

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 486**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2009 E 09754293 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2294084**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales que tienen propiedades de neutralización cruzada de homotipo contra los virus de la influenza A del subtipo H1**

30 Prioridad:

27.05.2008 IT TO20080398

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

04.01.2016

73 Titular/es:

**POMONA RICERCA S.R.L. (100.0%)
Corso Einaudi 1
10128 Torino, IT**

72 Inventor/es:

**BURIONI, ROBERTO y
CLEMENTI, MASSIMO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 555 486 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

Anticuerpos monoclonales que tienen propiedades de neutralización cruzada de homotipo contra los virus de la influenza A del subtipo H1

5 En general, la presente invención se refiere al campo de la inmunología.

Más específicamente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno HA (hemaglutinina) del subtipo H1 del virus de la influenza A, que es capaz de reconocer y neutralizar tanto cepas aisladas del hombre como cepas aisladas de animales.

Los virus de la influenza son capaces de infectar a diferentes especies de animales, entre las cuales se encuentran especialmente varias especies de aves, porcinos y equinos. Solo unos pocos de estos virus han tenido éxito para adaptarse al hombre, esto es, infectarlo y especialmente propagarse de una persona a otra. El factor principal que permite esta adaptación está relacionado con las características de la proteína de superficie más importante del virus, la hemaglutinina. En particular, se han distinguido 16 subtipos (H1-H16) basándose en las características antigénicas de esta proteína, y solo tres de estas han tenido éxito en adaptarse completamente al hombre (H1, H2 y H3), siendo responsables de las tres grandes pandemias de influenza del siglo pasado. Actualmente hay dos subtipos que circulan en el hombre que ocasionan epidemias de influenza estacional, el subtipo H1 y el subtipo H3. El subtipo H1, reconocido por el anticuerpo que es el objeto de la presente invención, apareció en el hombre en 1918 causando la terrible pandemia llamada "gripe española", llamada según el país europeo en donde se reportaron los primeros casos. Estudios recientes han demostrado que el virus responsable de la "gripe española" fue un virus aviar que infectó a unas aves y, como resultado de algunas mutaciones, desarrolló la capacidad de infectar al hombre y propagarse de una persona a otra. El aislado de 1918 es el progenitor común de todos los virus del subtipo H1 encontrados en el hombre y otros animales como los cerdos. Los virus del subtipo H1 fueron los responsables de las epidemias anuales de influenza humana hasta 1957, durante el cual fueron desplazados por un virus que tiene una hemaglutinina del subtipo H2, que ha sido responsable de la denominada pandemia "asiática". No se reportaron más casos causados por el subtipo H1 hasta el año 1977, durante el cual algunos aislados H1 aparecieron de nuevo en Rusia por razones que todavía no se entienden completamente. De esta manera, en la actualidad los virus del subtipo H1 todavía están en circulación junto con los virus del subtipo H3 que aparecieron en el hombre desde 1967. Por ejemplo, notificaciones de Europa de la estación de influenza 2007-2008, en el periodo comprendido entre la semana 40 de 2007 y la semana 16 de 2008, evidenciaron que un buen 30% de aislados estaban asociados con una hemaglutinina del subtipo H1 (Programa de Vigilancia de la Influenza de Europa –Boletín electrónico semanal, 28 de abril de 2008).

Las epidemias anuales del virus de la influenza tienen un impacto considerable sobre el servicio de salud pública y sobre los costos asociados con el mismo. Tan solo en los Estados Unidos de América se estima que más de 200,000 personas son hospitalizadas cada año por síndromes asociados con los virus de la influenza, y aproximadamente 40,000 muertes están relacionadas directamente con la misma (Thompson et al., JAMA, 2003, 289:179-186). A estos datos se deben agregar todos los casos, en números exponencialmente más altos, de los sujetos infectados que no van a trabajar durante periodos más o menos largos, con repercusiones económicas inevitables debido a la pérdida de días de trabajo. Un estudio reciente (Molinari et al., Vaccine, 2007, 25: 5086-5096) ha calculado que los costos médicos relacionados directamente con las epidemias anuales de la influenza son de 10.4 billones de dólares estadounidenses al año, a los cuales se deben agregar otros 16.3 billones de dólares estadounidenses por los ingresos perdidos debido a la ausencia del trabajo. Si en el cálculo también se consideran otras cuestiones, tales como la monetización de las pérdidas económicas vinculadas con la muerte de los sujetos infectados, la cantidad se eleva a la increíble cifra de 87.1 billones de dólares estadounidenses al año.

Actualmente, la única herramienta disponible para enfrentar de alguna forma las epidemias anuales de la influenza, es una vacuna trivalente desactivada que contiene antígenos virales aislados del subtipo H1 y H3 (además de un aislado de tipo B), que presumiblemente serían responsables de la epidemia de la siguiente estación de influenza. Este tipo de predicción, basada en datos epidemiológicos vinculados con aislamientos tempranos en algunas zonas geográficas centinelas, no siempre resulta correcta. Por lo tanto, existe el riesgo considerable, que está presente cada año, de que la vacuna trivalente desarrollada para una cierta estación de influenza pudiera ser sustancialmente ineficaz.

En ese caso, así como también en el caso de una pandemia nueva, la única ayuda profiláctica/terapéutica disponible sería recurrir a las dos clases disponibles de fármacos antivirales: los inhibidores de la proteína M2 (amantadina y rimantadina), y los inhibidores de neuraminidasa (oseltamivir y zanamivir). Sin embargo, también en esta situación son de esperar una serie de problemas relacionados tanto con la necesidad de administrar los antivirales en una etapa muy temprana de la infección, como la rápida aparición de aislados virales resistentes, que no obstante ya ha ocurrido.

Una estrategia alternativa eficaz se podría basar en preparados de anticuerpo neutralizante dirigidos contra proteínas virales críticas, capaces de reconocer porciones de estas proteínas que son compartidas por los diferentes aislados del virus de la influenza.

Para una mejor comprensión del potencial de un enfoque basado en la administración pasiva de anticuerpos, es útil mencionar brevemente las principales características estructurales de los virus de la influenza. Los virus de la influenza pertenecen a la familia Orthomyxoviridae y se caracterizan por la presencia de una envoltura derivada de membranas celulares infectadas, sobre la cual están presentes aproximadamente 500 púas, también llamadas proyecciones. Estas proyecciones consisten en trímeros y tetrámeros de dos importantes proteínas de superficie viral, esto es, la hemaglutinina (HA) anteriormente mencionada y la neuraminidasa (NA), que también se usa para determinar los subtipos del virus de tipo A. En la superficie de la envoltura también se encuentra una proteína de membrana integral (M2), dicha proteína está presente en cantidades mucho más bajas en comparación con la hemaglutinina y la neuraminidasa, y también se organiza en tetrámeros.

El virus de la influenza también se caracteriza por la presencia, dentro del núcleo, de un genoma segmentado comprendido de 8 fragmentos de ARN de una sola cadena. Basándose en las características de algunas proteínas dentro del virión (NP y M1), son distinguibles los tres tipos conocidos del virus de la influenza: el tipo A, el tipo B y el tipo C. Los virus del tipo A y del tipo B son responsables de las epidemias anuales. En cambio, los virus del tipo C son responsables de síndromes menos severos.

La función de las proteínas de superficie es esencial en el ciclo de duplicación viral. En particular, la hemaglutinina es la proteína que permite a los virus reconocer el ácido siálico presente sobre la superficie de algunas células e infectarlas. En cambio, la neuraminidasa opera al final del ciclo de duplicación viral, que es durante la liberación de partículas virales nuevas de las células infectadas. Su función es ayudar a la liberación de hemaglutinina de los viriones recién formados del ácido siálico presente en la superficie de la célula que los produjo. La función clave desempeñada por estas dos proteínas, así como su despliegue sobre la superficie del virus, explican porqué representan el blanco principal de la respuesta inmune, y porqué son susceptibles de una tasa de mutación elevada. De hecho, las epidemias anuales son causadas por virus que son más o menos diferentes de los virus de los años anteriores, y por lo tanto son capaces de escapar más o menos eficientemente de la respuesta inmune que estimulan. En otras palabras, la acumulación progresiva de mutaciones de punto en la hemaglutinina (principalmente) y neuraminidasa (secundariamente) hace a los anticuerpos protectores, producidos durante las epidemias previas, en general progresivamente ineficaces.

La función protectora principal de la respuesta inmune contra la influenza es desempeñada por el componente humoral. Los anticuerpos ejercen su función protectora obstaculizando la unión de la hemaglutinina al ácido siálico, impidiendo con ello la infección de las células. Esta presión selectiva determina la tasa de mutación elevada en la hemaglutinina. Sin embargo, dentro de esta variabilidad elevada se han encontrado algunos residuos de aminoácidos sin cambio, lo que es indicativo de su papel esencial en la función de la proteína. Estas porciones de hemaglutinina representan un blanco potencial para una respuesta de neutralización cruzada. Sin embargo, es predecible que tales regiones no serán capaces de inducir una respuesta de anticuerpo eficaz en la mayoría de los pacientes, pues el hecho de que tales blancos se ocultan en áreas inmunosilenciosas ha representado ciertamente un paso evolutivo muy favorable para el virus.

En vista del aspecto profiláctico y terapéutico, sería muy útil proveer moléculas de anticuerpo capaces de reconocer tales regiones comunes dentro de un subtipo. De hecho, tales anticuerpos podrían representar una herramienta de protección útil al administrarse a sujetos en riesgo, puesto que también serían capaces de reconocer una amplia gama de virus del mismo subtipo pero evolutivamente distantes uno de otro, y por lo tanto potencialmente serían capaces de proteger contra la mayoría de los virus que pertenecen a dicho subtipo, incluso los posibles virus nuevos que adquieran la capacidad de propagarse de animales a humanos. Este tipo de inmunidad, que se pierde cuando los aislados en circulación muestran una tasa de mutación alta en comparación con los años anteriores, es conocida como INMUNIDAD DE HOMOSUBTIPO CONTRA LA INFLUENZA.

EP 0 675 199 A describe el AcM murino C179 que se une a una variedad de aislados de influenza A humana que expresan H1N1 y H2N2, pero no H3N3 y los neutraliza. No se describe ninguna reactividad cruzada con un subtipo H1 derivado de animal.

F. AUSTIN ET AL., The Journal of General Virology, vol. 67, No. 6, June 1986, páginas 983-992, describe AcM murinos contra el subtipo H1 aviar que puede unirse a una pluralidad de aislados de H1 de hombre, cerdo y/o pájaro. Estos AcM se usan para la detección y no se muestra ninguna neutralización.

H. ASANUMA ET AL., Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 366, No. 2, 8 Febrero 2008, páginas 445-449, describe un clon de Fab1 humano inhibidor de la infección que reacciona con los aislados humanos positivos al subtipo H1N1 A/Puerto Rico/8/34 y A/Peking/262/95, pero no se describe ninguna reactividad cruzada con un subtipo H1 derivado de animales.

Ahora, los presentes inventores han acertado al obtener anticuerpos monoclonales con las características deseables anteriormente mencionadas.

De esta manera, un primer aspecto de la invención es un anticuerpo monoclonal según se define en la reivindicación

1.

Tales anticuerpos representan una herramienta de prevención valiosa cuando se administran a los pacientes en riesgo.

5 Además, el uso de un anticuerpo monoclonal humano en pacientes humanos es una ventaja adicional ya que, ciertamente, el anticuerpo humano es bien tolerado.

10 Además, como representa un componente de la respuesta de anticuerpo humano a este virus, el anticuerpo monoclonal de la invención constituye un factor clave para el diseño de vacunas innovadoras capaces de inducir una inmunidad mucho más eficaz, protectora y de amplio espectro contra los virus del subtipo H1, en comparación con la inmunidad inducida por las vacunas usadas actualmente.

15 Los pasos que llevaron a la obtención del anticuerpo monoclonal de la invención se describen detalladamente en la sección experimental que se da más abajo, que también ilustra sus propiedades de unión y neutralización. El anticuerpo monoclonal obtenible mediante el procedimiento descrito específicamente en la sección experimental, es un anticuerpo humano.

20 En la sección experimental se describe específicamente la obtención de un clon (denominado INF49) capaz de producir anticuerpos monoclonales en forma de fragmentos Fab con la capacidad de unirse in vitro a múltiples aislados humanos y animales del virus de la influenza A del subtipo H1.

25 Los anticuerpos monoclonales producidos por el clon INF49 (denominados Fab49) representan una modalidad preferida de la invención, ya que los inventores comprobaron experimentalmente que estos anticuerpos presentan una actividad neutralizante contra múltiples aislados humanos y animales del virus de la influenza A del subtipo H1. Para efectos de brevedad, tal propiedad inmunológica con respecto a la capacidad de neutralizar aislados humanos y animales del virus de la influenza A del subtipo H1, algunas veces será denominada más abajo "actividad de neutralización cruzada de homosubtipo para el subtipo H1".

30 El listado de secuencias muestra la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 1) y del dominio variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 2) del Fab49 de la invención. También muestra sus respectivas secuencias de nucleótidos codificadoras, designadas como SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente.

35 En particular, la sección experimental describe la fabricación de los anticuerpos monoclonales Fab49 como fragmentos Fab. Sin embargo, se entiende que los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar y usar en otras formas, tales como por ejemplo inmunoglobulinas completas, o en forma de otros tipos de fragmentos de anticuerpo, tales como por ejemplo fragmentos F(ab')₂ o fragmentos de anticuerpo más pequeños que los Fab's (por ejemplo, anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos de un solo dominio), y también en forma de péptidos de por lo menos 8 aminoácidos de longitud que tienen las mismas propiedades inmunológicas que el Fab.

40 Se pueden construir anticuerpos de una sola cadena de acuerdo con el método descrito en la patente de EE. UU. No. 4,946,778, de Ladner et al., incluida aquí como referencia. Los anticuerpos de una sola cadena comprenden las regiones variables de cadena ligera y pesada unidas por un enlazador flexible. El fragmento de anticuerpo diseñado como anticuerpo de un solo dominio es aún más pequeño que el anticuerpo de una sola cadena, ya que solo comprende un dominio VH aislado. En el arte previo se describen técnicas para obtener anticuerpos de un solo dominio que tienen, por lo menos parcialmente, la misma capacidad de unión que el anticuerpo completo. Ward, et al., en "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from Escherichia coli", Nature 341:644-646, describen un método de examen y selección para obtener la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo (anticuerpo de un solo dominio VH), con una afinidad suficiente por el epítipo objetivo para unirse al mismo en una forma aislada.

50 En la descripción que sigue, el término "anticuerpo" se usará para referirse a todas las modalidades anteriormente mencionadas, incluso inmunoglobulinas completas, fragmentos Fab u otros tipos de fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos de un solo dominio, etc.

60 Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden generar y usar en forma libre o en forma conjugada con vehículo. Un vehículo es cualquier molécula u entidad química o biológica capaz de conjugarse con un anticuerpo y hacerlo inmunogénico o aumentar su inmunogenicidad. Ejemplos no limitativos de vehículos son las proteínas tales como KLH (hemocianina de lapa), edestina, tiroglobulina, albúminas como albúmina de suero bovina (BSA) o albúmina de suero humana (HSA), eritrocitos como eritrocitos de oveja (SRBC), anatoxina del tétanos, anatoxina del cólera, poliaminoácidos tales como por ejemplo poli(D-lisina – ácido D-glutámico), etcétera. Para facilitar la unión del anticuerpo al vehículo, el extremo C o el extremo N del anticuerpo se pueden modificar, por ejemplo, por inserción de residuos de aminoácido adicionales, por ejemplo uno o más residuos de cisteína que son capaces de formar puentes disulfuro.

65

Debido a sus propiedades, que se mostrarán detalladamente más abajo en la sección experimental con respecto a Fab49, el anticuerpo monoclonal de la invención es particularmente adecuado para usarse en aplicaciones médicas, particularmente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de amplio espectro de infecciones del virus de la influenza A del subtipo H1.

5 De esta manera, está dentro del alcance de la invención el anticuerpo monoclonal de la invención para usar en el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades causadas por infecciones del virus de la influenza A del subtipo H1, tales como por ejemplo el síndrome de influenza.

10 En este contexto también, la expresión “anticuerpo Fab49” no solo incluye los fragmentos Fab sino que también cualquier otra forma en la que se pueda preparar el anticuerpo, por ejemplo inmunoglobulinas completas, otros tipos de fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de una sola cadena, etc.

15 Como se describe en detalle en la sección experimental, el anticuerpo monoclonal presente se obtuvo mediante técnicas de biología molecular empezando con un linfocito humano transformado con EBV, capaz de producir anticuerpos monoclonales humanos de reactividad cruzada, y por lo tanto capaces de reconocer lisados de células MDCK (de riñón canino de Madin-Darby; ATCC® No. CCL-34TM) infectadas con algunos aislados de referencia humanos del virus de la influenza A que se indican más abajo en esta descripción, que expresan hemaglutinina del subtipo H1: A/Puerto Rico/8/34 (ATCC® No. VR-1469TM); A/Wilson-Smith/33 (ATCC® No. VR-1520);
20 A/Malaya/302/54 (ATCC® No. VR-98). El anticuerpo en cuestión también resultó capaz de reconocer lisados de células NSK (de riñón de cerdo recién nacido) (Istituto Zooprofilattico di Brescia) infectados con un aislado “de campo” derivado de animal, y en particular derivado de cerdo (SW1), mostrado por la secuencia del fragmento HA2 de hemaglutinina del subtipo H1 expresado por la misma (SEQ ID NO: 5).

25 Una propiedad adicional particularmente ventajosa del anticuerpo monoclonal de la invención es su capacidad para unirse a la proteína HA recombinante del aislado del virus de influenza A/California/04/2009, identificado recientemente como uno de los aislados responsables de la denominada “influenza porcina” denominada oficialmente “nueva influenza” por la OMS.

30 En la siguiente sección experimental se describen pruebas de unión realizadas con la proteína HA recombinante del aislado A/California/04/2009, y la proteína HA recombinante del aislado A/PR/08/1934 usada como control positivo. Las pruebas demuestran que el anticuerpo monoclonal Fab49 de la invención es capaz de unirse a las dos proteínas HA recombinantes.

35 Además, las pruebas realizadas demuestran que el anticuerpo monoclonal Fab49 es capaz de neutralizar pseudo-partículas de proteína HA de los dos aislados del virus de influenza anteriormente mencionados.

En la siguiente sección experimental se describen los procedimientos específicos usados para generar líneas de células B transformadas partiendo de sangre periférica de pacientes.

40 También se describen los procedimientos usados para clonar los genes que codifican la porción Fd de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo Fab49 de la invención, y también los procedimientos recombinantes usados para producirlo, como péptidos solos y como fragmentos Fab.

45 Las capacidades del anticuerpo monoclonal de la invención para reaccionar con células infectadas con diferentes aislados humanos y animales del virus de la influenza A del subtipo H1, fueron verificadas por medio de ELISA e inmunofluorescencia. Además, se hizo una prueba de neutralización para verificar la actividad biológica in vitro del anticuerpo. En esta prueba, el anticuerpo Fab49 mostró una actividad de neutralización cruzada de homosubtipo contra los aislados virales de humano y animal de tipo A y subtipo H1 arriba indicados.

50 Los datos obtenidos indican que el anticuerpo de la invención es potencialmente eficaz para conferir inmunidad pasiva contra el virus de la influenza A del subtipo H1 a los sujetos a quienes se les administra en una de las formas descritas, y su utilidad en la profilaxis y terapia de amplio espectro de las enfermedades causadas por infección con el virus de la influenza A del subtipo H1, tal como por ejemplo el síndrome de influenza.

55 De esta manera, un aspecto adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal de la invención como ingrediente activo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Una cantidad efectiva es aquella que es capaz de inducir un efecto favorable en el sujeto al que se le administra la composición, por ejemplo, para neutralizar el virus de la influenza A del subtipo H1.

60 En este contexto, el término “sujeto” designa cualquier animal hospedero al que se le puede administrar la composición, incluso los humanos.

65 Ejemplos no limitativos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables útiles en la composición farmacéutica de la invención incluyen estabilizadores como SPGA, carbohidratos (por ejemplo sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas como albúmina o caseína, agentes que contienen proteína tales como suero

bovino o leche descremada, y amortiguadores (por ejemplo amortiguador de fosfatos).

El anticuerpo monoclonal de la invención también se puede usar convenientemente como reactivo diagnóstico en un método in vitro para detectar anticuerpos contra el virus de la influenza A del subtipo H1 con propiedades neutralizantes idénticas o similares, en una muestra biológica de un paciente obtenida previamente (tal como por ejemplo una muestra de suero, plasma, sangre, o cualquier otro material biológico adecuado).

Los "anticuerpos contra el virus de la influenza A con propiedades neutralizantes idénticas o similares" son anticuerpos que presentan una actividad de neutralización cruzada de homosubtipo contra el virus de la influenza A del subtipo H1 de humano o animal. Estos anticuerpos se pueden encontrar en la muestra biológica del paciente (o animal) como resultado de una exposición previa a un virus de la influenza A, o porque al paciente se le ha administrado previamente el anticuerpo monoclonal de la invención para fines terapéuticos o profilácticos o de investigación.

De esta manera, dentro del alcance de la invención está incluido un método de prueba para detectar en una muestra biológica obtenida previamente de un paciente o un animal hospedero, la presencia de anticuerpos contra el virus de la influenza A que tienen una actividad neutralizante cruzada de homosubtipo contra el subtipo H1, que comprende poner en contacto dicha muestra biológica con el anticuerpo monoclonal de la invención como un reactivo de prueba específico.

La prueba puede ser cualitativa o cuantitativa. La detección o cuantificación de los anticuerpos contra el virus de la influenza A del subtipo H1 que tienen una actividad neutralizante cruzada de homosubtipo se puede efectuar, por ejemplo, por medio de una prueba de ELISA competitiva. De esta manera, también está dentro del alcance de la invención un kit diagnóstico que comprende el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención como reactivo específico, dicho kit diseñado particularmente para la detección o cuantificación de anticuerpos contra el virus de la influenza A que tienen una actividad neutralizante cruzada de homosubtipo contra el virus de la influenza A del subtipo H1, en una muestra biológica obtenida previamente de un paciente o un animal hospedero.

Similarmente, el anticuerpo monoclonal de la invención se puede usar como reactivo específico en un método de prueba para detectar o cuantificar, en una composición inmunogénica o de vacuna previamente preparada, epítopes capaces de provocar en un sujeto, al que se le administre dicha composición, anticuerpos contra el virus de la influenza A del subtipo H1 que tienen propiedades neutralizantes idénticas o similares a las del anticuerpo monoclonal de la invención, que es una actividad neutralizante cruzada de homosubtipo contra el virus de la influenza A del subtipo H1.

Se prevé que dicho método será útil para la valoración de cualquier preparado que se vaya a utilizar como vacuna o preparado inmunogénico, ya que el reconocimiento por parte del anticuerpo monoclonal de la invención sería indicativo de la presencia, en el preparado inmunogénico o vacuna, de uno o más epítopes capaces de estimular la producción de clones de anticuerpo capaces de reconocer un epítipo conveniente, tal como por ejemplo un epítipo capaz de provocar inmunidad de homosubtipo contra el virus de la influenza A del subtipo H1.

Finalmente, el anticuerpo monoclonal de la invención se puede usar para preparar anticuerpos anti-idiotipo de acuerdo con los métodos conocidos per se. Los anticuerpos anti-idiotipo son anticuerpos dirigidos específicamente contra el idiotipo de los anticuerpos neutralizantes de amplio espectro usados para prepararlos, y como tales son capaces de imitar los epítopes clave que reconocen.

Por lo tanto, los anticuerpos anti-idiotipo dirigidos contra el anticuerpo monoclonal de la invención también están incluidos en el alcance de la invención.

La siguiente sección experimental se provee únicamente a manera de ilustración y no de limitación.

Sección experimental

Selección de pacientes

Los pacientes incluidos en el estudio fueron seleccionados a fin de aumentar la probabilidad de clonar anticuerpos de reactividad cruzada contra la influenza, esto es, anticuerpos capaces de reconocer, y posiblemente de neutralizar, diferentes aislados del virus de la influenza. En particular, se describe que algunos individuos, a pesar de una exposición continua al virus de la influenza (algunas veces por razones profesionales, como médicos, pediatras, personas que trabajan en guarderías y escuelas), no contraen la enfermedad. Por esta razón se piensa que estos individuos son los mejores candidatos para la generación de anticuerpos monoclonales humanos. En particular, se siguieron los siguientes criterios de inclusión:

- entre 25 y 55 años de edad;
- historia clínica reciente negativa a síndromes clínicos de influenza durante los diez años previos al estudio;

- título de anticuerpo mayor de 1:1000 contra aislados del virus del subtipo H1N1, responsable de las epidemias anuales durante los cinco años previos al estudio;

5 - título de neutralización detectable (CI50 > = 1:20) contra dos aislados humanos del virus A del subtipo H1N1 de referencia (A/Puerto Rico/8/34; A/Malaya/302/54).

- sin vacunación previa contra la influenza;

10 - de acuerdo en recibir vacunación contra la influenza.

En el momento de la vacunación y aproximadamente 3 semanas después de la vacunación se extrajeron aproximadamente 20 ml de sangre de cada paciente en tubos de ensayo heparinizados.

15 Cultivo de los aislados del virus de referencia

Como línea celular se usaron células MDCK (células de riñón canino de Madin-Darby) (ATCC® No. CCL-34TM), propagadas en medio de Eagle modificado (MEM) (GIBCO), suplementado con 10% de suero bovino fetal desactivado (FBS) (tratado a 56°C durante 30 minutos) (EuroClone), 50 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin (GIBCO) y 2 mM de L-glutamina (EuroClone). En cuanto al aislado porcino de campo SW1 (caracterizado de forma inequívoca por la secuencia de la región HA2, anexa a la solicitud de patente), se usaron células NSK (células de riñón de cerdo recién nacido) (Istituto Zooprofilattico di Brescia), que se trataron de forma similar. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO2 y se pasaron en una relación de 1:3 dos veces a la semana. Para los experimentos descritos en esta solicitud de patente se usaron los siguientes aislados del virus de influenza del subtipo H1N1: cepa A/Puerto Rico/8/34 (ATCC® No. VR-1469TM); cepa A/Wilson-Smith/33 (ATCC® No. VR-1520), y cepa A/Malaya/302/54 (ATCC® No. VR-98). Con respecto al subtipo H1N1 también se usó un aislado derivado de cerdo (SW1), caracterizado sobre la base de la secuencia de la porción HA2 de hemaglutinina (SEQ ID NO: 5). También se usaron otros tres aislados de virus de referencia, dos que pertenecen al tipo A subtipo H3N2 (A/Port Chalmers/1/73 - ATCC® No. VR-810 y A/Aichi/2/68 - ATCC® No. VR- 547), y uno que pertenece al subtipo B (B/Lee/40 - ATCC® No. VR-101). Para el crecimiento del virus se usó el medio de cultivo MEM suplementado con 1 µg/ml de tripsina libre de suero (SIGMA). Las reservas de virus se obtuvieron del sobrenadante del cultivo como virus extracelulares. Brevemente, después de infectar las células, la monocapa se observó diariamente para monitorear la aparición de un efecto citopático. El sobrenadante se recogió generalmente 4 días después de la infección; se centrifugó a 1000 RCF (fuerza centrífuga relativa) durante 10 minutos para eliminar los desechos celulares, y el producto se filtró con filtros de 0.22 µm (MILLIPORE). Después, el sobrenadante se dividió en alícuotas y se guardó a -80 °C como virus libres de células.

Selección de anticuerpos monoclonales contra el virus de la influenza de linfocitos B de sangre periférica

40 La producción de anticuerpos monoclonales de los pacientes se hizo usando un método de transformación por infección con el virus de Epstein-Barr (EBV), descrito previamente por Cole et al, 1984 Cancer Research 22:2750-2753. El sobrenadante de los diferentes clones obtenidos se analizó por medio de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos. Luego, los clones capaces de producir anticuerpos de IgG en el sobrenadante que son capaces de reaccionar en la ELISA contra los lisados celulares infectados con los tres aislados humanos anteriormente mencionados y el aislado porcino SW1 del subtipo H1N1, pero no contra los infectados con los dos aislados del subtipo H3N2 y con el aislado B, fueron seleccionados para una caracterización subsiguiente. En particular, las células MDCK se infectaron con los aislados anteriormente mencionados, a una multiplicidad de infección alta. Aproximadamente 48 horas después de la infección, las células se despegaron del matraz y se lavaron dos veces en PBS. Después, las pellas celulares se suspendieron en 300 µl de solución de lisis (100 mM de NaCl, 100 mM de Tris, pH 8, y 0.5% de Triton-X), y se guardaron en hielo durante 20 minutos. Los desechos celulares se centrifugaron a 10000 g durante 5 minutos y el sobrenadante se guardó a -20 °C como un extracto de proteína. En cuanto a la preparación del antígeno de control, las células no infectadas se trataron de la misma forma. La concentración de proteína del sobrenadante se determinó por duplicado usando el kit de prueba de proteína BCATM (Pierce). Brevemente, la dosis de proteína de la muestra se determinó tomando como referencia una curva patrón obtenida por medio de una serie de diluciones de albúmina de suero bovina (BSA) de concentración conocida. La absorbancia de cada muestra se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Los lisados así obtenidos se usaron entonces (300 ng por pocillo) para cubrir una placa de ELISA (COSTAR) que se incubó a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, la placa se lavó con agua destilada y se bloqueó con PBS /BSA 1% (Sigma) durante 45 minutos a 37 °C. Después se agregaron a cada pocillo 40 µl del sobrenadante de cada clon, y se incubó 1 hora a 37 °C. Después de 5 lavados (WASHER ETI-SYSTEM, DiaSorin) con PBS /0.5% de Tween 20 (Sigma), se agregaron a cada pocillo 40 µl de anti-Fc humano conjugado con peroxidasa (1:4000 en PBS /1% de BSA, Sigma), y la placa se incubó 1 hora a 37 °C. Después de 5 lavados más con PBS /0.5% de Tween 20, se agregaron a cada pocillo 40 µl del substrato de peroxidasa TMB (Pierce). Aproximadamente 15 minutos después se bloqueó la actividad enzimática agregando 40 µl de H2SO4, y la señal se midió en un espectrofotómetro a 450 nm.

65 En particular, se encontró que un clon (denominado cINF49) es capaz de producir anticuerpos que pueden

reconocer de manera específica todos los lisados obtenidos de las células infectadas con los diferentes aislados del subtipo H1N1, incluso el aislado animal. En cambio, no hubo señal detectable en los cultivos infectados con los dos virus del subtipo H3N2 ni en los infectados con el aislado B.

5 Preparación de fragmentos Fab del clon cINF49

Los genes que codifican las cadenas de Fab49 se clonaron en un vector de expresión procariótico. Esto permite evitar problemas debido a la inestabilidad de los clones de células productoras de anticuerpo, para caracterizar mejor los genes codificadores desde un punto de vista molecular, para tener disponibles moléculas que son indudablemente monoclonales, así como también mayores cantidades del anticuerpo mismo.

El ARN mensajero (ARNm) se extrajo del clon cINF49 cultivado y se transcribió inversamente usando un oligo-dT de acuerdo con los métodos conocidos per se. Los ADNc's que codifican la cadena ligera y el fragmento Fd (esto es, la porción variable de cadena pesada y la parte de la porción constante presente dentro del fragmento Fab), fueron entonces amplificados mediante los métodos descritos (CSH Press, "Phage display manual", ed. D.R. Burton, p. A1.6). Luego, los ADNc's así obtenidos se clonaron en un vector de expresión conocido per se denominado RBCaf (Burioni et al, J. Imm. Meth, 1988). Brevemente, el gen (ADN amplificado) que codifica la porción Fd de cadena pesada se digirió con las enzimas de restricción XhoI y SpeI (Roche) durante 1.5 horas a 37 °C, y subsiguientemente se insertó en el sitio de clonación del vector para cadenas pesadas, a su vez digeridas con las mismas enzimas. En cambio, la cadena ligera (ADN amplificado) se digirió con las enzimas SacI y XbaI (Roche) y se clonó en el vector digerido similarmente.

La construcción recombinante así obtenida se usó para electrotransformación en la cepa XL1Blue de E. coli (hecha competente mediante lavados fríos en glicerol), de acuerdo con los protocolos estandarizados para el uso de cubetas de 0.2 cm (Voltaje: 2500 V; Capacitancia: 25 µF; Resistencia: 200 Ω). En paralelo, se analizaron las secuencias de ADN de la parte variable de cadena ligera y la parte variable de cadena pesada. Las secuencias son las provistas en el listado de secuencias. El análisis molecular del patrón mutacional mostró una imagen atribuible a procesos de mutación somática inducidos por antígeno.

30 Análisis de ELISA del Fab49 obtenido por clonación en RBCaf

Se analizaron 40 clones bacterianos recombinantes transformados con la construcción Fab49 por medio de ELISA, usando lisados crudos obtenidos sometiendo los cultivos a choque de calor. En particular, clones de bacterias transformadas con la construcción se inocularon en 10 ml de medio SB que contenía ampicilina y tetraciclina a concentraciones de 50 µg/ml y 10 µg/ml, respectivamente, y se desarrollaron bajo agitación a 37 °C hasta alcanzar una DO 600 = 1. Subsiguientemente se les agregó un inductor específico (IPTG – isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM, y el cultivo se dejó agitando a 30 °C durante la noche. Las células se lisaron por choque de calor (3 rondas de congelación/descongelación, a -80 °C y 37 °C, respectivamente), y después se centrifugaron para separar los desechos celulares del sobrenadante que contiene el Fab. Los Fab's solubles obtenidos se analizaron por medio de ELISA. Se cubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) con lisados de células infectadas con los aislados de virus anteriormente mencionados. Los lisados obtenidos de células no infectadas se usaron como control negativo. Las placas de ELISA cubiertas con 300 ng de los lisados obtenidos como se describe se dejaron entonces a 4 °C durante la noche. El siguiente día, después de quitar el antígeno no unido, las placas se lavaron 5 veces con PBS y los sitios de unión inespecífica se bloquearon con albúmina al 3% en PBS durante 1 hora a 37 °C. Después de quitar la solución bloqueadora, se les agregaron los sobrenadantes de los cultivos celulares tratados como se describe arriba y que contienen los Fab's solubles. Esto fue seguido por un paso de incubación a 37 °C durante 2 horas. Después de 10 ciclos de lavado con PBS /0.05% de Tween 20, se agregaron 40 µl de una dilución 1:700 de un preparado policlonal de inmunoglobulinas anti-Fab humano de cabra conjugadas con peroxidasa de rábano (Sigma) en PBS /1% de BSA. Después de 1 hora de incubación a 37 °C y una serie adicional de 10 lavados, se agregó el sustrato (OPD-o-fenilendiamina) a los pocillos. Después, las placas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se desactivó con ácido sulfúrico 1N y la densidad óptica se determinó por lectura espectrofotométrica a 450 nm. Todos los clones probados mostraron una reactividad específica contra cada lisado obtenido de las células infectadas con los virus del subtipo H1N1. Así, se seleccionó un clon bacteriano transformado con el vector de expresión que contiene los genes para el fragmento Fd de cadena ligera y cadena pesada de Fab49. El clon bacteriano seleccionado se denominó INF49.

Purificación del Fab49 y evaluación del mismo por ELISA sobre lisados de células infectadas

El Fab producido del clon INF49 (a partir de aquí denominado indistintamente el "clon" o el "Fab"), se purificó por inmunoafinidad en columnas compuestas de una resina de sepharose que contenía la proteína G (~ 2 mg/ml), a la que se enlazó covalentemente un preparado policlonal de anticuerpos de cabra capaces de unirse a los Fab's humanos (PIERCE, Illinois). Brevemente, una colonia del clon INF49 se inoculó en 10 ml de medio SB que contenía ampicilina y tetraciclina a las concentraciones de 50 µg/ml y 10 µg/ml, respectivamente. El cultivo, que se desarrolló durante la noche a 37 °C, se sub-inoculó en un matraz con 500 ml de SB añadidos, a la misma concentración de antibiótico que antes. Las células, inducidas subsiguientemente por IPTG 1 mM, se dejaron agitando durante la noche a 30 °C. El cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 25 minutos y la pella resuspendida en PBS se sometió a

sonicación. Fue necesaria una centrifugación adicional a 18,000 rpm durante 25 minutos para quitar los desechos celulares. El sobrenadante se filtró y luego se pasó lentamente a través de la columna de sepharose anteriormente descrita. Posteriormente, la resina se lavó con 10 volúmenes de PBS y finalmente los Fab's unidos se eluyeron con una solución ácida (amortiguador de elución – H₂O/HCl, pH 2.2). Las diversas fracciones recolectadas se neutralizaron con una solución adecuada (Tris 1 M, pH 9) y se concentraron por ultrafiltración (Centricon, Millipore). La pureza del Fab purificado se determinó corriendo una alícuota sobre un gel de poliacrilamida al 12% /dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Finalmente, diluciones en secuencia del Fab purificado se analizaron por medio de ELISA como se describe. En cada placa se incluyeron como control negativo preparados de Fab's monoclonales dirigidos contra la glicoproteína E2 de VHC. Los resultados de este experimento confirmaron los obtenidos previamente con los lisados bacterianos, confirmando la reactividad específica del clon hacia las células infectadas con los virus del subtipo H1N1.

Determinación de inmunofluorescencia del Fab49 obtenido por clonación en RBCAF

Para confirmar los datos obtenidos por ELISA, también se analizó el Fab49 mediante una prueba de inmunofluorescencia. Brevemente, las células de los cultivos infectados con todos los virus de referencia mencionados se tripsinizaron y, después de dos lavados en PBS, se contaron bajo un microscopio con un hematocitómetro. De esta manera, la suspensión celular se usó para preparar portaobjetos por centrifugación en una citocentrífuga (Cytospin4, Shandon Southern Products) a 90 g durante 3 minutos. Los portaobjetos así preparados contenían, cada uno, un total de 2×10^5 células. Se prepararon portaobjetos de control de forma similar con células no infectadas. Las células se fijaron y se permeabilizaron a temperatura ambiente con una solución de metanol-acetona (usada a una temperatura de -20 °C) durante 10 minutos. Después de 3 lavados en PBS, las células se incubaron con Fab49 (100 µg/ml) a 37 °C durante 30 minutos en una cámara húmeda, y subsiguientemente se lavaron tres veces en PBS. Después, las células se incubaron a 37 °C durante 30 minutos en la cámara húmeda en la oscuridad con un Fab de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma), diluido 1:200 en azul de Evans. Los portaobjetos se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia (Olympus). Como control positivo se usó un anticuerpo monoclonal de ratón comercial (Argene) específico para la proteína M1 del virus de la influenza. Como control negativo se usó un anticuerpo dirigido contra la glicoproteína E2 del virus de la hepatitis C (e509; Burioni et al, Hepatology, 1998). El Fab mostró, por inmunofluorescencia, una reactividad específica para todas las células infectadas con los aislados humanos del subtipo H1N1, es, el aislado A/Puerto Rico/8/34, el aislado A/Wilson-Smith/33 y el aislado A/Malaya/302/54. Se obtuvo un resultado similar con las células infectadas con el aislado porcino SW1 usado en el estudio. El patrón de fluorescencia mostrado fue claramente un patrón de tipo citoplasma. En cambio, no se observó fluorescencia en las células no infectadas, ni en las células infectadas con el virus del subtipo H3N2, ni en las infectadas con el aislado de tipo B, ni con el anticuerpo de control negativo.

Prueba de neutralización

Para caracterizar la actividad biológica in vitro del clon seleccionado, se diseñó una prueba de neutralización para algunos de los aislados virales de referencia usados en el estudio. Brevemente, se sembraron células MDCK (NSK en el caso del aislado porcino SW1) en MEM /10% de FBS en una placa de 96 pocillos (2×10^4 células/pocillo). Se prepararon diluciones en serie (de 10⁻¹ a 10⁻⁸) de las reservas del virus, obtenidas como se describe arriba, en un medio de mantenimiento (MEM con 2% de FBS). Cada dilución se repitió seis veces. Cuando las células cultivadas se hicieron confluentes, el medio de crecimiento se retiró y se agregaron a cada pocillo 100 µl de cada dilución del virus. Después de 1 hora a 37 °C, los inóculos se retiraron y se pusieron en cada pocillo 200 µl de medio MEM con 1 µg/ml de tripsina. El título viral, expresado como TCID₅₀ (la dosis que infecta el 50% del cultivo celular) se calculó aplicando la fórmula de Reed-Muench:

$$TCID_{50} = \frac{\text{Infectividad} > 50\% - 50\%}{\text{Infectividad} > 50\% - \text{infectividad} < 50\%} \times \text{factor de dilución}$$

A la luz de los datos obtenidos, la reserva del virus se diluyó a fin de usar una multiplicidad de infección (M.O.I.) de aproximadamente 0.01 (1 partícula de virus por 100 células) en el experimento de neutralización. En la prueba de neutralización real, las células se sembraron en una placa de 24 pocillos, cada pocillo conteniendo un portaobjetos estéril. El experimento de neutralización se hizo en células 80%-90% confluentes, esto es, aproximadamente 48 horas después de la siembra de las mismas. Después se prepararon diluciones del Fab49 purificado a fin de obtener concentraciones finales de 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml y 20 µg/ml. Se prepararon diluciones correspondientes del anticuerpo anti-VHC e509 como control negativo. Entonces el Fab se incubó a las diversas concentraciones con el mismo volumen de reserva de virus diluida (M.O.I. 0.01), a 37 °C durante 1 hora. Subsiguientemente, a los pocillos que contenían las células se les agregaron 250 µl de la mezcla de virus-Fab. Se hizo un control positivo de infección agregando el medio de cultivo solo a la reserva del virus. La placa se incubó a 37 °C durante 1 hora para permitir la adsorción del virus no neutralizado. Después, el inóculo se retiró y las células se lavaron dos veces con PBS. A cada pocillo se le agregaron 1.5 ml de medio libre de suero con 1 µg/ml de tripsina. Después de 6 horas de incubación a 37 °C, la monocapa celular se lavó con PBS y se fijó con una solución fría de metanol-acetona (proporción 1:2, almacenada a -20 °C), durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fijas se lavaron y se incubaron con

250 µl de un anticuerpo monoclonal anti-M1 comercial (Argene) a 37 °C durante 30 minutos en una cámara húmeda. Las células se lavaron con PBS y finalmente se incubaron con un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con fluoresceína, diluido en azul de Evans, a 37 °C durante 30 minutos, en una cámara húmeda en la oscuridad. Después de tres lavados en PBS, finalmente los portaobjetos se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia.

5 La actividad neutralizante de Fab49 se determinó contando las células positivas individuales y calculando la reducción del porcentaje del número de células infectadas en comparación con el control positivo infectado con el virus solo. Las pruebas de neutralización se efectuaron en tres sesiones separadas para cada aislado usado en las pruebas de neutralización (véanse las figuras 1-3). En cada experimento, las diferentes diluciones de Fab49 se repitieron por triplicado, de forma similar a la realizada para los controles de infección negativos (Fab e509 anti-E2/VHC) y positivos (virus y libre de Fab).

El Fab producido por el clon INF49 mostró una actividad de neutralización cruzada de homotipo contra los aislados humanos y animales del virus A del subtipo H1N1. En cambio, no se detectó reducción en la capacidad de infectividad de los dos virus del subtipo H3N2 ni del virus de tipo B usados en el estudio, confirmando la especificidad de la actividad neutralizante de homotipo observada para el subtipo H1N1. En particular, el Fab producido por el clon INF49 (llamado Fab49) mostró una CI50 (concentración de Fab que inhibe el 50% de la infección del aislado de virus probado) menor de 5 µg/ml para cada aislado del subtipo H1N1 probado, esto es, una concentración que es fácilmente obtenible mediante una administración in vivo de las moléculas en cuestión, incluso sin tomar en cuenta el aumento usualmente considerable de la actividad biológica neutralizante observada cuando los Fabs son convertidos a la forma de inmunoglobulina completa, una de las posibles composiciones farmacéuticas incluidas en el alcance de la invención.

Las figuras 1-3 resumen los resultados obtenidos con Fab49, producido por el clon INF49, en las diferentes sesiones de neutralización realizadas sobre los diversos aislados de virus de influenza del subtipo H1N1 usados en el estudio.

Particularmente, la figura 1 es una gráfica que ilustra el porcentaje de neutralización del virus A/Puerto Rico/8/34 con diferentes concentraciones de Fab49. Los resultados obtenidos con el Fab e509 anti-VHC humano se reportan como un control negativo.

La figura 2 es una gráfica que ilustra el porcentaje de neutralización del aislado A/Wilson-Smith/33 con diferentes concentraciones de Fab49. Los resultados obtenidos con el Fab e509 anti-VHC humano se reportan como un control negativo.

La figura 3 ilustra el porcentaje de neutralización del aislado porcino de campo SW1 usado aquí con diferentes concentraciones de Fab49. Los resultados obtenidos con el Fab e509 anti-VHC humano se reportan como un control negativo.

Caracterización del antígeno reconocido por Fab49: Western blot en un lisado de células infectadas

En un gel de poliacrilamida al 10% se corrieron 10 µg de un lisado celular infectado con el aislado A/Puerto Rico/8/34, preparado como se describe arriba, bajo condiciones naturales. Para este fin, las muestras se corrieron a 100V durante 1 hora en un tanque refrigerado adecuado (BIORAD). Posteriormente, el gel se retiró del aparato de electroforesis y se incubó 10 minutos en un amortiguador de transferencia (Tris base 3 g; glicina 14.41 g, H₂O 800 ml, metanol 200 ml), para eliminar cualquier residuo de detergente. Entonces se hizo la transferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL; Amersham Biosciences) durante la noche a 30V y 90 mA. Luego la membrana se bloqueó durante 1 hora con leche en polvo disuelta al 5% en PBS 1X y se lavó tres veces en PBS 1X /0.1% de Tween. Durante cada lavado, la membrana se dejó agitando en una plataforma mecedora durante 10 minutos. Después de esto los diferentes Fab's, diluidos en PBS con 5% de leche en polvo, se agregaron a una concentración de 5 µg/ml. Además del Fab49, se agregaron los siguientes controles: e509 como control negativo; IgG1 completa de ratón anti-HA comercial (COVANCE); IgG1 completa de ratón anti-M1 comercial (ARGENE); IgG1 completa de ratón anti-M2 (ABCAM); suero humano diluido 1:200. Cada anticuerpo se dejó agitando 1 hora a temperatura ambiente. Después, la membrana se lavó nuevamente en PBS como se describió arriba. Entonces se agregaron los mismos anticuerpos secundarios de ratón (1:1000) o humano (1:2000) como se describe para la prueba de ELISA, dependiendo de la fuente del anticuerpo que se va a detectar. Para la detección de la señal se preparó una solución de trabajo mezclando dos substratos (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Pierce) en una proporción 1:1, teniendo particular cuidado de no exponerlos a fuentes de luz. La membrana de nitrocelulosa se incubó 5 minutos con la solución de trabajo y después se retiró y se montó en un HyperCassette (AMERSHAM). Este se reveló en una película Kodak en el cuarto oscuro después del tiempo de exposición necesario. La prueba descrita se hizo en dos sesiones diferentes, y en cada una de ellas la porción de membrana incubada con Fab49 mostró la presencia de una banda que pesaba ligeramente menos de 80 KDa, consistentemente con el peso de la forma inmadura de la hemaglutinina viral (HA0). Esto se confirmó porque la misma banda también se desplegó en la tira incubada con el anticuerpo de control anti-hemaglutinina. También se detectó una banda análoga más intensa que las otras en la porción de membrana incubada con suero humano. El resultado de este experimento muestra que el anticuerpo se dirige contra la hemaglutinina del virus de la influenza, lo que es perfectamente consistente con los datos de neutralización, pues se sabe que la hemaglutinina es el blanco principal de la respuesta neutralizante humoral.

Pruebas de unión y neutralización para la HA del virus de la influenza A del subtipo H1N1 (influenza porcina)

5 Las proteínas HA de los virus de influenza A/PR/08/1934 y A/California/04/2009 se amplificaron, respectivamente, del sobrenadante de células MDCK infectadas, o se sintetizaron in vitro (Ge-nART, Ragensburg, Alemania), y se clonaron en vectores de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen), obteniendo así una construcción H1 HA (A/PR/08/1934) y una construcción HI HA (A/California/04/2009).

10 Las secuencias de ADNc y de aminoácidos de las proteínas HA de los dos aislados arriba indicados se presentan en el listado de secuencias como la SEQ ID NO: 6 (secuencia de ADNc de la proteína HA de A/PR/08/1934), la SEQ ID NO: 7 (secuencia de aminoácidos de la proteína HA de A/PR/08/1934), la SEQ ID NO: 8 (secuencia de ADNc de la proteína HA de A/California/04/2009), y la SEQ ID NO: 9 (secuencia de aminoácidos de la proteína HA de A/California/04/2009), respectivamente.

15 Células epiteliales de riñón humano (HEK) 293T se transfectaron con 3 µg del vector recombinante pcDNA3.1 que contiene la construcción H1 HA (A/PR/08/1934) o la construcción H1 HA (A/California/04/2009). Después de centrifugación y fijación, las células transfectadas se incubaron con Fab49 (10 µg/ml). Después de más lavados, las células se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-Fab humano conjugado con FITC y se probaron mediante FACS. Los datos se analizaron como lo describen Perotti et al., J Virology, enero de 2008; 82(2): 1047-52. El
20 experimento demostró que Fab49 reconoce las células 293T transfectadas con cualquiera de los vectores recombinantes.

25 Para la prueba de neutralización se hicieron vectores de retrovirus modificados a fin de expresar proteínas HA de influenza sobre su pericápside (pseudo-tipificación), incluso el gen reportero Luc, partiendo de las células 293T cotransfectadas con FuGene 6 (Roche) y los siguientes plásmidos: sistema Luc (5 µg de pCMVΔR8.2 y 5.5 µg de pHR'CMV-Luc) más 3 µg de la construcción H1 HA (A/PR/08/1934) o H1 HA (A/California/04/2009). Los sobrenadantes se recogieron 48 horas después de la transfección, se filtraron a través de un filtro de unión de proteína baja de 0.45 µm y se usaron inmediatamente o se congelaron a -80 °C. Los títulos de los pseudo-tipos de HA se midieron en células 293T y MDCK. Brevemente, 48 horas después de la infección de las células con 100 µl
30 del vector de lentivirus Luc HA-pseudo-tipificado (HA-Luc) a diferentes diluciones, las células, en placas de 96 pocillos, se lisaron en un amortiguador de lisis celular de prueba de Luc (reactivo de prueba de luciferasa, Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los títulos de los pseudo-tipos se expresaron como unidades de luminiscencia relativas (RLU/ml).

35 La actividad de neutralización de Fab49 se probó usando una prueba de neutralización basada en pseudo-partículas de influenza. Este enfoque mostró que Fab49 tiene una fuerte actividad neutralizadora contra todas las pseudo-partículas del virus de influenza generadas con los dos aislados del subtipo H1N1 (A/PR/08/1934 y H1 HA (A/California/04/2009), con una CI50 de aproximadamente 2 µg/ml.

40 Listado de secuencias

<110> Solicitante: POMONA RICERCA S.R.L.

45 <120> Título de la invención: Anticuerpos monoclonales que tienen propiedades de neutralización cruzada de homosubtipo contra los virus de la influenza A del subtipo H1

<130> Número de referencia: E073330-BEE-EC

50 <160> Números de secuencias: 9

<170> Software: PatentIn versión 3.3

<210> SEQ ID NO: 1

55 <211> Longitud: 117

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Artificial

60 <220> Característica:

<223> Otra Información: secuencia de anticuerpo humano o humanizado

65 <400> Secuencia: 1

ES 2 555 486 T3

	Leu 1	Glu	Ser	Gly	Gly 5	Gly	Leu	Val	Gln	Pro 10	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg 15	Leu
5	Ser	Cys	Ala	Ala 20	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe 25	Ser	Ser	Tyr	Ala	Met 30	Ser	Trp
	Val	Arg	Gln 35	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly 40	Leu	Glu	Trp	Val	Ser 45	Thr	Val	Asn
10	Ser	Gly 50	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr 55	Tyr	Gly	Asp	Ser	Val 60	Arg	Gly	Arg	Phe
	Thr 65	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn 70	Ser	Lys	Ser	Thr	Leu 75	Tyr	Leu	Gln	Leu	Asn 80
15	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu 85	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr 90	Tyr	Cys	Ala	Lys	Asp 95	Lys
	Gly	Arg	Pro	Ile 100	Phe	Gly	Leu	Val	Thr 105	Pro	Ser	Tyr	Tyr	Met 110	Asp	Val
20	Trp	Gly	Asn 115	Gly	Thr											

25 <210> SEQ ID NO: 2

<211> Longitud: 100

<212> Tipo: PRT

30

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

35 <223> Otra Información: secuencia de anticuerpo humano o humanizado

<400> Secuencia: 2

40	Glu 1	Leu	Thr	Gln	Ser 5	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser 10	Ala	Ser	Val	Gly	Asp 15	Ser
	Val	Thr	Ile	Thr 20	Cys	Arg	Thr	Ser	Glu 25	Arg	Ile	Ser	Thr	Tyr 30	Leu	Asn
45	Trp	Tyr	Gln 35	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys 40	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu 45	Val	Ser	Gly
	Ala	Ser 50	Thr	Leu	Gln	Gly	Gly 55	Val	Pro	Ser	Arg	Phe 60	Ser	Gly	Ser	Gly
50	Ser 65	Gly	Thr	Ala	Phe	Thr 70	Leu	Thr	Ile	Asn	Ser 75	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp 80
	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr 85	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr 90	Ser	Thr	Pro	Leu	Thr 95	Phe
55	Gly	Gly	Gly	Thr 100												

60 <210> SEQ ID NO: 3

<211> Longitud: 351

<212> Tipo: ADN

65

<213> Organismo: Artificial

ES 2 555 486 T3

<220> Característica:

<223> Otra Información: secuencia de ADNc de anticuerpo humano o humanizado

5

<400> Secuencia: 3

ctcgagtctg ggggaggctt ggtacagcct ggggggtccc taagactctc ctgtgcagcc 60

10 tctggaatca catttagcag ctatgccatg agctgggtcc gccaggctcc aggaagggg 120

ctggagtggg tctcaactgt taacagtgtt ggtgtagta catactacgg agactccgtg 180

15 aggggccggt tcaccatctc cagagacaac tccaagagca cgctgtacct gcaactgaac 240

agcctgagag ccgaggacac ggccatatat tactgtgcga aagataaggg tcgtccgatt 300

ttggactgg tcacccatc atactacatg gacgtctggg gcaatgggac c 351

20 <210> SEQ ID NO: 4

<211> Longitud: 300

<212> Tipo: ADN

25

<213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

30 <223> Otra Información: secuencia de ADNc de anticuerpo humano o humanizado

<400> Secuencia: 4

gagctcacc agtctccatc ctccctgtct gcatctgtag gagacagcgt caccatcact 60

35

tgtcggaaa gtgagagaat tagcacctat ttaaattggt atcagcagaa accagggaaa 120

gcccctaggc tcttggctc tgggtcatcc actttgcaag gtgggtccc atcaaggttc 180

40 agtggcagtg gatctgggac agcttctact cttaccatca acagtctgca gcctgaagat 240

tttgcaactt actactgtca acagagttac agtaccaccac tcactttcgg cggagggacc 300

45 <210> SEQ ID NO: 5

<211> Longitud: 610

<212> Tipo: ADN

50 <213> Organismo: virus de la Influenza A

<400> Secuencia: 5

tgatcagaaa gcacacaaaa tgcaattgac gggatcagca acaagtgaa ctcagtaatt 60

55

gagaaaatga aactcaatt cactgcagtg ggcaaggagt tcaatgatct agaaaaagg 120

attgagaatt tgaataagaa ggtcgtatgat gggttttgg atgtttggac atataatgct 180

60 gagttgctg tttgctcga gaacgaaagg actctagatt tccatgactt taacgtaaga 240

aatttatatg aaaaggtaaa atcacaattg agaaacaatg ccaaagaaat cggaatggt 300

tgtttgagt tctatcaca atgtgatgat gaatgcatgg agagcgtgaa gaatggcaca 360

65

tataactatc ccaaataatc araagaatcc aaattgaata gagaggaaat agacggtgtg 420

ES 2 555 486 T3

aaactagaat caatgggggt ttaccagatt ttggcgatct actccacagt cgccagtcc 480
ctggcttgt tagtccccct gggggcaatc agcttctgga tgtgttctaa tgggtcattg 540
5 caatgcagaa tatgcattta agacttgaat ttcaaaatgt atggaaaaac acccttgitt 600
ctactaatac 610

10 <210> SEQ ID NO: 6
<211> Longitud: 1698
<212> Tipo: ADN
15 <213> Organismo: virus de la Influenza A
<400> Secuencia: 6

20 atgaaggcaa acctactggt cctgttatgt gcactgcag ctgcagatgc agacacaata 60
tgtataggct accatcgaa caattcaacc gacactgtg acacagtact cgagaagaat 120
gtgacagtga cacactctgt taacctgctc gaagacagcc acaacggaaa actatgtaga 180
25 ttaaaaggaa tagccccact acaattgggg aatgtaaca tcgccgatg gctcttggga 240
aatccagaat gcgaccact gctccagtg agatcatggt cctacattgt agaaacacca 300
30 aactctgaga atggaatat ttaccagga gatttcatcg actatgagga gctgagggag 360
caattgagct cagtgtcatc attcgaaga ttcgaaatat ttccaaaga aagctcatgg 420
ccaaccaca acacaaacgg agtaacggca gcatgctccc atgaggggaa aagcagtttt 480
35 tacagaaatt tgctatggct gacggagaag gagggycat acccaaagct gaaaaattct 540
tatgtgaaca aaaaagggaa agaagtcct gtactgtggg gtattcatca cccgtctaac 600
40 agtaaggaac aacagaatct ctatcagaat gaaaatgctt atgtctctgt agtgactca 660
aattataaca ggagatttac cccggaaata gcagaaagac ccaaagtaag agatcaagct 720
45 gggaggatga actattactg gaccttgcta aaacccggag acacaataat attgaggca 780
aatggaatc taatagcacc aatgtatgct ttgcactga gtagaggctt tgggtccggc 840
atcatcacct caaacgcatc aatgcatgag tgtaacacga agtgtcaaac acccctggga 900
50 gctataaaca gcagtctccc ttaccagaat atacaccag tcacaatagg agagtgccca 960
aaatacgtca ggagtgccaa attgaggatg gttacaggac taaggaacat tccgtccatt 1020
caatccagag gtctatttg agccattgcc ggtttattg aaggggatg gactggaatg 1080
55 atagatggat ggtatggta tcatcatcag aatgaacagg gatcaggcta tgcagcggat 1140
caaaaaagca cacaaaatgc cattaacggg attacaaaca aggtgaacac tttatcgag 1200
60 aaaatgaaca ttcaattcac agctgtgggt aaagaattca acaaattaga aaaaaggatg 1260
gaaaattaa ataaaaaagt tgatgatgga tttctggaca tttggacata taatgcagaa 1320
ttgttagttc tactggaaaa tgaaaggact ctggatttcc atgactcaa tgtgaagaat 1380
65 ctgtatgaga aagtaaaaag ccaattaaag aataatgcca aagaaatcg aatatagatg 1440

ES 2 555 486 T3

tttgagtct accacaagtg tgacaatgaa tgcattgaaa gtgtaagaaa tgggacttat 1500

gattatccca aatattcaga agagtcaaag ttgaacaggg aaaaggtaga tggagtgaaa 1560

5

ttggaatcaa tggggatcta tcagattctg gcgatctact caactgtcgc cagttcactg 1620

gtgctttgg tctccctggg ggcaatcagt tctggatgt gttctaattg atctttgcag 1680

10

tgcagaatat gcatctga 1698

<210> SEQ ID NO: 7

<211> Longitud: 565

15

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: virus de la Influenza A

20

<220> Característica:

<221> Nombre/Clave: característica_misc

<222> Ubicación: (173)..(173)

25

<223> Otra Información: Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> Secuencia: 7

30	Met	Lys	Ala	Asn	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp
	1				5					10					15	
	Ala	Asp	Thr	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr	His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Asp	Thr
				20					25					30		
35	Val	Asp	Thr	Val	Leu	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Val	Thr	His	Ser	Val	Asn
			35					40					45			
	Leu	Leu	Glu	Asp	Ser	His	Asn	Gly	Lys	Leu	Cys	Arg	Leu	Lys	Gly	Ile
							55					60				
	Ala	Pro	Leu	Gln	Leu	Gly	Lys	Cys	Asn	Ile	Ala	Gly	Trp	Leu	Leu	Gly
						70					75					80
45	Asn	Pro	Glu	Cys	Asp	Pro	Leu	Leu	Pro	Val	Arg	Ser	Trp	Ser	Tyr	Ile
					85					90					95	
	Val	Glu	Thr	Pro	Asn	Ser	Glu	Asn	Gly	Ile	Cys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Phe
			100						105					110		
50	Ile	Asp	Tyr	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Phe
			115					120					125			
	Glu	Arg	Phe	Glu	Ile	Phe	Pro	Lys	Glu	Ser	Ser	Trp	Pro	Asn	His	Asn
							135					140				
55	Thr	Asn	Gly	Val	Thr	Ala	Ala	Cys	Ser	His	Glu	Gly	Lys	Ser	Ser	Phe
						150					155					160
	Tyr	Arg	Asn	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	Glu	Lys	Glu	Gly	Xaa	Tyr	Pro	Lys
					165					170					175	
	Leu	Lys	Asn	Ser	Tyr	Val	Asn	Lys	Lys	Gly	Lys	Glu	Val	Leu	Val	Leu
				180					185					190		
65	Trp	Gly	Ile	His	His	Pro	Ser	Asn	Ser	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	Leu	Tyr

ES 2 555 486 T3

	195				200				205							
5	Gln	Asn 210	Glu	Asn	Ala	Tyr	Val 215	Ser	Val	Val	Thr	Ser 220	Asn	Tyr	Asn	Arg
	Arg 225	Phe	Thr	Pro	Glu	Ile 230	Ala	Glu	Arg	Pro	Lys 235	Val	Arg	Asp	Gln	Ala 240
10	Gly	Arg	Met	Asn	Tyr 245	Tyr	Trp	Thr	Leu	Leu 250	Lys	Pro	Gly	Asp	Thr 255	Ile
	Ile	Phe	Glu	Ala 260	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile 265	Ala	Pro	Met	Tyr	Ala 270	Phe	Ala
15	Leu	Ser	Arg 275	Gly	Phe	Gly	Ser	Gly 280	Ile	Ile	Thr	Ser	Asn 285	Ala	Ser	Met
	His	Glu 290	Cys	Asn	Thr	Lys	Cys 295	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly 300	Ala	Ile	Asn	Ser
20	Ser 305	Leu	Pro	Tyr	Gln	Asn 310	Ile	His	Pro	Val	Thr 315	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro 320
	Lys	Tyr	Val	Arg	Ser 325	Ala	Lys	Leu	Arg	Met 330	Val	Thr	Gly	Leu	Arg 335	Asn
25	Ile	Pro	Ser	Ile 340	Gln	Ser	Arg	Gly	Leu 345	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala 350	Gly	Phe
30	Ile	Glu	Gly 355	Gly	Trp	Thr	Gly	Met 360	Ile	Asp	Gly	Trp	Tyr 365	Gly	Tyr	His
	His	Gln 370	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser 375	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp 380	Gln	Lys	Ser	Thr
35	Gln 385	Asn	Ala	Ile	Asn	Gly 390	Ile	Thr	Asn	Lys	Val 395	Asn	Thr	Val	Ile	Glu 400
40	Lys	Met	Asn	Ile	Gln 405	Phe	Thr	Ala	Val	Gly 410	Lys	Glu	Phe	Asn	Lys 415	Leu
	Glu	Lys	Arg	Met 420	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys 425	Lys	Val	Asp	Asp	Gly 430	Phe	Leu
45	Asp	Ile	Trp 435	Thr	Tyr	Asn	Ala	Glu 440	Leu	Leu	Val	Leu	Leu 445	Glu	Asn	Glu
	Arg	Thr 450	Leu	Asp	Phe	His	Asp 455	Ser	Asn	Val	Lys	Asn 460	Leu	Tyr	Glu	Lys
50	Val 465	Lys	Ser	Gln	Leu	Lys 470	Asn	Asn	Ala	Lys	Glu 475	Ile	Gly	Asn	Arg	Cys 480
	Phe	Glu	Phe	Tyr	His 485	Lys	Cys	Asp	Asn	Glu 490	Cys	Met	Glu	Ser	Val 495	Arg
55	Asn	Gly	Thr	Tyr 500	Asp	Tyr	Pro	Lys	Tyr 505	Ser	Glu	Glu	Ser	Lys 510	Leu	Asn
60	Arg	Glu	Lys 515	Val	Asp	Gly	Val	Lys 520	Leu	Glu	Ser	Met	Gly 525	Ile	Tyr	Gln
	Ile	Leu 530	Ala	Ile	Tyr	Ser	Thr 535	Val	Ala	Ser	Ser	Leu 540	Val	Leu	Leu	Val
65	Ser	Leu	Gly	Ala	Ile	Ser	Phe	Trp	Met	Cys	Ser	Asn	Gly	Ser	Leu	Gln

ES 2 555 486 T3

545 550 555 560

Cys Arg Ile Cys Ile
565

5 <210> SEQ ID NO: 8
<211> Longitud: 1701
10 <212> Tipo: ADN
<213> Organismo: virus de la Influenza A
<400> Secuencia: 8
15 atgaaggcaa tactagtagt tctgctatat acattgcaa cgcgaaatgc agacacatta 60
tgtatagggt atcatgcgaa caattcaaca gacactgtag acacagtact agaaaagaat 120
20 gtaacagtaa cacactctgt taaccttcta gaagacaagc ataacgggaa actatgcaaa 180
ctaagagggg tagccccatt gcatttgggt aatgtaaca ttgctggctg gatcctggga 240
aatccagagt gtgaactact ctccacagca agctcatggt cctacattgt ggaaacacct 300
25 agtcagaca atggaacgtg ttaccagga gatttcatcg attatgagga gctaagagag 360
caattgagct cagtgtcatc attgaaagg ttgagatat tcccaagac aagttcatgg 420
30 cccaatcatg actcgaacaa aggtgtaacg gcagcatgtc ctcatgctgg agcaaaaagc 480
ttctacaaa atttaatatg gctagttaa aaaggaatt catacccaa gctcagcaa 540
tctacatta atgataaagg gaaagaagtc ctctgtctat gggcattca ccatccatct 600
35 actagtctg accaacaag tctctatcag aatgcagata catatgttt tgtgggtca 660
tcaagataca gcaagaagt caagccgaa atagcaataa gacccaaagt gagggatcaa 720
40 gaaggagaa tgaactatta ctggacacta gtagagccg gagacaaaat aacattcga 780
gcaactggaa atctagtgtt accgagatat gcattcga tggaagaaa tgctggatct 840
ggtattatca tttagatac accagtccac gattgcaata caactgtca aacaccaag 900
45 ggtgctataa acaccagcct cccattcag aatatacatc cgatcacaat tggaaatgt 960
ccaaaatag taaaagcac aaaattgaga ctggccacag gattgaggaa tatcccgtct 1020
50 attcaatcta gaggcctatt tggggccatt gccggttca ttgaagggg gtggacagg 1080
atggtagatg gatggtacgg ttaccatc caaatgagc aggggtcagg atatgcagcc 1140
gacctgaaga gcacacagaa tgccattgac gagattacta acaaagtaa ttctgtatt 1200
55 gaaaagatga atacacagtt cacagcagta ggtaaagagt tcaaccacct ggaaaaaga 1260
atagagaatt taaataaaa agttagatg gtttctctgg acatttggac ttacaatgcc 1320
60 gaactgttg ttctattgga aatgaaaga actttggact accacgattc aatgtgaag 1380
aacttatag aaaaggtgag aagccagcta aaaaacaatg ccaaggaaat tggaaacggc 1440
tgcttgaat ttaccacaa atgcgataac acgtgcatgg aaagtgtcaa aatgggact 1500
65 tatgactacc caaatactc agaggaagca aattaaaca gagaagaaat agatgggta 1560

ES 2 555 486 T3

aagctggaat caacaaggat ttaccagatt ttggcgatct attcaactgt cgccagtca 1620

ttggactgg tagtctcct gggggcaatc agttctgga tgtgtctaa tgggtctca 1680

5 cagtgtagaa tatgtatta a 1701

<210> SEQ ID NO: 9

10 <211> Longitud: 566

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: virus de la Influenza A

15 <400> Secuencia: 9

20	Met 1	Lys	Ala	Ile	Leu 5	Val	Val	Leu	Leu	Tyr 10	Thr	Phe	Ala	Thr	Ala 15	Asn
	Ala	Asp	Thr	Leu 20	Cys	Ile	Gly	Tyr	His 25	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr 30	Asp	Thr
25	Val	Asp	Thr 35	Val	Leu	Glu	Lys	Asn 40	Val	Thr	Val	Thr	His 45	Ser	Val	Asn
	Leu	Leu 50	Glu	Asp	Lys	His	Asn 55	Gly	Lys	Leu	Cys	Lys 60	Leu	Arg	Gly	Val
30	Ala 65	Pro	Leu	His	Leu	Gly 70	Lys	Cys	Asn	Ile	Ala 75	Gly	Trp	Ile	Leu	Gly 80
	Asn	Pro	Glu	Cys	Glu 85	Ser	Leu	Ser	Thr	Ala 90	Ser	Ser	Trp	Ser	Tyr 95	Ile
35	Val	Glu	Thr	Pro 100	Ser	Ser	Asp	Asn	Gly 105	Thr	Cys	Tyr	Pro	Gly 110	Asp	Phe
40	Ile	Asp	Tyr 115	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu 120	Gln	Leu	Ser	Ser	Val 125	Ser	Ser	Phe
	Glu	Arg 130	Phe	Glu	Ile	Phe	Pro 135	Lys	Thr	Ser	Ser	Trp 140	Pro	Asn	His	Asp
45	Ser 145	Asn	Lys	Gly	Val	Thr 150	Ala	Ala	Cys	Pro	His 155	Ala	Gly	Ala	Lys	Ser 160
	Phe	Tyr	Lys	Asn	Leu 165	Ile	Trp	Leu	Val	Lys 170	Lys	Gly	Asn	Ser	Tyr 175	Pro
50	Lys	Leu	Ser	Lys 180	Ser	Tyr	Ile	Asn	Asp 185	Lys	Gly	Lys	Glu	Val 190	Leu	Val
55	Leu	Trp	Gly 195	Ile	His	His	Pro	Ser 200	Thr	Ser	Ala	Asp	Gln 205	Gln	Ser	Leu
	Tyr	Gln 210	Asn	Ala	Asp	Thr	Tyr 215	Val	Phe	Val	Gly	Ser 220	Ser	Arg	Tyr	Ser
60	Lys 225	Lys	Phe	Lys	Pro	Glu 230	Ile	Ala	Ile	Arg	Pro 235	Lys	Val	Arg	Asp	Gln 240
	Glu	Gly	Arg	Met	Asn 245	Tyr	Tyr	Trp	Thr	Leu 250	Val	Glu	Pro	Gly	Asp 255	Lys
65	Ile	Thr	Phe	Glu	Ala	Thr	Gly	Asn	Leu	Val	Val	Pro	Arg	Tyr	Ala	Phe

ES 2 555 486 T3

	260					265					270					
5	Ala	Met	Glu 275	Arg	Asn	Ala	Gly	Ser 280	Gly	Ile	Ile	Ile	Ser 285	Asp	Thr	Pro
	Val	His 290	Asp	Cys	Asn	Thr	Thr 295	Cys	Gln	Thr	Pro	Lys 300	Gly	Ala	Ile	Asn
10	Thr 305	Ser	Leu	Pro	Phe	Gln 310	Asn	Ile	His	Pro	Ile 315	Thr	Ile	Gly	Lys	Cys 320
	Pro	Lys	Tyr	Val	Lys 325	Ser	Thr	Lys	Leu	Arg 330	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu 335	Arg
15	Asn	Ile	Pro	Ser 340	Ile	Gln	Ser	Arg	Gly 345	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile 350	Ala	Gly
20	Phe	Ile	Glu 355	Gly	Gly	Trp	Thr	Gly 360	Met	Val	Asp	Gly	Trp 365	Tyr	Gly	Tyr
	His	His 370	Gln	Asn	Glu	Gln	Gly 375	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala 380	Asp	Leu	Lys	Ser
25	Thr 385	Gln	Asn	Ala	Ile	Asp 390	Glu	Ile	Thr	Asn	Lys 395	Val	Asn	Ser	Val	Ile 400
	Glu	Lys	Met	Asn	Thr 405	Gln	Phe	Thr	Ala	Val 410	Gly	Lys	Glu	Phe	Asn 415	His
30	Leu	Glu	Lys	Arg 420	Ile	Glu	Asn	Leu	Asn 425	Lys	Lys	Val	Asp	Asp 430	Gly	Phe
35	Leu	Asp	Ile 435	Trp	Thr	Tyr	Asn	Ala 440	Glu	Leu	Leu	Val	Leu 445	Leu	Glu	Asn
	Glu	Arg 450	Thr	Leu	Asp	Tyr	His 455	Asp	Ser	Asn	Val	Lys 460	Asn	Leu	Tyr	Glu
40	Lys 465	Val	Arg	Ser	Gln	Leu 470	Lys	Asn	Asn	Ala	Lys 475	Glu	Ile	Gly	Asn	Gly 480
	Cys	Phe	Glu	Phe	Tyr 485	His	Lys	Cys	Asp	Asn 490	Thr	Cys	Met	Glu	Ser 495	Val
45	Lys	Asn	Gly	Thr 500	Tyr	Asp	Tyr	Pro	Lys 505	Tyr	Ser	Glu	Glu	Ala 510	Lys	Leu
50	Asn	Arg	Glu 515	Glu	Ile	Asp	Gly	Val 520	Lys	Leu	Glu	Ser	Thr 525	Arg	Ile	Tyr
	Gln	Ile 530	Leu	Ala	Ile	Tyr	Ser 535	Thr	Val	Ala	Ser	Ser 540	Leu	Val	Leu	Val
55	Val 545	Ser	Leu	Gly	Ala	Ile 550	Ser	Phe	Trp	Met	Cys 555	Ser	Asn	Gly	Ser	Leu 560
	Gln	Cys	Arg	Ile	Cys 565	Ile										

REIVINDICACIONES

- 1.- Un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra el virus de la influenza A, que reconoce a la hemaglutinina como antígeno, caracterizado porque tiene una actividad neutralizante contra una pluralidad de aislados del virus de la influenza A del subtipo H1, en donde dicha pluralidad de aislados del virus de la influenza A del subtipo H1 comprende por lo menos un aislado derivado de humano y un aislado derivado de animal.
- 2.- El anticuerpo monoclonal humano de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha pluralidad de aislados del virus de la influenza A del subtipo H1 comprende por lo menos los siguientes aislados: A/Puerto Rico/8/34, A/Wilson-Smith/33 y A/Malaya/302/54.
- 3.- El anticuerpo monoclonal humano de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha pluralidad de aislados del virus de la influenza A del subtipo H1 comprende por lo menos los siguientes aislados: A/Puerto Rico/8/34, A/Wilson-Smith/33, A/Malaya/302/54 y A/California/04/2009.
- 4.- El anticuerpo monoclonal humano de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende por lo menos un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera; y el dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y el dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 5.- El anticuerpo monoclonal humano de conformidad con la reivindicación 4 que comprende por lo menos un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera; el dominio variable de cadena pesada siendo codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, y el dominio variable de cadena ligera siendo codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.
- 6.- El anticuerpo monoclonal humano de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que se selecciona del grupo que consiste en inmunoglobulinas completas y fragmentos de inmunoglobulina que comprenden por lo menos un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera.
- 7.- El anticuerpo monoclonal humano de conformidad con la reivindicación 6, en donde dichos fragmentos de inmunoglobulina se seleccionan del grupo que consiste en fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv, anticuerpos de una sola cadena (scFv).
- 8.- Un anticuerpo anti-idiotipo que está dirigido específicamente contra el idiotipo de un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 9.- Secuencias de nucleótidos aisladas SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
- 10.- Un vector de expresión que comprende las dos secuencias de nucleótidos, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
- 11.- Una célula hospedera transformada con un vector de expresión de conformidad con la reivindicación 10.
- 12.- Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 13.- Un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para usarse en el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades causadas directa o indirectamente por infección con un virus de la influenza A que expresa la hemaglutinina del subtipo H1.
- 14.- El anticuerpo para usar de conformidad con la reivindicación 13, en donde la enfermedad causada por infección con un virus de la influenza A que expresa la hemaglutinina del subtipo H1, es el síndrome de influenza.
- 15.- El anticuerpo para usar de conformidad con la reivindicación 14, en donde dicha enfermedad es causada por infección con el virus de la influenza A H1N1, denominado también virus de la influenza porcina o virus de la nueva influenza.
- 16.- Un método de prueba para detectar, en una muestra biológica de un paciente, la presencia de anticuerpos contra el virus de la influenza que tienen propiedades de neutralización cruzada de homotipo para los virus de la influenza A que expresan la hemaglutinina del subtipo H1, que comprende poner en contacto dicha muestra biológica con un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 como un reactivo de prueba específico.
- 17.- Un método de prueba para detectar, en una composición inmunogénica o de vacuna, la presencia de epítomos de virus de la influenza A que expresan la hemaglutinina del subtipo H1, capaces de provocar anticuerpos contra el virus de la influenza A que tienen propiedades de neutralización cruzada de homotipo contra virus de la influenza A que expresan la hemaglutinina del subtipo H1, en un sujeto al cual se administra la composición, que comprende

poner en contacto dicha composición con un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 como un reactivo de prueba específico.

- 5 18.- Un kit que comprende un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 como reactivo específico para detectar o cuantificar anticuerpos contra el virus de la influenza A, que tienen propiedades de neutralización cruzada de homosubtipo contra los virus de la influenza A que expresan la hemaglutinina del subtipo H1, en una muestra biológica obtenida de un paciente o una composición inmunogénica o de vacuna.

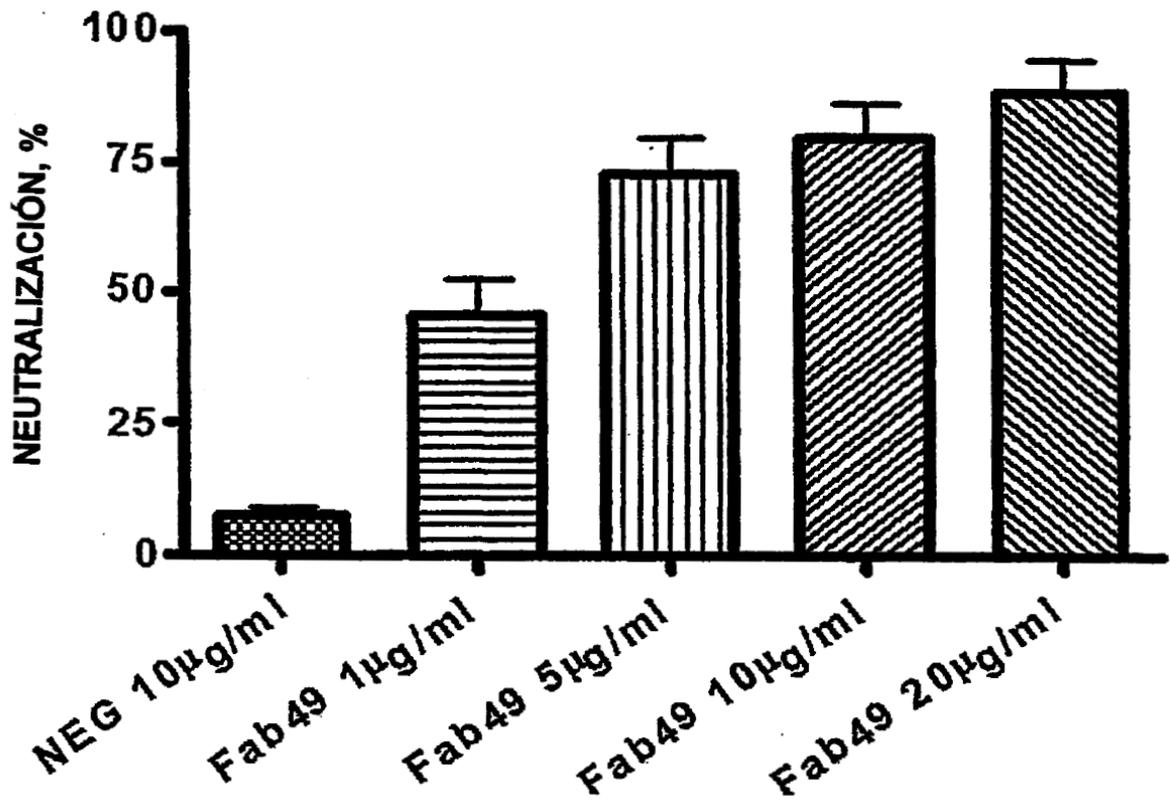


FIG. 1

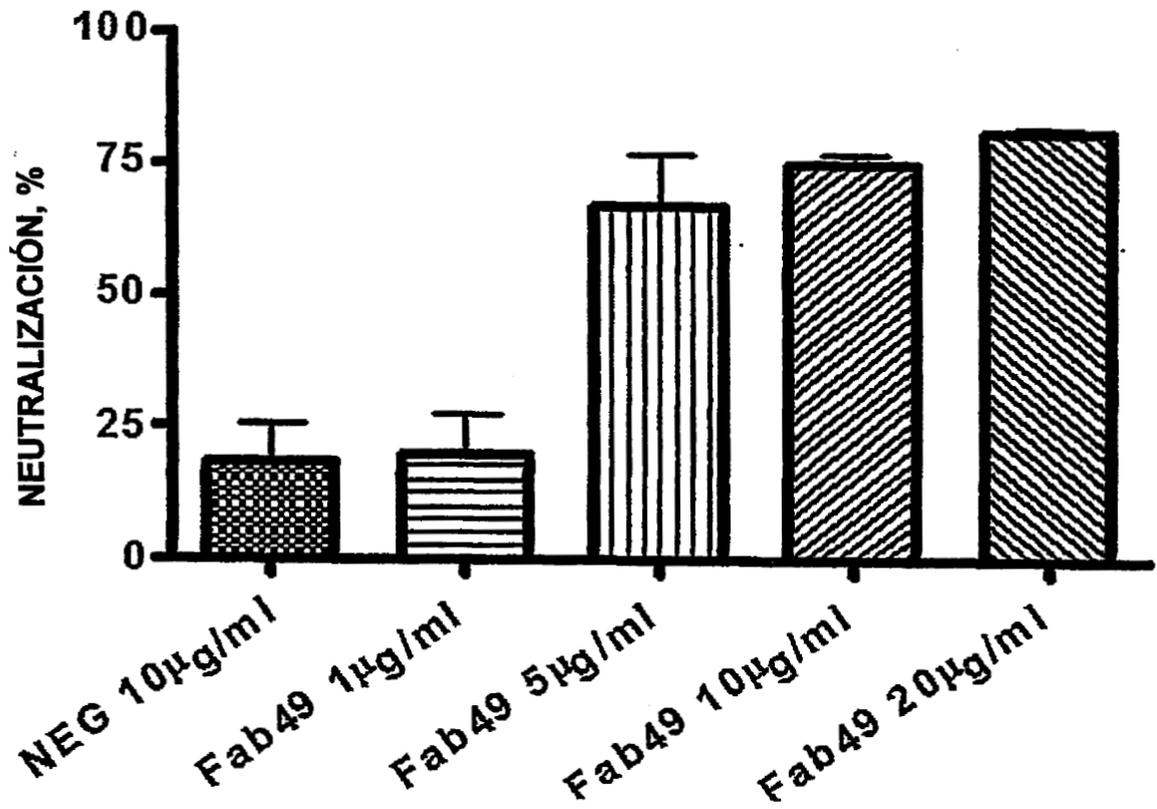


FIG. 2

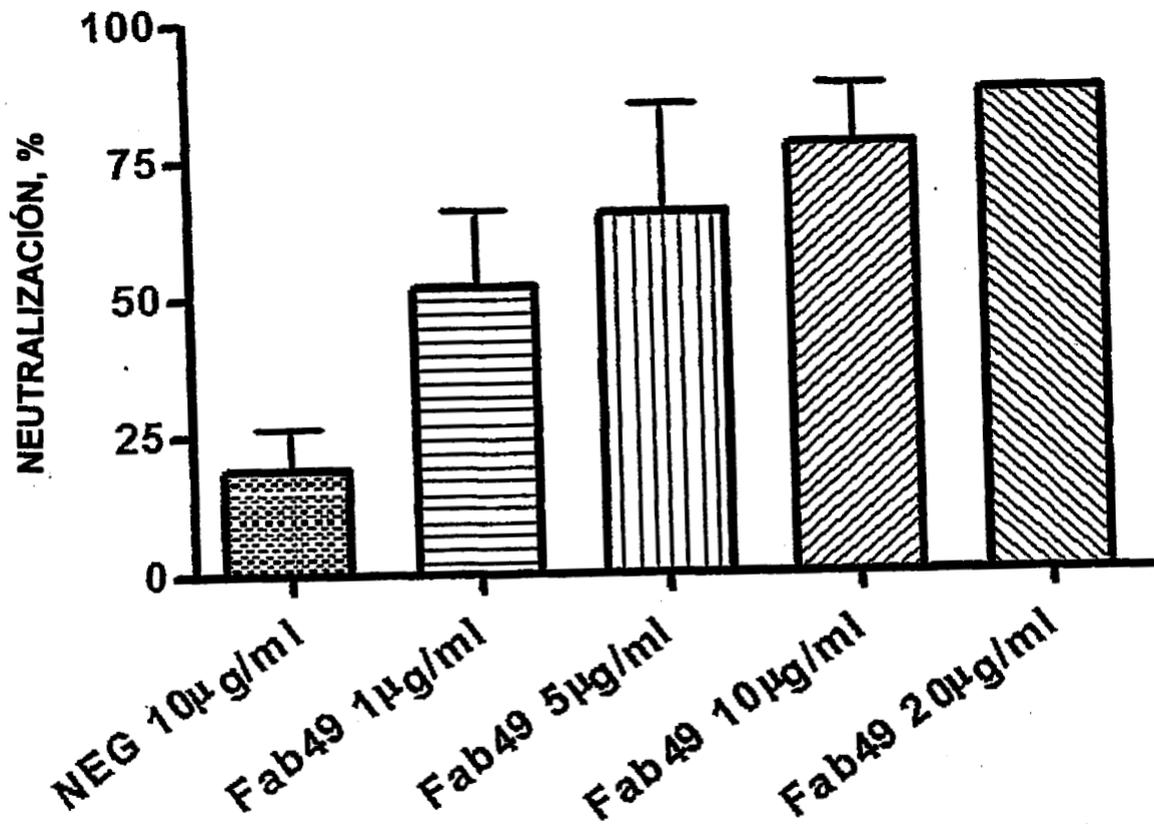


FIG. 3