demostrado que la inmunización pasiva es una estrategia eficaz y segura para la prevención y el tratamiento de enfermedades virales. (Véanse Keller et al., Clin. Microbiol. Rev. 13:602-14 (2000); Casadevall, Nat. Biotechnol. 20:114 (2002); Shibata et al., Nat. Med. 5:204-10 (1999); e Igarashi et al., Nat. Med. 5:211-16 (1999)). La inmunización pasiva utilizando anticuerpos monoclonales proporciona una estrategia de tratamiento inmediata para la profilaxis y el tratamiento de emergencia de la influenza.

Los anticuerpos contra HuM2e y sus fragmentos, y las composiciones terapéuticas de la invención se unen específicamente o preferentemente a las células infectadas, en comparación con las células y tejidos no infectados de control normales. De este modo, estos anticuerpos contra HuM2e se utilizan para elegir como diana selectivamente células o tejidos infectados en un paciente, muestra biológica, o población celular. A la luz de las propiedades de unión específica de la infección de estos anticuerpos, los autores de la presente invención describen en la presente memoria métodos para regular (*p. ej.*, inhibir) el crecimiento de células infectadas y métodos para destruir las células infectadas. Estos métodos incluyen poner en contacto una célula infectada con un anticuerpo contra HuM2e de la invención. Estos métodos se ponen en práctica *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo*.

Los anticuerpos de la invención pueden ser terapéuticamente activos intrínsecamente. Alternativamente, o además, los anticuerpos de la invención se conjugan con un agente citotóxico o agente inhibidor del crecimiento, *p. ej.*, un radioisótopo o toxina, que se utiliza para tratar células infectadas unidas o puestas en contacto con el anticuerpo.

Los métodos para tratar o prevenir una infección en un paciente pueden incluir las etapas de proporcionar un anticuerpo contra HuM2e de la invención a un paciente diagnosticado de, con riesgo de desarrollar, o que se sospecha que tiene una infección por Influenza A. Los métodos descritos en la presente memoria se utilizan en el tratamiento de primera línea de la infección, tratamiento de seguimiento, o en el tratamiento de una infección recurrente o refractaria. El tratamiento con un anticuerpo de la invención es un tratamiento autónomo. Alternativamente, el tratamiento con un anticuerpo de la invención es un componente o fase de un régimen de terapia combinado, en el que también se utilizan uno más agentes terapéuticos adicionales para tratar al paciente.

Los sujetos en riesgo de enfermedades o trastornos relacionados con un virus de la influenza incluyen pacientes que se han puesto en contacto con una persona infectada o que han sido expuestos al virus de la influenza de cualquier otra manera. La administración de un agente profiláctico puede ocurrir antes de la manifestación de los síntomas característicos de la enfermedad o trastorno relacionados con el virus de la influenza, de manera que una enfermedad o trastorno se previene o, alternativamente, se retrasa en su progreso.

El huM2e se puede administrar sustancialmente en el mismo momento, o después de la infección del sujeto, es decir como un tratamiento terapéutico. El anticuerpo puede proporcionar un beneficio terapéutico. Un beneficio terapéutico incluye la reducción o disminución del progreso, la gravedad, la frecuencia, la duración o la probabilidad de uno o más síntomas o complicaciones de la infección por influenza, el título de virus, la replicación de virus o la cantidad de una proteína viral de una o más cepas de influenza. Un beneficio terapéutico incluye la precipitación o aceleración de la recuperación de una infección por influenza en un sujeto.

Se describen los métodos para prevenir un aumento del título de virus de la influenza, replicación de virus, proliferación de virus o la cantidad de una proteína viral de influenza en un sujeto. Por ejemplo, un método incluye la administración al sujeto de una cantidad de un anticuerpo contra huM2e eficaz para prevenir un aumento del título del virus de la influenza, de la replicación del virus o de la cantidad de una proteína viral de la influenza de una o más cepas o productos aislados de influenza en el sujeto.

Se describen adicionalmente los métodos para proteger a un sujeto de la infección o del descenso de la susceptibilidad de un sujeto a una infección por una o más cepas/productos aislados o subtipos de influenza, es decir, los métodos profilácticos. Tal método puede incluir la administración al sujeto de una cantidad de anticuerpo huM2e que se une específicamente a M2 de influenza eficaz para proteger al sujeto de la infección, o eficaz para disminuir la susceptibilidad del sujeto a la infección, por una o más cepas/productos aislados o subtipos de influenza.

Opcionalmente, al sujeto se le administra adicionalmente un segundo agente tal como, pero no limitado a, un anticuerpo del virus de la influenza, un fármaco anti-viral tal como un inhibidor de la neuraminidasa, un inhibidor de

HA, un inhibidor de ácido siálico o un inhibidor del canal iónico de M2, un inhibidor de la entrada de virus o un inhibidor del anclaje del virus. El inhibidor del canal iónico de M2 es por ejemplo amantadina o rimantadina. El inhibidor de neuraminidasa es por ejemplo zanamivir, o fosfato de oseltamivir.

- 5 Los síntomas o complicaciones de la infección por influenza que se pueden reducir o disminuir incluyen, por ejemplo, escalofríos, fiebre, tos, dolor de garganta, congestión nasal, congestión de los senos, infección nasal, infección de los senos, dolor corporal, dolor de cabeza, fatiga, neumonía, bronquitis, infección de oído, dolor de oído o muerte.

- 10 Para el tratamiento *in vivo* de pacientes humanos y no humanos, normalmente se administra o se proporciona al paciente una formulación farmacéutica incluyendo un anticuerpo para HuM2e de la invención. Cuando se utilizan para la terapia *in vivo*, los anticuerpos de la invención se administran al paciente en cantidades terapéuticamente eficaces (es decir, cantidades que eliminan o reducen la carga viral del paciente). Los anticuerpos se administran a un paciente humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como la administración intravenosa, p. ej., en forma de embolada o infusión continua a lo largo de un período de tiempo, mediante las rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación. Los anticuerpos se pueden administrar parenteralmente, cuando sea posible, en el sitio de la célula diana, o intravenosamente. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo. Las composiciones terapéuticas de la invención se administran a un paciente o sujeto sistémicamente, parenteralmente, o localmente.

- 15 Para la administración parenteral, los anticuerpos se formulan en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión, emulsión) asociada con un vehículo parenteral, farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de tales vehículos son agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, y albúmina de suero humano al 5%. También se utilizan vehículos no acuosos tales como aceites fijados y oleato de etilo. Los liposomas se utilizan como portadores. El vehículo contiene cantidades minoritarias de aditivos tales como sustancias que intensifican la isotonicidad y la estabilidad química, p. ej., tampones y conservantes. Los anticuerpos se formulan típicamente en tales vehículos a concentraciones de aproximadamente 1 mg/ml a 10 mg/ml.

- 20 La dosis y el régimen de dosificación dependen de una variedad de factores fácilmente determinados por un médico, tales como la naturaleza de la infección y las características del agente citotóxico o el agente inhibidor del crecimiento concretos conjugados con el anticuerpo (cuando se utilizan), p. ej., su índice terapéutico, el paciente, y el historial del paciente. Generalmente, se administra a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo. Opcionalmente, la cantidad de anticuerpo administrado se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente. Dependiendo del tipo y la gravedad de la infección, una dosificación inicial candidato para su administración al paciente es de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal (p. ej., aproximadamente 0,1-15 mg/kg/dosis) de anticuerpo, ya sea, por ejemplo, en una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. El progreso de esta terapia es controlado fácilmente mediante métodos y análisis convencionales y está basado en criterios conocidos por el médico u otras personas expertas en la técnica.

- 30 Se puede administrar al paciente un producto inmunoconjugado que incluya el anticuerpo conjugado con un agente citotóxico. Preferiblemente, el producto inmunoconjugado es internalizado por la célula, dando como resultado un aumento de eficacia terapéutica del producto inmunoconjugado en la destrucción de la célula a la que se une. Preferiblemente, el agente citotóxico se dirige o interfiere el ácido nucleico en la célula infectada. Los ejemplos de tales agentes citotóxicos se han descrito anteriormente e incluyen, pero no están limitados a, maitansinoides, calicheamicinas, ribonucleasas y endonucleasas de ADN.

- 35 Otros regímenes terapéuticos se combinan con la administración del anticuerpo contra HuM2e de la presente invención. La administración combinada incluye la co-administración, utilizando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, donde existe preferiblemente un período de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Preferiblemente tal terapia combinada da como resultado un efecto terapéutico sinérgico.

Es deseable combinar la administración de un anticuerpo de la invención con otro anticuerpo dirigido a otro antígeno asociado con el agente infeccioso.

- 40 Aparte de la administración de la proteína de anticuerpo al paciente, se pueden administrar anticuerpos mediante terapia génica. Véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente PCT WO 96/07321 referente al uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos anti-M2e de la invención para determinar la estructura del antígeno unido, p. ej., epítopos conformacionales, cuya estructura se utiliza a continuación para desarrollar una vacuna que tiene o imita esta estructura, p. ej., a través de modelado químico y métodos SAR. Tal vacuna se podría utilizar a continuación para prevenir una infección por Influenza A.

55 Ejemplos

Ejemplo 1: Escrutinio y caracterización de anticuerpos específicos de M2e presentes en plasma humano utilizando células que expresan la proteína M2e recombinante

Se identificaron en suero de pacientes anticuerpos monoclonales completamente humanos específicos para M2 y susceptibles de unirse a células infectadas por influenza A y el propio virus de la influenza, como se describe más abajo.

Expresión de M2 en Líneas Celulares

- 5 Un constructo de expresión que contenía el ADNc completo de M2, correspondiente a la secuencia de M2 derivada encontrada en el subtipo H3N2 de Influenza, se transfirió en células 293.

El ADNc de M2 está codificado por la siguiente secuencia de polinucleótidos y el SEQ ID NO: 53:

```
ATGAGTCTTCTAACCGAGGTGCGAAACGCCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAAGTGATCCTCTT
GTTGTTGCCGCAAGTATCATTTGGGATCCTGCACTTGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTTTCAAATGCATTTAT
CGTCTCTTTAAACACGGTCTGAAAAGAGGGCCTCTACGGAAGGAGTACCAGAGTCTATGAGGGAAGAATATCGAAAG
GAACAGCAGAGTGCTGTGGATGCTGACGATAGTCATTTGTCAACATAGAGCTGGAG
```

- 10 La expresión en la superficie celular de M2 se confirmó utilizando MAb 14C2 específico anti-péptido M2e. Se utilizaron otras dos variantes de M2, a partir de A/Hong Kong/483/1997 (HK483) y A/Vietnam/1203/2004 (VN1203), para análisis posteriores, y su expresión se determinó utilizando anticuerpos monoclonales específicos de M2e de la presente invención, puesto que la unión de 14C2 puede ser anulada por las diversas sustituciones de aminoácido en M2e.

Escrutinio de Anticuerpos en Sangre Periférica

- 15 Se sometieron a ensayo muestras de plasma de más de 120 individuos para determinar los anticuerpos que se unen a M2. Ninguno de ellos mostró unión específica al péptido M2e. Sin embargo, 10% de las muestras de plasma contenían los anticuerpos que se unían específicamente a la línea celular H3N2 de 293-M2. Esto indica que los anticuerpos se podrían clasificar por unirse a determinantes conformacionales de un homotetrámero de M2, y unirse a determinantes conformacionales de variantes múltiples del homotetrámero de M2; éstos podrían no ser específicos para el péptido M2e lineal.

Caracterización de MAb Anti-M2

- 25 Los MAb humanos identificados a través de este procedimiento demostraron que se unían a epítomos conformacionales sobre el homotetrámero de M2. Estos se unían al transfectante 293-M2 original, así como a las otras dos variantes de M2 expresadas en las células. El Mab 14C2, además de unirse al péptido M2e, demostró ser más sensible a las secuencias variantes de M2. Por otra parte, 14C2 no se une fácilmente a los viriones de influenza, mientras que los MAb anti-M2 específicos de la conformación si lo hacen.

- 30 Estos resultados demuestran que los métodos de la descripción proporcionan la identificación de los MAb para M2 a partir de las respuestas inmunitarias humanas normales a la influenza sin necesidad de inmunización específica de M2. Se utilizan para la inmunoterapia, estos MAb completamente humanos tienen el potencial de ser mejor tolerados por los pacientes que los anticuerpos de ratón humanizados. Adicionalmente, y en contraste con 14C2 y los MAb de Gemini Biosciences, que se unen al péptido M2e lineal, los MAb de la invención se unen a epítomos conformacionales de M2, y son específicos no solo para células infectadas con la cepa A de influenza, sino también para el propio virus. Otra ventaja para los MAb de la invención es que cada uno de ellos se une a todas las variantes de M2 ya sometidas a ensayo, indicando que no están restringidos a una secuencia de aminoácidos lineal específica.

Ejemplo 2: Identificación de anticuerpos específicos de M2

- 40 Las células mononucleares o B que expresan tres de los MAb identificados en suero humano como se ha descrito en Ejemplo 1 se diluyeron en poblaciones clónicas y se indujo la producción de anticuerpos. Los sobrenadantes que contenían anticuerpos se escrutaron para determinar la unión a las células 293 FT transfectadas establemente con la proteína M2E completa de la cepa de la influenza del subtipo H3N2 de Influenza. Los sobrenadantes que mostraron tinción/unión positiva se volvieron a escrutar de nuevo sobre células 293 FT transfectadas establemente con la proteína M2E completa de la cepa de la influenza del subtipo H3N2 de Influenza y sobre células transfectadas solo con el vector como control.

- 45 Las regiones variables de los anticuerpos fueron sometidas después a clonación de rescate a partir de los pocillos de células B cuyos sobrenadantes mostraron unión positiva. Se realizaron transfecciones transitorias en células 293 FT para reconstituir y producir estos anticuerpos. Se escrutaron los sobrenadantes de los anticuerpos reconstituidos para determinar la unión a las células 293 FT transfectadas establemente con la proteína M2E completa como se ha detallado anteriormente para identificar los anticuerpos anti-M2E rescatados. Se identificaron tres anticuerpos diferentes: 8i10, 21B15 y 23K12. Se aisló un cuarto clon de anticuerpo adicional por medio de los escrutinios de rescate, 4C2. Sin embargo, no fue único y tenía la misma secuencia exacta que el clon 8i10 incluso aunque viniera de un donante diferente que el clon 8i10.

Las secuencias de las regiones variables kappa y gamma de estos anticuerpos se proporcionan más abajo.

Clon 8i10:

La región variable de LC kappa del clon 8i10 anti M2 se clonó en forma de un fragmento Hind III a BsiW 1 (véase más abajo), y es codificada por las siguientes secuencias de polinucleótidos, y el SEQ ID NO: 54 (superior) y el SEQ ID NO: 55 (inferior):

HindIII

AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTG
TTCGAAGGTGGTACCTGTACTCCCAGGAGCGAGTCGAGGACCCGAGGACGATGAGACCGAGGCTCCAC
CCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACA
GGTCTACACTGTAGGTCTACTGGGTGAGAGGTAGGAGGGACAGACGTAGACATCCTCTGTCTCAGTGGT
TCACTTGCCGGGCGAGTCAGAACATTTACAAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAAGCCC
AGTGAACGGCCCGCTCAGTCTTGTAATGTTTATAAATTTAACCATAGTCGTCTCTGGTCCCTTTCCGGG
CTAAGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGGGTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGAT
GATTCCTCGGACTAGAGACGACGTAGGCCCAACGTTTCAACCCAGGGTAGTTCCAAGTCACCGTCACCTA
CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAAC
GACCTGTCTAAAGTGAGAGTGGTAGTGGTCAGACGTTGGACTTCTAAAACGTTGAATGATGACAGTTG

BsiWI

5 AGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACAGGGTGGAGATCAAACGTACG
TCTCAATGTGAGGGGGAGAGTGAAAGCCGCTCCCTGGTCCCACCTCTAGTTTGCATGC

La traducción de región variable de LC kappa de 8i10 es la siguiente, secuencia de polinucleótidos (anterior, SEQ ID NO: 54, superior) y secuencia de aminoácidos (inferior, correspondiente al SEQ ID NO: 56):

HindIII

AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTG
M D M R V L A Q L L L G L L L L W L R G
CCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACA
A R C D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
TCACTTGCCGGGCGAGTCAGAACATTTACAAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAAGCCC
I T C R A S Q N I Y K Y L N W Y Q Q R P G K A
CTAAGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGGGTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGAT
P K G L I S A A S G L Q S G V P S R F S G S G
CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAAC
S G T D F T L T I T S L Q P E D F A T Y Y C Q

BsiWI

AGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACAGGGTGGAGATCAAACGTACG
Q S Y S P P L T F G G G T R V E I K R T

10 La secuencia de aminoácidos de la región variable de LC kappa de 8i10 es la siguiente, con dominios específicos identificados más abajo (secuencias CDR definidas de acuerdo con los métodos de Kabat):

MDMRVLAQLLGLLLLWLRGARC

Líder VK (SEQ ID NO 57)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC

FR1 (SEQ ID NO 58)

RASQNIYKYLN

CDR1(SEQ ID NO 59)

WYQQRPGKAPKGLIS

FR2 (SEQ ID NO.60)

AASGLQS

CDR2 (SEQ ID NO: 61)

GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYC

FR3 (SEQ ID NO 62)

QQSYSPPLT

CDR3 (SEQ ID NO 63)

FGGGTRVEIK

FR4 (SEQ ID NO 64)

RT

Inicio de la región constante Kappa

El siguiente es un ejemplo de la región variable de LC kappa de 8i10 clonada en el vector de expresión pcDNA3.1 que ya contenía la región constante de LC Kappa (la secuencia de polinucleótidos superior corresponde al SEQ ID NO: 65, la secuencia de polinucleótidos inferior corresponde al SEQ ID NO: 66, la secuencia de aminoácidos corresponde al SEQ ID NO: 56 mostrado anteriormente). Las bases en negro representan las secuencias del vector pcDNA3.1, las bases en azul representan las secuencias de anticuerpos clonadas. Los anticuerpos descritos en la presente memoria también se han clonado en el vector de expresión pCEP4.

GCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCT
CGAGTCGAGGACCCCGAGGACGATGAGACCGAGGCTCCACGGTCTACACTGTAGGTCTACTGGGTGAGA
A O L L G L L L L W L R G A R C D I Q M T Q S
CCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGGCGAGTCAGAACATTTAC
GCTAGGAGGGACAGACGTAGACATCCTCTGTCTCAGTGGTAGTGAACGGCCCCGCTCAGTCTTGTAATG
P S S L S L S A S V G D R V T I T C R A S Q N I Y
AAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCCAGGGAAGCCCCCTAAGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGG
TTCATAAAATTAACCATAGTCGTCTCTGGTCCCTTTTCGGGAGTTCCCGGACTAGAGACGATAGGCCCC
K Y L N W Y Q Q R P G K A P K G L I S A A S G
TTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACC
AACGTTTCACCCCAGGGTAGTTCCAAGTCACCGTCACCTAGACCCCTGTCTAAAGTGAGAGTGGTAGTGG
L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I T
AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTTTCGG
TCAGACGTTGGACTTTCTAAAACGTTGAATGATGACAGTTGTCTCAATGTACAGGGGGAGAGTGAAGCCG
S L Q P F D F A C T Y Y C Q Q S Y S P P L T F G

GGAGGGACCAGGGTGGAGATCAAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG
CCTCCCTGGTCCCACCTCTAGTTTGCATGCCACGAGCTGGTAGACAGAACTAGAAAGGGCGGTAGACTACTCGTCAACTTTAGACC
G G T R V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G

AACTGCGCTCTGTGTGTGTCCTGCTGAATAACTTCTATCCACAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAAATCGGGTAACTCCC
TTGACCGGAGACAACACACGGACGACTATTGAAATAGAGGTCTCTCCGGTTTCATGTCACTTCCACCTATTTCGCGGAGGTTAGCCGCTTTAGGGG
T A S V V C L L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S
AGGAGAGTGTTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACCAAAGTCT
TCTCTTCACAGTGTCTCGTCTCTCGTTCTCTGTCTGTGGATCTCGGAGTCTCTCGGAGACTCGCACTCGTTTCTGTCTGATGCTCTTTGTGTTCAG
Q E S V T V C Q D S K D S T Y S L S T L T L S K A D Y E K H K V

Drall (1641)
XbaI (1636)ApaI (1642)

TACGCGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAGAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGAGGGTCTAGAGGGCCCGTTTAAATCGCGGACGCTTCAGTGGGTAGTCCCGGACTCGAGCGGGCAGTGTTTCTCGAAGTTGTCCCGCTCTCACAATCTCCCGAGATCTCCCGGGCAAATTTT

Y A C E V T H O G L S S P V T K S F N R G E C

HindIII

AAGCTTCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGCTGGGT
TTCGAAGGTGGTACTTTGTGGACACCAAGAAGGAAGAGGACCACCGTCGAGGGTCGACCCA
CCTGTCCCAGGTGCAATTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTG
GGACAGGGTCCACGTTAACGTCTCTCAGCCCGGGTCCTGACCACTTCGGAAGCCTCTGGGAC
TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTTCGTCCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGGC
AGGGAGTGGACGTGACAGAGACCAAGCAGGTAGTCATTAATGATGACCTCGACCTAGGCCG
AGTCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAGTA
TCAGGGGTCCCTTCCCTGACCTCACCTAACCCTAATAGATAATGCCACCTTTGTGGTTCAT
CAATCCCTCCCTCAAGAGCCGCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAAGAGTCAGGTCTCC
GTTAGGGAGGGAGTTCTCGGCGCAGTGGTATAGTGTTCTGTGAAGGTTCTCAGTCCAGAGG
CTGACGATGAGCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTTCTGTGCGAGAGCGTCTT
GACTGCTACTCGAGACACTGGCGACGCCTTAGCCGGCAGATAAAGACACGCTCTCGCAGAA

GTAGTGGTGGTTACTGTATCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAG
CATCACCACCAATGACATAGGAAGTGTATGACCCCGGTCCCTTGGGACCAGTGGCAGAGCTC

- 43

ES 2 395 784 T3

HindIII

```

AAGCTTCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGCTGGGTC
      M K H L W F F L L L V A A P S W V
CTGTCCCAGGTGCAATTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCCTG
      L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L
TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTTCGTCCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGG
      S L T C T V S G S S I S N Y Y W S W I R
CAGTCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAG
      Q S P G K G L E W I G F I Y Y G G N T K
TACAATCCCTCCCTCAAGAGCCGCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAAGAGTCAGGTC
      Y N P S L K S R V T I S Q D T S K S Q V
TCCCTGACGATGAGCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTTCTGTGCGAGAGCG
      S L T M S S V T A A E S A V Y F C A R A
TCTTGTAGTGGTGGTTACTGTATCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
      S C S G G Y C I L D Y W G Q G T L V T V
TCGAG
S

```

La secuencia de aminoácidos de HC Gamma de 8i10 es la siguiente con dominios específicos identificados más abajo (secuencias CDR definidas de acuerdo con los métodos de Kabat):

MKHLWFFLLLVAAPSWVLS

Líder VH (SEQ ID NO: 70)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIS

FR1 (SEQ ID NO: 71)

NYYSWS

CDR1(SEQ ID NO: 72)

WIRQSPGKGLEWIG

FR2 (SEQ ID NO 73)

FIYYGGNTKYNPSLKS

CDR2 (SEQ ID NO: 74)

RVTISQDTSKSSQVSLTMSSVTAESA VYFCAR

FR3 (SEQ ID NO 75)

ASCSGGGYCILD

CDR3 (SEQ ID NO: 76)

YWGQGTLVTVS

FR4 (SEQ ID NO 77)

- 5 El siguiente es un ejemplo de la región variable de HC Gamma de 8i10 clonada en el vector de expresión pcDNA3.1 que ya contenía la región constante de HC Gamma (la secuencia de polinucleótidos superior corresponde al SEQ ID NO: 78, la secuencia de polinucleótidos inferior corresponde al SEQ ID NO: 79, la secuencia de aminoácidos corresponde al SEQ ID NO: 69 mostrado anteriormente). Las bases en negro representan las secuencias del vector pcDNA3.1, las bases en azul representan las secuencias de anticuerpos clonadas.

La región marco 4 (FR4) de HC Gamma normalmente termina con dos serinas (SS), de manera que la región marco 4 completa debe ser W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO: 80). El sitio Xho 1 aceptor y una base adicional aguas abajo del sitio Xho 1 en el vector, en el que están clonadas la región constante de HC Gamma y las regiones variables de HC Gamma, suministra las últimas bases, que codifican este aminoácido final de la región marco 4. Sin embargo, el vector original no se ajustaba a la mutación silenciosa elaborada cuando se creó el sitio Xho1 (CTCGAG, SEQ ID NO: 81) y contenía un nucleótido "A" aguas abajo del sitio Xho 1, lo que ocasionó un cambio de aminoácido en el extremo de la región marco 4: una sustitución de serina por arginina (S por R) presente en todos los clones de HC Gamma en funcionamiento. De este modo, la región marco 4 completa se lee W G Q G T L V T V S R (SEQ ID NO: 82). Están siendo creados constructos futuros en los que la base aguas abajo del sitio Xho 1 es un nucleótido "C". De este modo, la creación del sitio Xho 1 utilizado para la clonación de secuencias de la región variable de HC Gamma en realizaciones alternativas es una mutación silenciosa y restaura la secuencia de aminoácidos de la región marco 4 a su W GQGT LVT V S (SEQ ID NO: 80) apropiada. Esto se verifica para todos los clones de HC Gamma de M2 descritos en la presente memoria.

45

La región variable de LC kappa del clon 21B15 anti M2 se clonó en forma de un fragmento Hind III a BsiW1, y es codificada por las siguientes secuencias de polinucleótidos y SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84:

HindIII

AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGC
TTCGAAGGTGGTACCTGTACTCCCAGGAGCGAGTCGAGGACCCCGAGGACGATGAGACCGAGGCTCCACG
CAGATGTGACATCCAGGTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
GTCTACACTGTAGGTCCACTGGGTGAGAGGTAGGAGGGACAGACGTAGACATCCTCTGTCTCAGTGGTAG
ACTTGCCGCGCGAGTCAGAACATTTACAAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAAGCCCTA
TGAACGGCGCGCTCAGTCTTGTAATGTTTATAAATTTAACCATAGTCGTCTCTGGTCCCTTTCCGGGGAT
AGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGGGTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGG
TCCCGGACTAGAGACGAGTAGGCCCCAACGTTTACCCCGAGGTAGTTCCAAGTCACCGTCACCTAGACC
GACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGT
CTGTCTAAAGTGAGAGTGGTAGTGGTCAGACGTTGGACTTCTAAAACGTTGAATGATGACAGTTGTCTCA

BsiW1

TACAGTCCCCCTCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAGGGTGGATATCAAACGTACG
ATGTACAGGGGAGAGTGAAAGCCGCCTCCCTGGTCCCACCTATAGTTTGCATGC

- 5 La traducción de la región variable de LC kappa de 21B15 es la siguiente, secuencia de polinucleótidos (anterior, SEQ ID NO: 83, superior) y secuencia de aminoácidos (inferior, correspondiente al SEQ ID NO: 56):

HindIII

AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGT
M D M R V L A Q L L G L L L L W L R G
GCCAGATGTGACATCCAGGTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
A R C D I Q V T Q S P S S L S A S V G D R V T
ATCACTTGCCGCGCGAGTCAGAACATTTACAAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAAGCC
I T C R A S Q N I Y K Y L N W Y Q Q R P G K A
CCTAAGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGGGTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGA
P K G L I S A A S G L Q S G V P S R F S G S G
TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAA
S G T D F T L T I T S L Q P E D F A T Y Y C Q

BsiW1

CAGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAGGGTGGATATCAAACGTACG
Q S Y S P P L T F G G G T R V D I K R T

La secuencia de aminoácidos de la región variable de LC kappa de 21B15 es la siguiente, con dominios específicos identificados más abajo (secuencias CDR definidas de acuerdo con los métodos de Kabat):

MDMRVLAQLLGLLLWLRGARC

Líder VK (SEQ ID NO. 57)

DIQVTQSPSSLSASVGDRTITC

FR1 (SEQ ID NO: 58)

RASQNIYKYL N

CDR1 (SEQ ID NO. 59)

WYQQRPGKAPKGLIS

FR2 (SEQ ID NO: 60)

AASGLQS

CDR2 (SEQ ID NO 61)

GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYC

FR3 (SEQ ID NO: 62)

QQSYSPPLT

CDR3 (SEQ ID NO: 63)

FGGGTRVDIK

FR4 (SEQ ID NO: 64)

RT

Inicio de la región constante Kappa

- 10 El cebador utilizado para clonar la región variable de LC kappa se extendía a través de una región de diversidad y tenía una posición para bases de tambaleo en su diseño. De este modo, en la región marco 4 podría aparecer un aminoácido D o E. En algunos casos, el aminoácido en esta posición en el anticuerpo rescatado podía no ser el aminoácido parental original que fue producido en la célula B. En la mayoría de las LC kappa la posición es una E. Observando el clon anterior (21B15) se observó una D en el marco 4 (DIKRT) (SEQ ID NO: 84). Sin embargo, Observando los aminoácidos circundantes, esto puede haber ocurrido como resultado del cebador y puede ser un artefacto. El anticuerpo nativo de la célula B puede haber tenido una E en esta posición.
- 15

La región variable HC Gamma de 21B15 se clonó en forma de un fragmento Hind III a Xho 1, y está codificada por las siguientes secuencias de polinucleótidos y el SEQ ID NO: 85 (superior), y el SEQ ID NO: 86 (inferior):

HindIII

AAGCTTCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGCTGGGTCC
TTCGAAGGTGGTACTTTGTGGACACCAAGAAGGAAGAGGACCACCGTCGAGGGTCGACCCAGG
TGTCCCAGGTGCAATTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCC
ACAGGGTCCACGTTAACGTCCTCAGCCCGGGTCTGACCACTTCGGAAGCCTCTGGGACAGGG
TCACCTGCACCTGTCTCTGGTTCGTCCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGTCCC
AGTGGACGTGACAGAGACCAAGCAGGTAGTCATTAATGATGACCTCGACCTAGGCCGTCAGGG
CAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAGTACAATCCCT
GTCCCTTCCCTGACCTCACCTAACCCAAATAGATAATGCCACCTTTGTGGTTCATGTTAGGGA
CCCTCAAGAGCCGCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAAGAGTCAGGTCTCCCTGACGATGA
GGGAGTTCTCGGCGCAGTGGTATAGTGTTCTGTGAAGGTTCTCAGTCCAGAGGGACTGCTACT
GCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTTCTGTGCGAGAGCGTCTTGTAGTGGTGGTT
CGAGACACTGGCGACGCCTTAGCCGGCAGATAAAGACACGCTCTCGCAGAACATCACCACAA

XhoI

ACTGTATCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG
TGACATAGGAAGTATGACCCCGGTCCCTTGGGACCAGTGGCAGAGCTC

La traducción de HC Gamma de 21B15 es la siguiente, la secuencia de polinucleótidos (anterior, SEQ ID NO: 87, superior) y la secuencia de aminoácidos (inferior, correspondiente al SEQ ID NO: 69):

HindIII

AAGCTTCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGCTGGGTCC
M K H L W F F L L L V A A P S W V
CTGTCCCAGGTGCAATTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCC
L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S
CTCACCTGCACCTGTCTCTGGTTCGTCCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGTCC
L T C T V S G S S I S N Y Y W S W I R Q S
CCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAGTACAATCCC
P G K G L E W I G F I Y Y G G N T K Y N P
TCCCTCAAGAGCCGCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAAGAGTCAGGTCTCCCTGACGATG
S L K S R V T I S Q D T S K S Q V S L T M
AGCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTTCTGTGCGAGAGCGTCTTGTAGTGGTGGT
S S V T A A E S A V Y F C A R A S C S G G
TACTGTATCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG
Y C I L D Y W G Q G T L V T V S

XhoI

- 5 La secuencia de aminoácidos de HC Gamma de 21B15 es la siguiente, con dominios específicos identificados más abajo (secuencias CDR definidas de acuerdo con los métodos de Kabat):

MKHLWFFLLLVAAPSWVLS

Líder VH (SEQ ID NO: 70)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIS

FR1 (SEQ ID NO: 71)

NYYSWS

CDR1 (SEQ ID NO: 72)

WIRQSPGKGLEWIG

FR2 (SEQ ID NO: 73)

FIYYGGNTKYNPSLKS

CDR2 (SEQ ID NO: 74)

RVTISQDTSKSKVSLTMSSVTAESA VYFCAR

FR3 (SEQ ID NO: 75)

ASCSGGYCILD

CDR3 (SEQ ID NO: 76)

YWQGGLTVTS

FR4 (SEQ ID NO: 77)

Clon 23K12:

La región variable de LC kappa del clon 23K12 anti M2 se clonó en forma de un fragmento Hind III a BsiW1 (véase más abajo), y se codifica mediante las siguientes secuencias de polinucleótidos SEQ ID NO: 88 (superior) y SEQ ID NO: 89 (inferior).

10

HindIII

AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGG
 TTCGAAGGTGGTACCTGTACTCCCAGGAGCGAGTCGAGGACCCCGAGGACGATGAGACCGAGGCTCC
 TGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC
 ACGGTCTACACTGTAGGTCTACTGGGTGAGAGGTAGGAGGGACAGACGTAGACATCCTCTGTCTCAG
 ACCATCACTTGCCGGACAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAACAGGGA
 TGGTAGTGAACGGCCTGTTTCAGTCTCGTAATCGTCGATAAAATTTAACCATAGTCGTCTTTGGTCCCT
 AAGCCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGG
 TTCGGGGGATTTGAGGACTAGATACGACGTAGGTCAAACGTTTACCCCCAGGGTAGTTCCAAGTCACC
 CAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACCTAC
 GTCACCTAGACCCTGTCTAAAGTGAGAGTGGTAGTCGCCAGACGTTGGACTTCTAAAACGTTGGATG
 TACTGTCAACAGAGTTACAGTATGCCTGCCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACG
 ATGACAGTTGTCTCAATGTACATACGGACGGAAACCGGTCCCCTGGTTTCGACCTCTAGTTTGCATGC

BsWI

La traducción de la región variable de LC kappa de 23K12 es la siguiente, la secuencia de polinucleótidos (anterior, SEQ ID NO: 90, superior) y la secuencia de aminoácidos (inferior, correspondiente al SEQ ID NO: 91).

HindIII

AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGG
 M D M R V L A Q L L G L L L L W L R G
 TGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC
 A R C D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V
 ACCATCACTTGCCGGACAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAACAGGGA
 T I T C R T S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G
 AAGCCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGG
 K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G
 CAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACCTAC
 S G S G T D F T L T I S G L Q P E D F A T Y
 TACTGTCAACAGAGTTACAGTATGCCTGCCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACG
 Y C Q Q S Y S M P A F G Q G T K L E I K R T

BsWI

- 5 La secuencia de aminoácidos de la región variable de LC kappa de 23K12 es la siguiente, con dominios específicos identificados más abajo (secuencias CDR definidas de acuerdo con los métodos de Kabat):

MDMRVLAQLLGLLLLWLRGARC

Líder VK (SEQ ID NO: 57)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC

FR1 (SEQ ID NO: 58)

RTSQSISSYLN

CDR1 (SEQ ID NO: 92)

WYQQKPGKAPKLLIY

FR2 (SEQ ID NO: 93)

AASSLQSGVPSRF

CDR2 (SEQ ID NO 94)

SGSGSGTDFLTISGLQPEDFATYYC

FR3 (SEQ ID NO: 95)

QQSYSPMA

CDR3 (SEQ ID NO 96)

FGQGTLKLEIK

FR4 (SEQ ID NO. 114)

RT

Inicio de la región constante de LC Kappa

La región variable de HC Gamma de 23K12 se clonó en forma de un fragmento Hind III a Xho I, y es codificada por las siguientes secuencias de polinucleótidos y el SEQ ID NO: 97 (superior) y el SEQ ID NO: 98 (inferior).

HindIII

AAGCTTCCACCATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGT
 TTCGAAGGTGGTACCTCAACCCCGACACGACCCAAAAGGAACAACGATAAAATTTTCCACAGGTCA
 GTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAATCTCCT
 CACTCCACGTCGACCACCTCAGACCCCTCCGAACCAGGTCGGACCCCCCAGGGACTCTTAGAGGA
 GTGCAGCCTCTGGATTCAACGTCAGTAGCAACTACATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG
 CACGTCCGAGACCTAAGTGGCAGTCATCGTTGATGTACTCAACCCAGGCGGTCCGAGGTCCCTTCC
 GGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCA
 CCGACCTCACCCAGAGTCAATAAATATCACCACCATCGTGTATGATGCGTCTGAGGCACTTCCCGT
 GATTCTCCTTCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACACAGTGTTCCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
 CTAAGAGGAAGAGGTCTCTGTTGAGGTTCTTGTGTACAAAGAAGTTTACTTGTGCGACTCTCGGC
 AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATGTCTGAGCAGGATGCGGGGTACGGTTTAGACGTCT
 TCCTGTGCCGACACATAATGACACGCTCTACAGACTCGTCTACGCCCCAATGCCAAATCTGCAGA
 XhoI
 GGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCGAG
 CCGCGGTTCCCTGGTGCCAGTGGCAGAGCTC

La traducción de la región variable de HC Gamma de 23K12 es la siguiente, la secuencia de polinucleótidos (anterior, SEQ ID NO: 99, superior), y la secuencia de aminoácidos (inferior, correspondiente al SEQ ID NO: 100):

HindIII

AAGCTTCCACCATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTTTAAAAGGTGTCCAG
 M E L G L C W V F L V A I L K G V Q
 TGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAATCTCC
 C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R I S
 TGTGCAGCCTCTGGATTCAACGTCAGTAGCAACTACATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
 C A A S G F T V S S N Y M S W V R Q A P G K
 GGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC
 G L E W V S V I Y S G G S T Y Y A D S V K G
 AGATTCTCCTTCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACACAGTGTTCCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
 R F S F S R D N S K N T V F L Q M N S L R A
 GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATGTCTGAGCAGGATGCGGGGTACGGTTTAGACGTCT
 E D T A V Y Y C A R C L S R M R G Y G L D V
 XhoI
 TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCGAG
 W G Q G T T V T V S

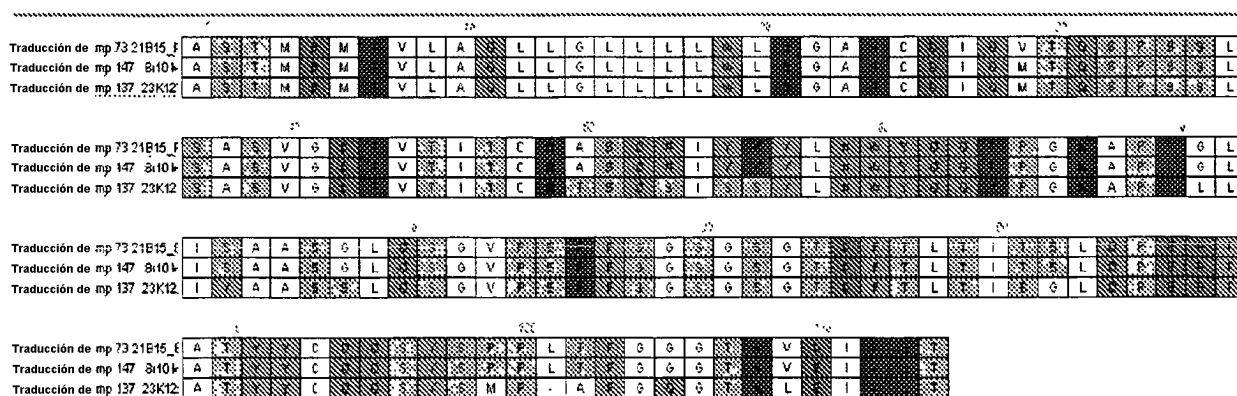
- 5 La secuencia de aminoácidos de la región variable HC Gamma de 23K12 es la siguiente, con dominios específicos identificados más abajo (secuencias CDR definidas de acuerdo con los métodos de Kabat):

<u>MELGLCWVFLVAILKGVQC</u>	Líder VH (SEQ ID NO 101)
<u>EVOLVESGGGLVQPGGSLRISCAASGFTVS</u>	FR1 (SEQ ID NO: 102)
<u>SNYMS</u>	CDR1 (SEQ ID NO 103)
<u>WVRQAPGKGLEWVS</u>	FR2 (SEQ ID NO: 104)
<u>VIYSGGSTYYADSVK</u>	CDR2 (SEQ ID NO 105)
<u>GRFSFSRDNSKNTVFLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u>	FR3 (SEQ ID NO: 106)
<u>CLSRMRGYGLDV</u>	CDR3 (SEQ ID NO: 107)
<u>WGQGTTVTVS</u>	FR4 (SEQ ID NO: 108)

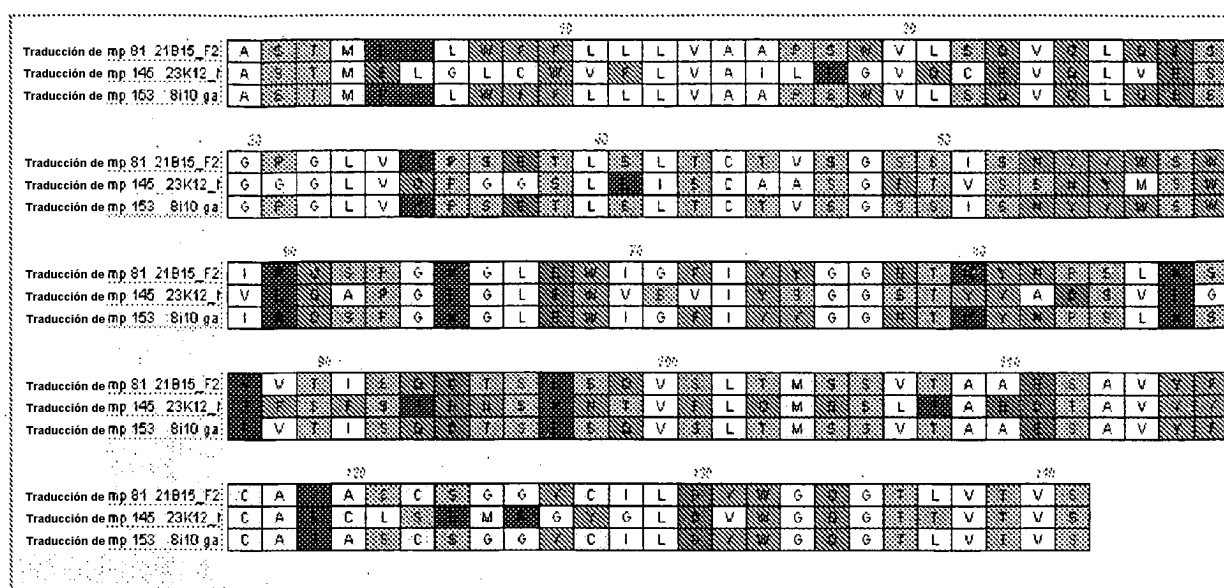
Ejemplo 3: Identificación de regiones variables de anticuerpos conservadas

Las secuencias de aminoácidos de las tres regiones variables de LC Kappa y HC Gamma del anticuerpo se alinearon para identificar regiones y residuos conservados, como se muestra más abajo.

- 10 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de LC kappa de los tres clones:



Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de HC Gamma de los tres clones:



5 En LC Kappa solo en un aminoácido de la posición 4 en la región marco 1 (aminoácidos M contra V, véase lo anterior), (excluyendo la posición de tambaleo D contra E en el marco 4 de LC Kappa).

Las comparaciones de secuencias de las regiones variables de los anticuerpos revelaron que la cadena pesada del clon 8i10 estaba derivada de la secuencia de la línea germinal IgHV4 y que la cadena ligera estaba derivada de la secuencia de la línea germinal IgKV1.

10 Las comparaciones de secuencia de las regiones variables de los anticuerpos revelaron que la cadena pesada del clon 21B15 estaba derivada de la secuencia de la línea germinal IgHV4 y que la cadena ligera estaba derivada de la secuencia de la línea germinal IgKV1.

Las comparaciones de secuencia de las regiones variables de los anticuerpos revelaron que la cadena pesada del clon 23K12 estaba derivada de la secuencia de la línea germinal IgHV3 y que la cadena ligera estaba derivada de la secuencia de la línea germinal IgKV1.

Ejemplo 4: Producción y caracterización de anticuerpos para M2

Los anticuerpos descritos anteriormente se produjeron en cantidades en miligramos mediante transfecciones transitorias a mayor escala en células 293 PEAK. Se utilizaron sobrenadantes de anticuerpos no purificados brutos para examinar la unión del anticuerpo a virus influenza A/Puerto Rico/8/1932 (PR8) sobre placas de ELISA, y se compararon con la unión del anticuerpo de control 14C2, que también fue producido mediante transfección transitoria a mayor escala. Los anticuerpos monoclonales humanos recombinantes anti-M2 se unieron a influenza mientras que el anticuerpo de control no lo hizo (Figura 9).

La unión también se sometió a ensayo sobre células MDCK infectadas con el virus PR8 (Figura 10). El anticuerpo de control 14C2 y los tres clones anti M2E: 8I10, 21B15 y 23K12, mostraron todos unión específica a la proteína M2 expresada sobre la superficie de células infectadas con PR8. No se observó unión sobre las células no infectadas.

Los anticuerpos se purificaron sobre columnas de proteína A a partir de los sobrenadantes. El análisis FACs se realizó utilizando anticuerpos purificados a una concentración de 1 µg por ml para examinar la unión de los anticuerpos a células 293 PEAK transfectadas transitoriamente que expresaban las proteínas M2 sobre la superficie celular. La unión se midió sometiendo a ensayo la unión a células simuladamente transfectadas y células transfectadas transitoriamente con proteínas M2 del subtipo H3N2 de Influenza A/Vietnam/1203/2004 (VN1203), o de A/Hong Kong/483/1997 HK483. Como control positivo se utilizó el anticuerpo 14C2. Los controles con anticuerpo no teñido y secundario solo ayudaron a determinar el fondo. Se observó tinción específica para las células transfectadas con la proteína M2 para los tres clones. Además, los tres clones se unieron muy bien a las proteínas M2 de las cepas muy patógenas A/Vietnam/1203/2004 y A/Hong Kong/483/1997, mientras que el control positivo 14C2 que se unían bien a la proteína M2 de H3N2, se unía mucho más débilmente a la proteína M2 de A/Vietnam/1203/2004 y no se unía a la proteína M2 de A/Hong Kong/483/1997. Véase la Figura 11.

Los anticuerpos 21B15, 23K12, y 8I10 se unían a la superficie de las células HEK 293 que expresaban establemente la proteína M2, pero no a las células transfectadas con el vector (véase la Figura 1). Además, no hubo competencia en la unión de estos anticuerpos por la presencia de 5 mg/ml de un péptido M2 de 24 unidades, mientras que la unión del anticuerpo 14C2 quimérico de control con región V de ratón/kappa de IgG 1 humana (hu14C2) generado contra el péptido M2 lineal fue inhibida completamente por el péptido M2 (véase la Figura 1). Estos datos confirman que estos anticuerpos se unen a epítopos conformacionales presentes en M2e expresada sobre la superficie de la célula o del virus, en oposición al péptido M2e lineal.

Ejemplo 5: Unión viral de anticuerpos monoclonales humanos anti-influenza

Se cultivó en placa virus de influenza A (A/PR/8/34) inactivado mediante UV (Applied Biotechnologies) en placas MaxiSorp de 384 pocillos (Nunc) a 1,2 µg/ml en PBS, con 25 µl/pocillo, y se incubó a 4°C durante la noche. Las placas se lavaron a continuación tres veces con PBS, y se bloquearon con leche en polvo desnatada al 1% en PBS, 50 µl/pocillo, y después se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hr. Después de un segundo lavado con PBS, se añadieron los MAb a las concentraciones indicadas por triplicado, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de otro lavado con PBS, se añadieron a cada pocillo 25 µl de una dilución 1/5000 de anti-Fc de IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Pierce) en PBS/Leche al 1%, y las placas se dejaron a temperatura ambiente durante 1 hr. Después del lavado final con PBS, se añadió el sustrato para HRP 1-Step™ Ultra-TMB-ELISA (Pierce) a 25 µl/pocillo, y la reacción prosiguió en oscuridad a temperatura ambiente. El análisis se detuvo con 25 µl/pocillo de H₂SO₄ 1N, y se leyó la absorbancia de luz a 450 nm (A450) en un lector de placas SpectroMax Plus. Los datos se normalizaron a la absorbancia de la unión de MAb 8I10 a 10 µg/ml. Los resultados se muestran en las Figuras 2A y 2B.

Ejemplo 6: Unión de anticuerpos monoclonales anti-influenza humanos a variantes de M2 completas

Las variantes de M2 (incluyendo aquellas con un fenotipo de alta patología in vivo) se seleccionaron para su análisis. Véase la Figura 3A para las secuencias.

Los constructos de ADNc de M2 se transfectaron transitoriamente en células HEK293 y se analizaron como sigue: Para analizar los transfectantes transitorios mediante FACS, las células sobre placas de cultivo de tejido de 10 cm se trataron con 0,5 ml de Tampón de Disociación Celular "Cell Dissociation Buffer" (Invitrogen), y se cosecharon. Las células se lavaron en PBS que contenía FBS al 1%, NaN₃ al 0,2% (tampón FACS), y se resuspendieron en 0,6 ml de tampón FACS con un suplemento de 100 µg/ml de IgG de conejo. Cada transfectante se mezcló con los MAb indicados a 1 µg/ml en 0,2 ml de tampón FACS, con 5 x 10⁵ a 10⁶ células por muestra. Las células se lavaron tres veces con tampón FACS, y cada muestra se resuspendió en 0,1 ml que contenían 1 µg/ml de anti-IgG humana H+L alexafluor (AF) 647 (Invitrogen). Las células se lavaron de nuevo y se realizó la citometría de flujo en un dispositivo FACSCanto (Becton-Dickenson). Los datos se expresan como un porcentaje de la fluorescencia media del transfectante transitorio M2-D20. Los datos para la unión de la variante son representativos de 2 experimentos. Los datos para los mutantes de alanina son lecturas medias de 3 experimentos separados con error típico. Los resultados se muestran en las Figuras 3B y 3C.

Ejemplo 7: Mutagénesis de barrido con alanina para evaluar la unión a M2

Para evaluar los sitios de unión al anticuerpo, la alanina fue sustituida en las posiciones de aminoácidos individuales según se indica mediante mutagénesis dirigida al sitio.

Los constructos de ADNc M2 se transfectaron transitoriamente en células HEK293 y se analizaron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 6. Los resultados se muestran en la Figura 4A y 4B. La Figura 8 muestra que el epítopo se encuentra en una región altamente conservada del extremo amino del polipéptido M2. Como se muestra en las Figuras 4A, 4B y la Figura 8, el epítopo incluye la serina en la posición 2, la treonina en la posición 5 y el ácido glutámico en la posición 6 del polipéptido M2.

Ejemplo 8: Bloqueo de epítopos

Para determinar si los MAb 8I10 y 23K12 se unen al mismo sitio, se expresó establemente la proteína M2 que representaba la secuencia de la cepa de influenza A/HK/483/1997 en la línea celular CHO (Ovario de Hámster

- Chino) DG44. Las células se trataron con Tampón de Disociación Celular (Invitrogen), y se cosecharon. Las células se lavaron en PBS que contenía FBS al 1%, NaN_3 al 0,2% (tampón FACS), y se resuspendieron a 10^7 células/ml en tampón FACS con un suplemento de IgG de conejo de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células se pre-unieron mediante cualquier MAb (o el control 2N9) a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 1 hr a 4°C , y a continuación se lavaron con tampón FACS. A continuación se utilizó AF647-8I10 o -23K12 (marcado con el Kit de marcaje de Proteínas AlexaFluor® 647 (Invitrogen)) conjugado directamente para teñir las muestras celulares pre-bloqueadas a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para 10^6 células por muestra. Los análisis de citometría de flujo prosiguieron como antes con el FACSCanto. Los datos son lecturas promedio de 3 experimentos separados con error típico. Los resultados se muestran en la Figura 5.
- 5
- Ejemplo 9: Unión de anticuerpos monoclonales humanos anti-influenza a variantes de M2 y péptidos truncados de M2
- 10
- La reactividad cruzada de los mAb 8i10 y 23K12 con otras variantes peptídicas de M2 se evaluó mediante ELISA. Las secuencias de los péptidos se muestran en las Figuras 6A y 6B. Adicionalmente, se utilizó un ELISA similar para determinar la actividad de unión a los péptidos truncados de M2.
- En resumen, cada péptido se revistió a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre una placa de 384 pocillos de fondo plano (Nunc) en 25 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de tampón PBS durante la noche a 4°C . Las placas se lavaron tres veces y se bloquearon con Leche al 1%/PBS durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces, se añadieron los títulos de los MAb y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Se añadió anti-Fc de inmunoglobulina humana específico de cabra conjugada con HRP diluida (Pierce) a cada pocillo después de lavar tres veces. Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y se lavaron tres veces. Se añadió 1-Step™ Ultra-TMB-ELISA (Pierce) a 25 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$, y la reacción prosiguió en la oscuridad a temperatura ambiente. El análisis se detuvo con 25 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de H_2SO_4 1N, y se leyó la absorbancia de luz a 450 nm (A450) en un lector de placas SpectroMax Plus. Los resultados se muestran en las Figuras 6A y 6B.
- 15
- 20
- Ejemplo 10: Evaluación in vivo de la capacidad de los anticuerpos monoclonales humanos anti-influenza para proteger de la sensibilización viral letal
- 25
- Se sometió a ensayo la capacidad de los anticuerpos, 23K12 y 8I10, para proteger ratones de la sensibilización viral letal con una cepa de influenza aviar muy patógena.
- Se distribuyeron al azar ratones BALB/c hembra en 5 grupos de 10. Un día antes (Día -1 (menos uno)) y dos días después de la infección (Día +2 (más dos)) se administraron 200 μg de anticuerpo a través de una inyección intraperitoneal de 200 μL . El día 0 (cero), se administró intranasalmente una DL90 (dosis letal 90) aproximada de virus de la influenza A/Vietnam/1203/04, en un volumen de 30 μL . Se observó la tasa de supervivencia del Día 1 al Día 28 post-infección. Los resultados se muestran en la Figura 7.
- 30

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-ectodominio de la matriz 2 (M2e) completamente humano aislado,
 en donde dicho anticuerpo comprende una región CDR1 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de NYYWS (SEQ ID NO: 72); una región CDR2 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de
 5 FIYYGGNTKYNPSLKS (SEQ ID NO: 74); una región CDR3 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de ASCSGGYCILD (SEQ ID NO: 76); una región CDR1 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQNIYKYLN (SEQ ID NO: 59); una región CDR2 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de AASGLQS (SEQ ID NO: 61); y una región CDR3 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos QQSYSPPLT (SEQ ID NO: 63), o
- 10 en donde dicho anticuerpo comprende una región CDR1 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SNYMS (SEQ ID NO: 103); una región CDR2 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de VIYSGGSTYY ADSVK (SEQ ID NO: 105), una región CDR3 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de CLSRMRGYGLDV (SEQ ID NO: 107); una CDR1 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de RTSQSISSYLN (SEQ ID NO: 92); una región CDR2 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de
 15 AASSLQSGVPSRF (SEQ ID NO: 94); y una región CDR3 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de QQSYSMMPA (SEQ ID NO: 96).
2. El anticuerpo de acuerdo con reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo está conectado operablemente a un agente terapéutico o una marca detectable.
3. Una composición que comprende el anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende adicionalmente
 20 opcionalmente un fármaco antiviral, un inhibidor de la entrada viral o un inhibidor del anclaje viral.
4. La composición de la reivindicación 3 que comprende adicionalmente un fármaco anti-viral, en donde dicho fármaco anti-viral es un inhibidor de neuraminidasa tal como zanamivir o fosfato de oseltamivir; un inhibidor de HA; un inhibidor de ácido siálico; o un inhibidor del canal iónico de M2 tal como amantadina o rimantadina.
5. La composición de la reivindicación 3 que comprende adicionalmente un segundo anticuerpo anti-influenza A.
- 25 6. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso como medicamento.
7. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por el virus de la influenza.
- 30 8. Un método para determinar la presencia de una infección por virus de la influenza en un paciente, que comprende las etapas de:
 - (a) poner en contacto una muestra biológica obtenida del paciente con el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2;
 - (b) detectar una cantidad del anticuerpo que se une a la muestra biológica; y
 - (c) comparar la cantidad de anticuerpo que se une a la muestra biológica a un valor de control; y determinar de
 35 allí la presencia del virus de la influenza en el paciente.
9. Un kit diagnóstico que comprende el anticuerpo de acuerdo con reivindicación 1-2.

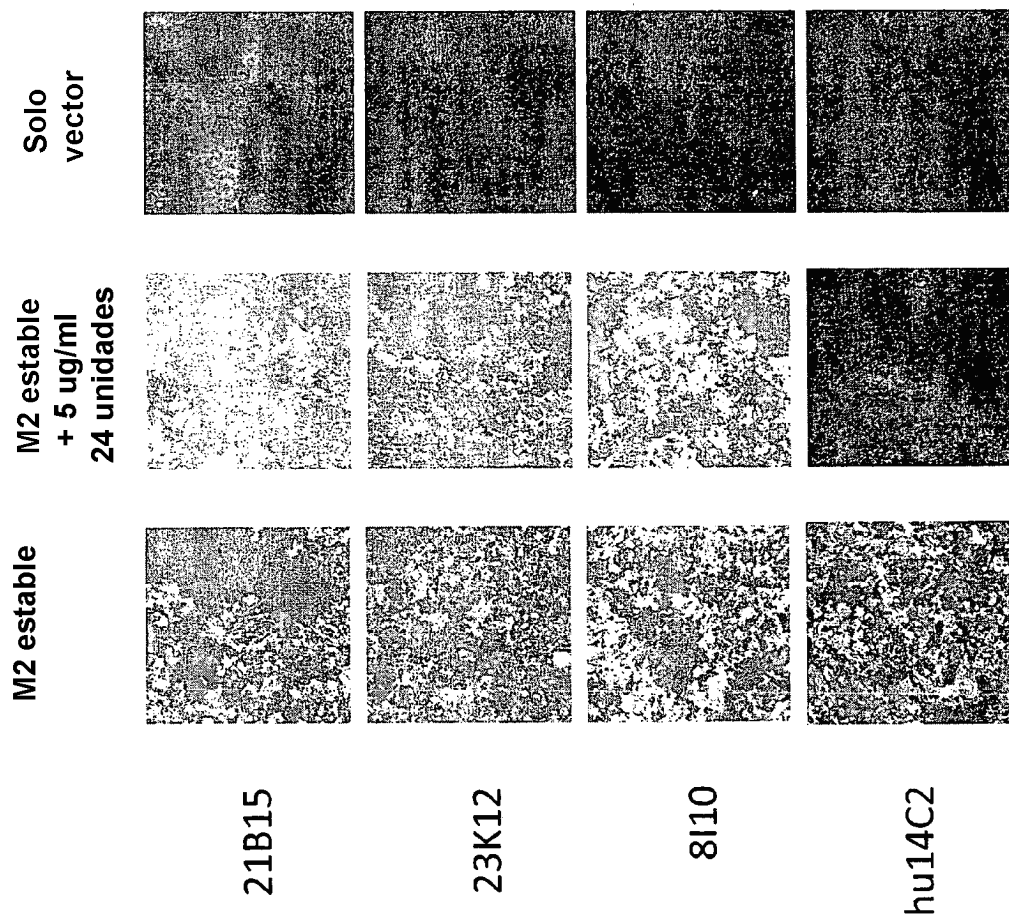
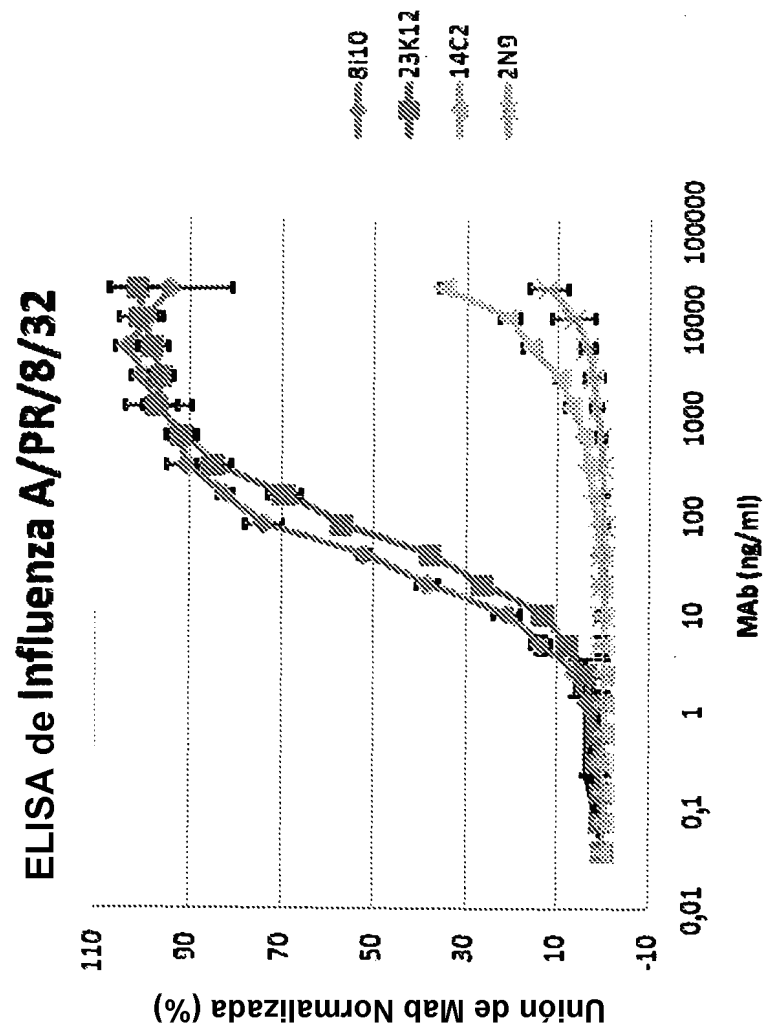


Figura 1

Figura 2A. Unión Viral



(Con Z3G1)

Figura 2B Unión Viral

ELISA de Influenza A/PR/8/32

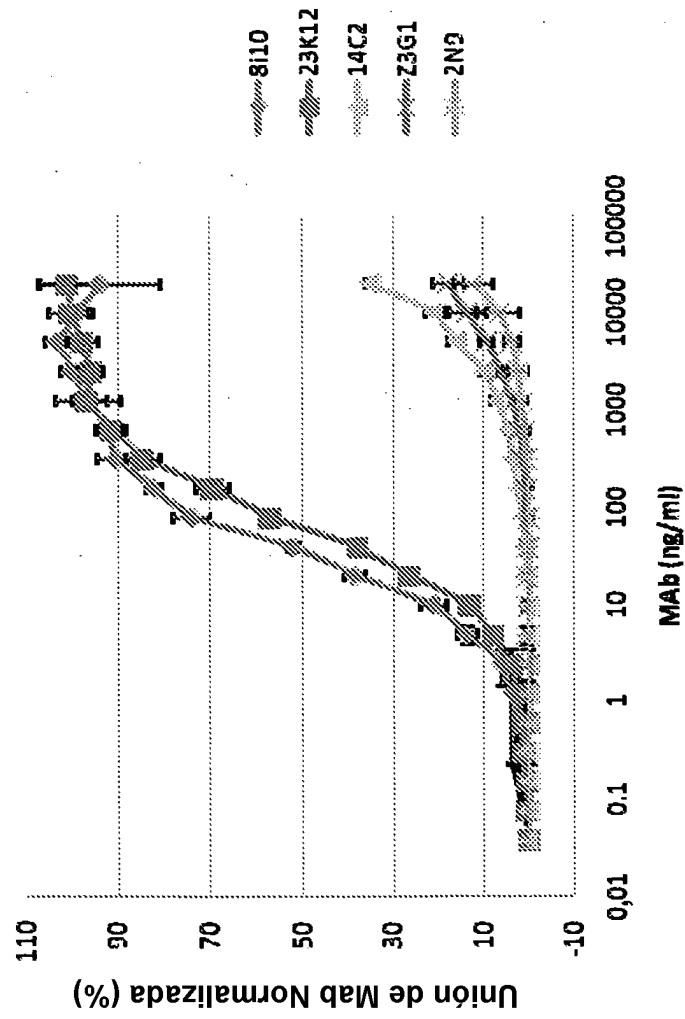
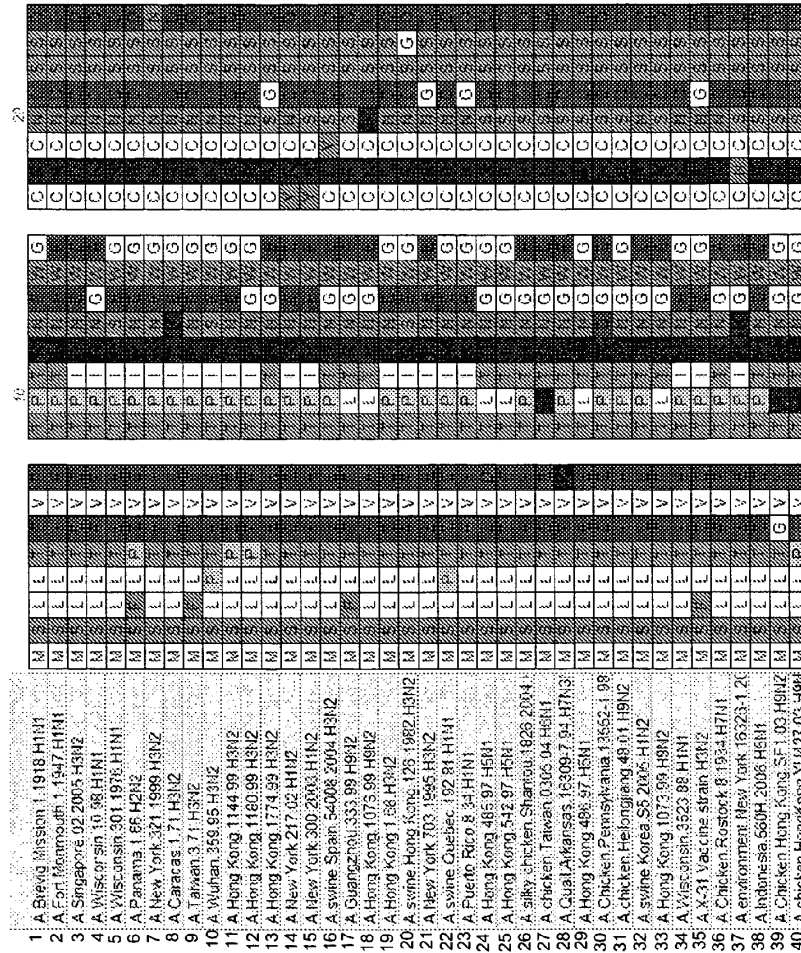


Figura 3A Unión variante M2 completa

Secuencias de Aminoácidos de Dominios Extracelulares de Variantes de M2



La secuencia extracelular de D20 es idéntica al núm.19, HK483 al núm.29, y VN1 a

Figura 3B Unión variante M2 completa (con Z3G1)

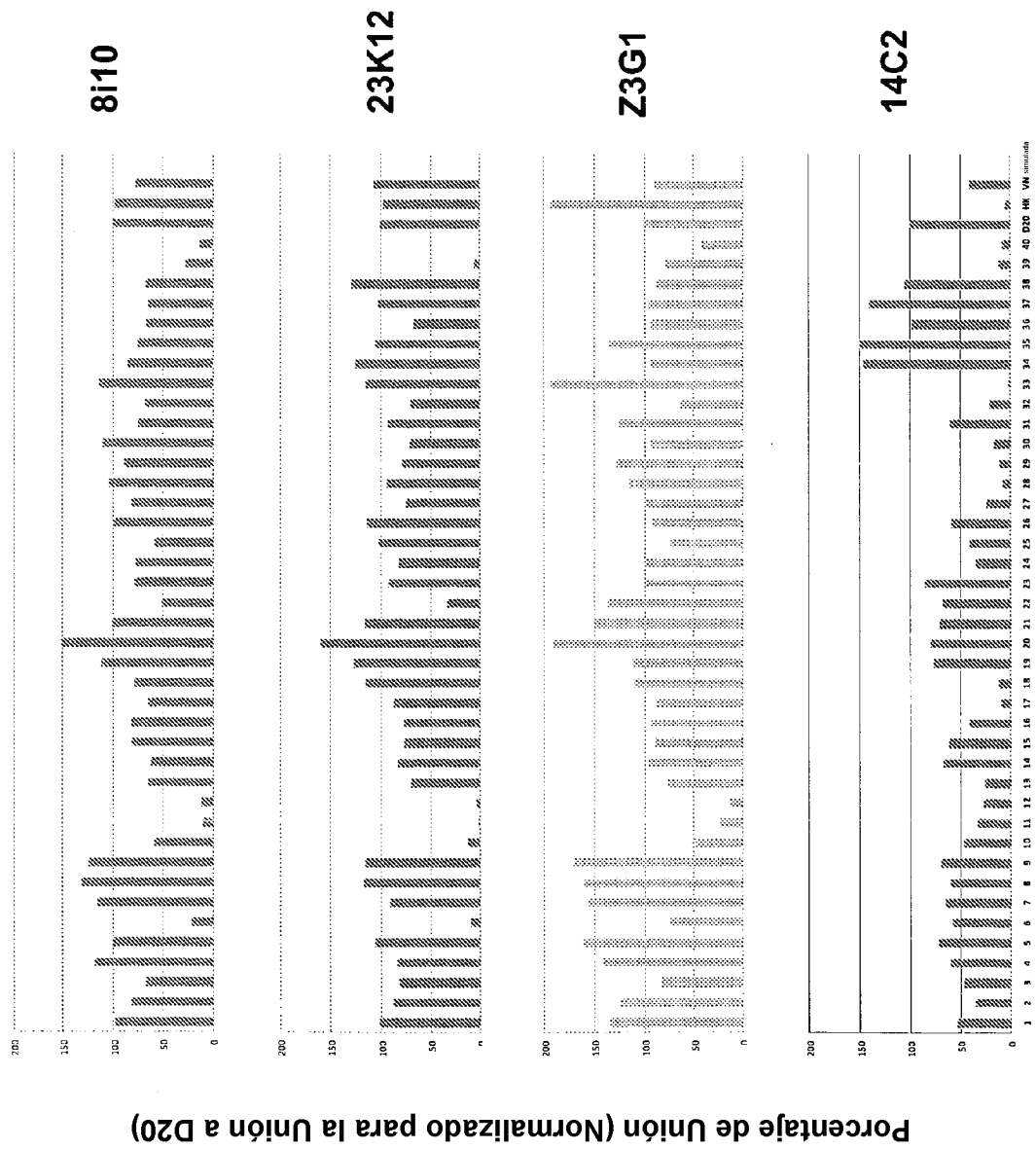
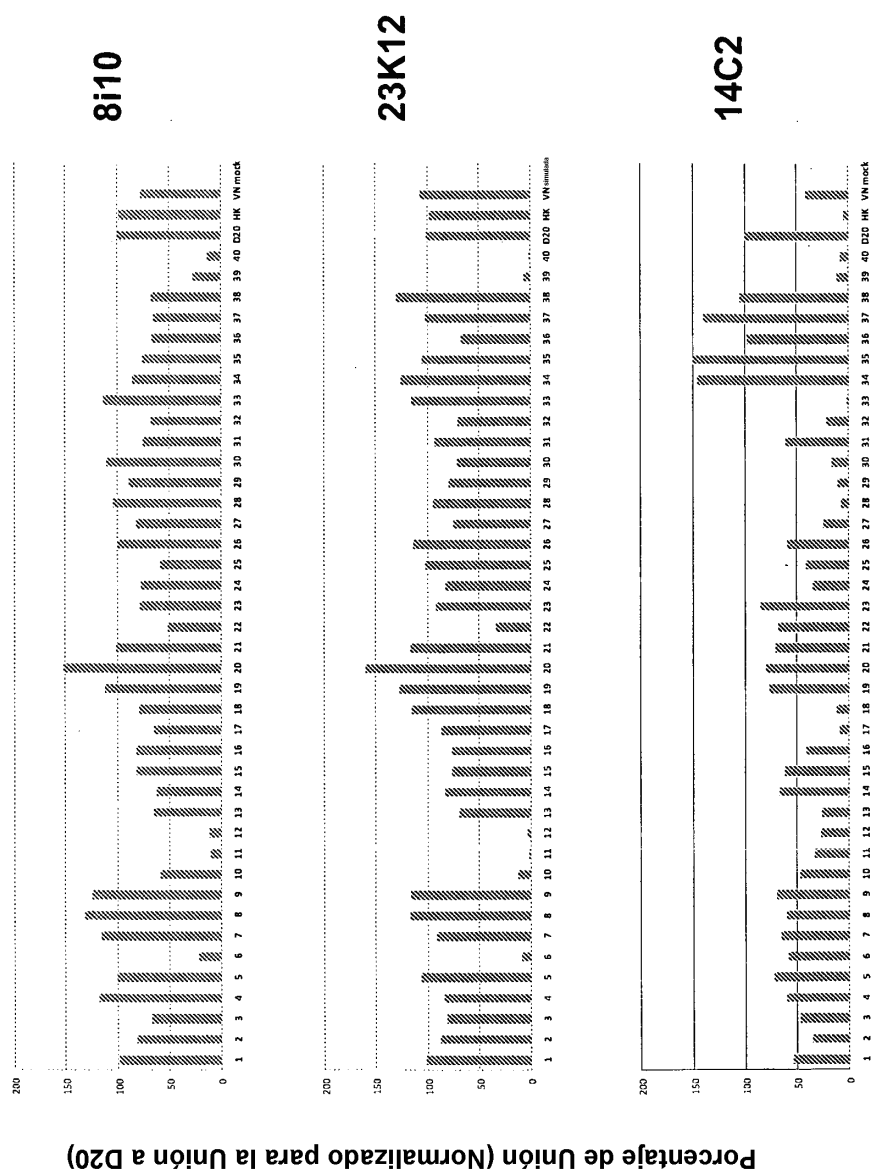


Figura 3C Unión variante M2 completa



(con Z3G1)

Figura 4A Mutagénesis de Barrido con Alanina

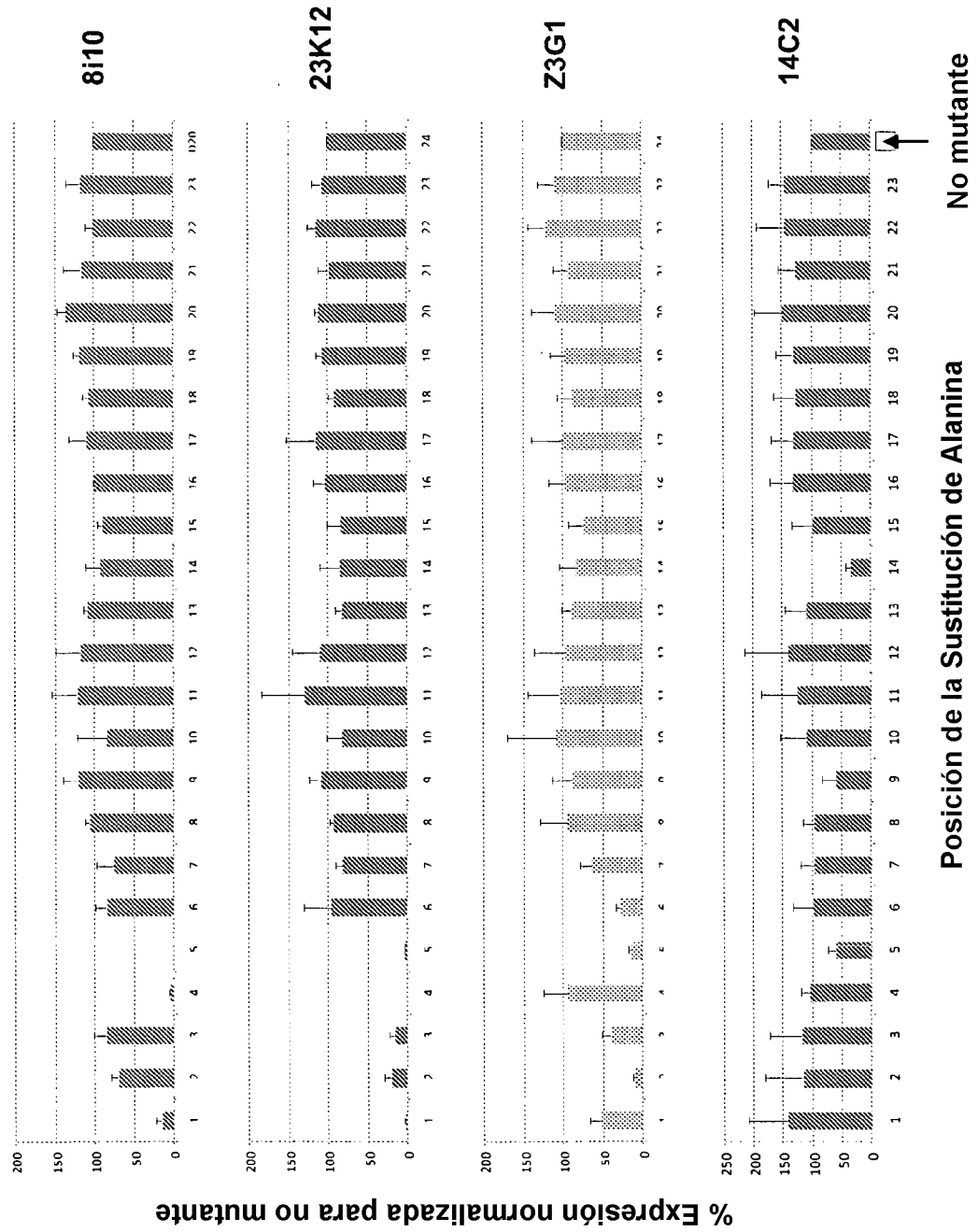


Figura 4B. Mutagénesis de Barrido con Alanina

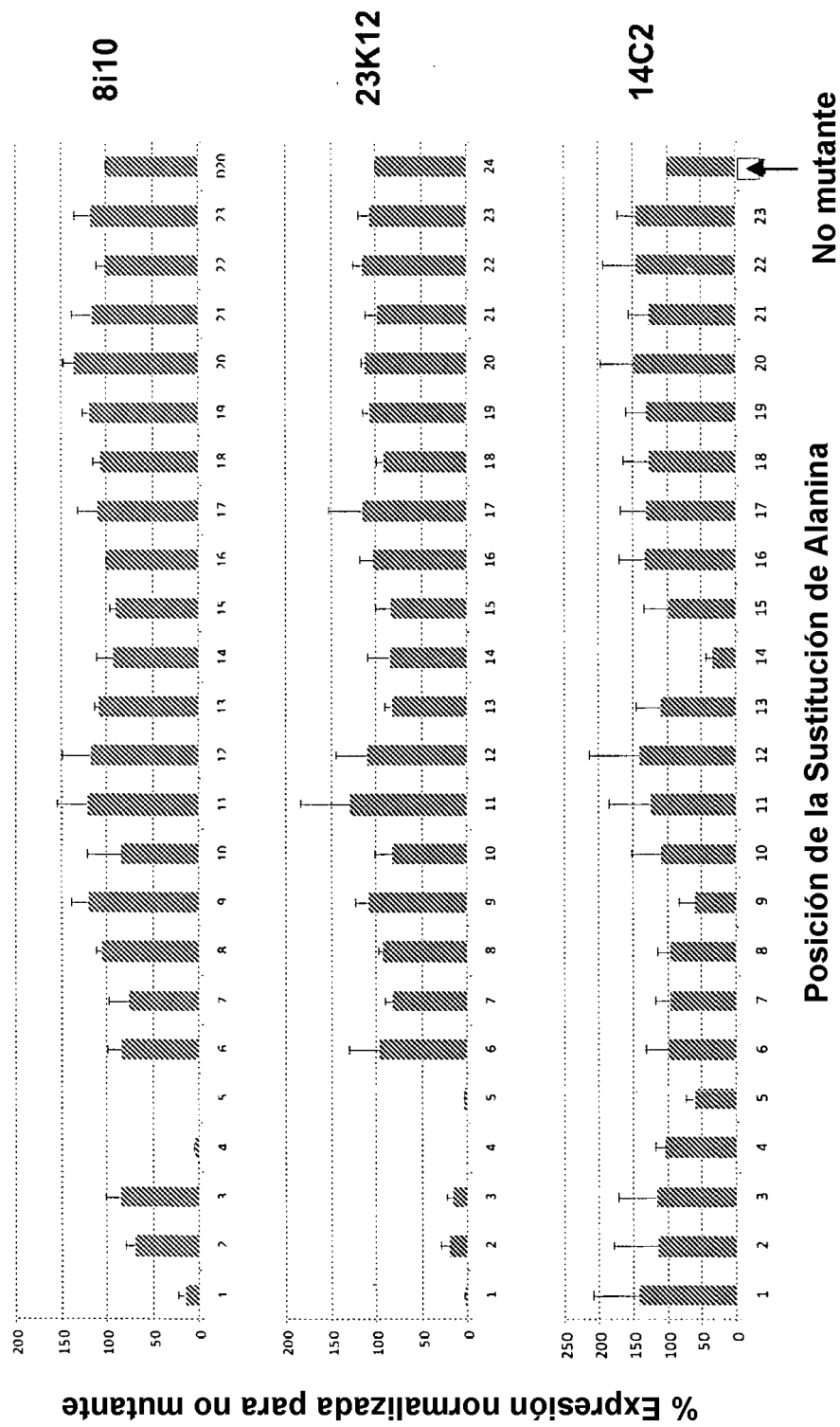


Figura 5. Bloqueo de Epítomos

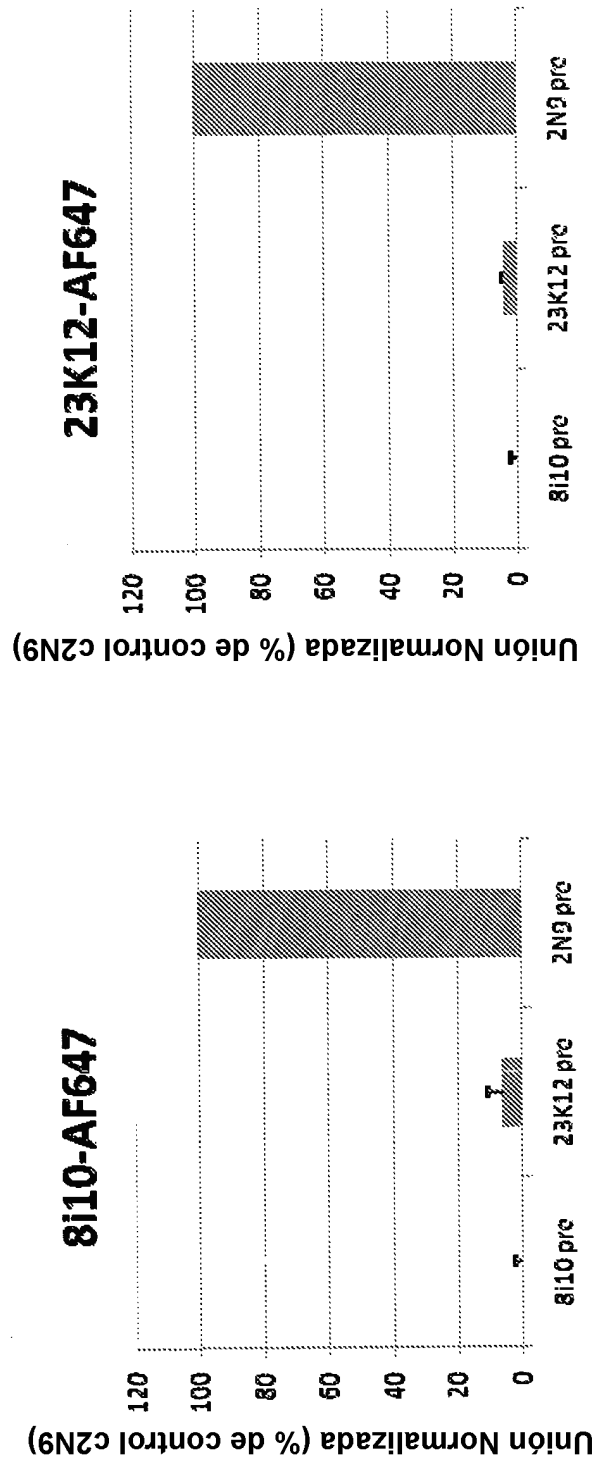


Figura 6A

Unión por Reactividad Cruzada de anticuerpos anti-M2 a péptidos M2 variantes

Set Núm	Nombre	Tamaño	Descripción	ELISA (DO-140)		
				5172	5110	23K12
1	M2	23 aa	SLLTEVETPIRNEWGCRNDSSD	+	-	-
2	M2SG	23 aa	SLLTEVETPIRSEWGCRCNDSD	+	-	-
3	M2EG	23 aa	SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD	+	-	-
4	M2P	23 aa	SLPTEVETPIRNEWGCRNDSSD	+	-	-
5	M2G	23 aa	SLLTEVETPIRNEWGCRNGSSD	+	-	-
6	M2DLTGS	23 aa	SLLTEVDLTIRNGWGCRCSDSSD	-	-	+
7	M2KNS	23 aa	SLLTEVETPIRKEWGCNCSDSSD	+	-	-
8	M2LGS	23 aa	SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD	-	-	-
9	M2LTGS	23 aa	SLLTEVETLTNGWGCRCSDSSD	-	-	-
10	M2SY	23 aa	SLLTEVETPIRSEWGCRCYNDSSD	+	-	-
11	M2TGEKS	23 aa	SLLTEVETPIRNGWECKSDSSD	+	-	-
12	M2HTGEKS	23 aa	SLLTEVETHIRNGWECKSDSSD	-	-	-
13	M2KTGEKS	23 aa	SLLTEVKTIPIRNGWECKSDSSD	-	-	-
14	M2LTGS	23 aa	SLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD	-	-	+
15	M2TDGEKS	23 aa	SLLTEVETPIRNGWECKSDSSD	+	-	-
16	M2TGS	23 aa	SLLTEVETPIRNGWGCRCSDSSD	+	-	W
17	M2TGEK	23 aa	SLLTEVETPIRNGWECKNDSSD	+	-	-
18	M2LTGEKS	23 aa	SLLTEVETLIRNGWECKSDSSD	-	-	W
19	M2K	23 aa	SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD	+	W	+
20	M2FG	23 aa	SFLTEVETPIRNEWGCRNGSSD	+	W	-
21	M2TGE	23 aa	SLLTEVETPIRNGWECKNDSSD	+	-	-
22	M2KGENS	23 aa	SLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD	+	-	-
23	M2TES	23 aa	SLLTEVETPIRNEWECRCSDSSD	+	-	-
24	M2GHTGKS	23 aa	SLLTGVEITHIRNGWGCCKSDSSD	-	-	-
25	M2PHTGS	23 aa	SLLPEVETHIRNGWGCRCSDSSD	-	-	-

Porcentaje comparado relativo a la unión al péptido de tipo salvaje (Seq 1)

Nota: se sometieron a ensayo mAb a 5 µg/ mL

> 25 %
 25 - 40 %
 > 40 %

- sin unión
 W unión débil
 + unión positiva

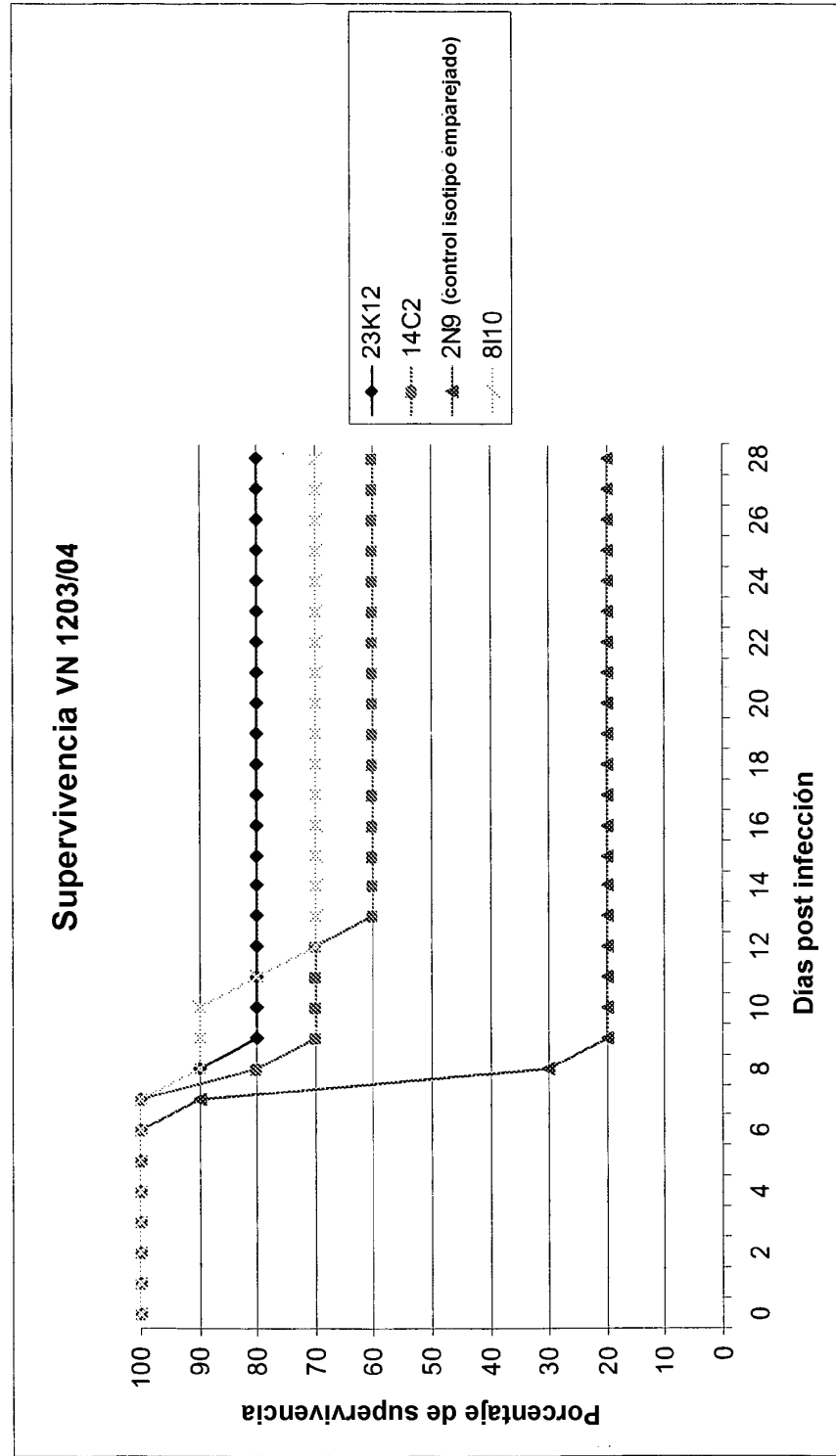
Figura 6B

Actividad de Unión de anticuerpos para M2 a péptidos M2 truncados

Seq. Num	Nombre	Tamaño	Descripción	14,2	14,12	14,12	20,9
1	M2	23 aa	SLLTEVETPIRNEWGCRNDSSD	3,85	0,11	0,22	0,06
26	M16	16 aa	LLTEVETPIRNEWGCR	3,94	0,09	0,21	0,09
27	M15	15 aa	LTEVETPIRNEWGCR	3,95	0,09	0,21	0,09
28	M12	12 aa	VETPIRNEWGCR	0,15	0,09	0,20	0,09
29	CM17	17 aa	ETPIRNEWGCRNDSSD	0,19	0,11	0,34	0,11
30	CM16	16 aa	TPIRNEWGCRNDSSD	0,23	0,13	0,35	0,12
31	CM15	15 aa	PIRNEWGCRNDSSD	0,19	0,12	0,34	0,11
32	CM14	14 aa	IRNEWGCRNDSSD	0,23	0,14	0,36	0,13
33	CM13	13 aa	RNEWGCRNDSSD	0,22	0,14	0,34	0,13
34	CM12	12 aa	NEWGCRNDSSD	0,27	0,14	0,39	0,14
35	NM17	17 aa	SLLTEVETPIRNEWGCR	3,99	0,26	0,58	0,10
36	NM16	16 aa	SLLTEVETPIRNEWGC	3,90	0,29	0,62	0,09
37	NM15	15 aa	SLLTEVETPIRNEWG	3,97	0,12	0,30	0,11
38	NM14	14 aa	SLLTEVETPIRNEW	3,97	0,11	0,24	0,09
39	NM13	13 aa	SLLTEVETPIRNE	0,18	0,11	0,25	0,10
40	NM12	12 aa	SLLTEVETPIRN	0,20	0,10	0,24	0,09
41	NM11	11 aa	SLLTEVETPIR	0,21	0,13	0,30	0,12
42	NM10	10 aa	SLLTEVETPI	0,17	0,10	0,24	0,10
43	NM8	8 aa	SLLTEVET	0,15	0,10	0,20	0,09
44	NM7	7 aa	SLLTEVE	0,14	0,10	0,20	0,08
45	NM9	9 aa	SLLTEVETP	0,21	0,12	0,30	0,19
46	M2e	24 aa	MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSSD	3,98	0,13	0,43	0,10
CMV	HVIR1			0,16	0,11	0,21	3,99

Nota: los mAb se sometieron a ensayo a 5 µg/ mL

Figura 7 Estudio profiláctico in vivo de alta patogenia



Los mAb para M2e SPDQ Parecen Unirse a la Región N-Terminal Altamente Conservada de M2e

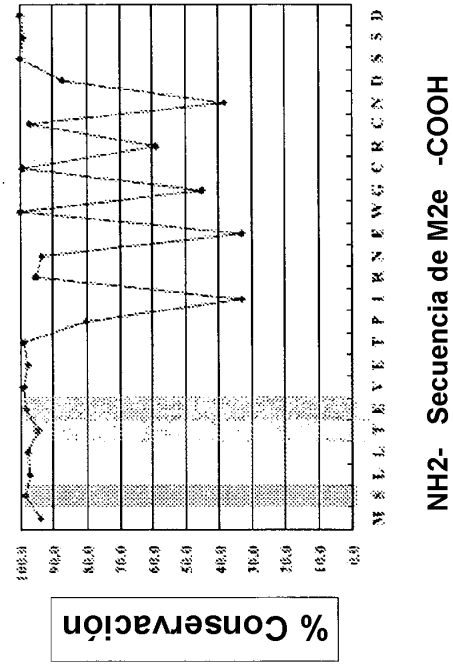
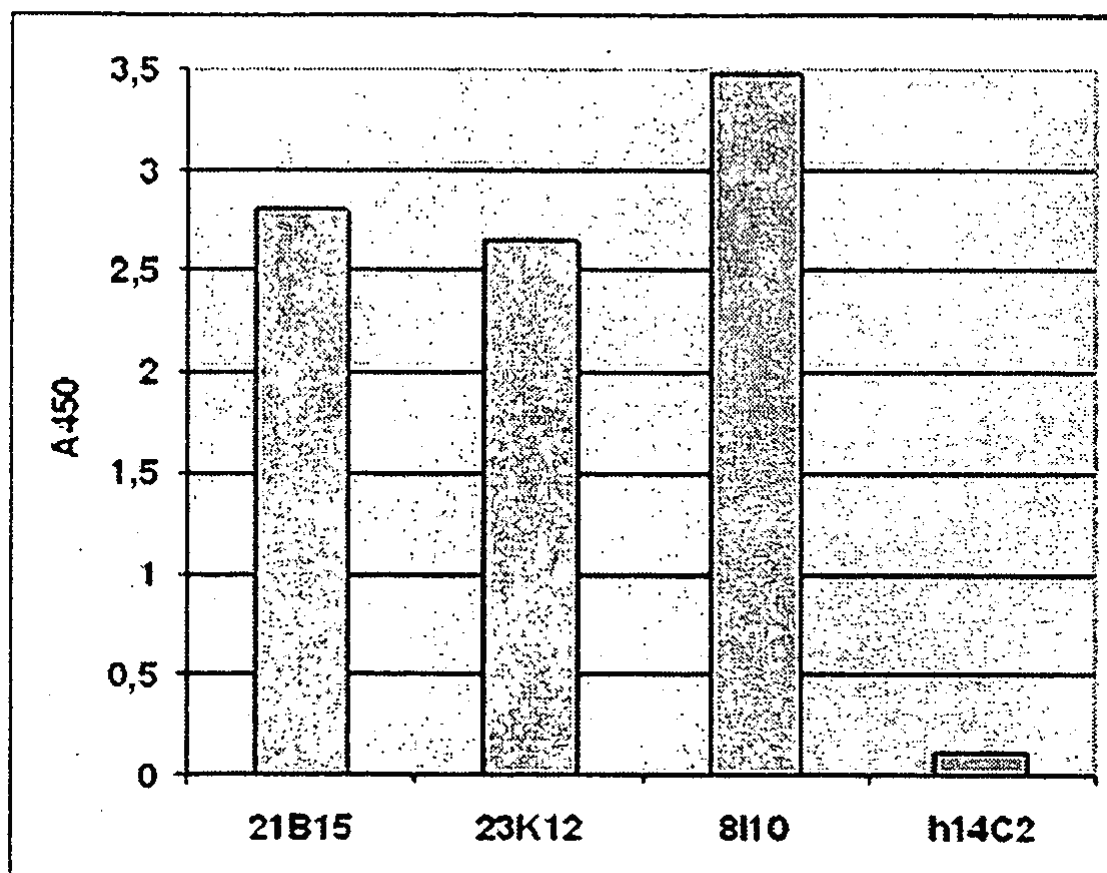


Figura 8



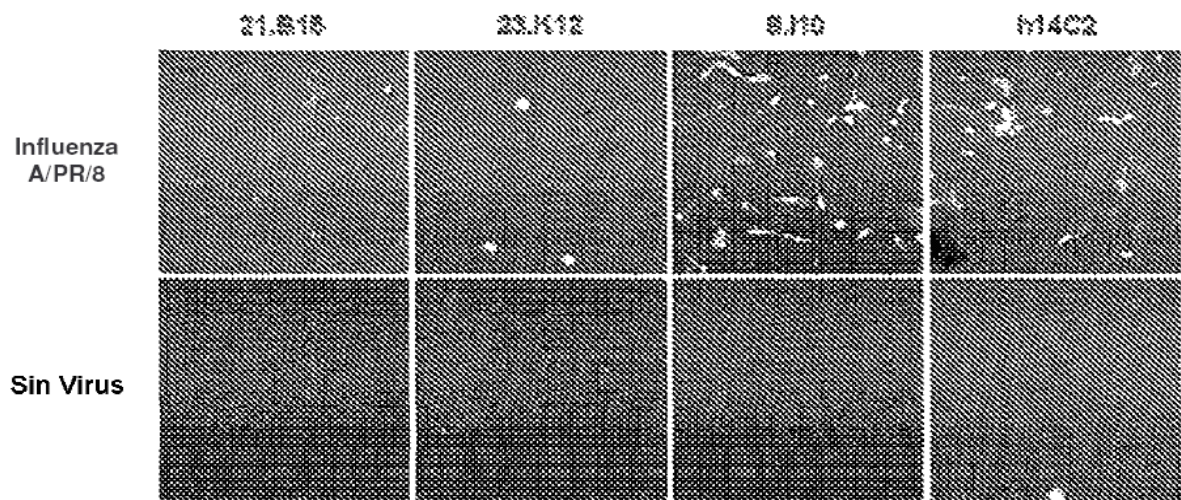


FIGURA 11

