

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 818**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18	(2006.01) A61K 38/08	(2006.01)
C07K 16/46	(2006.01) A61K 38/10	(2006.01)
C12N 5/12	(2006.01) A61P 31/16	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01) C07K 14/11	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01) C07K 16/10	(2006.01)
G01N 33/53	(2006.01)	
G01N 33/569	(2006.01)	
A61K 39/395	(2006.01)	
C07K 7/06	(2006.01)	
C07K 7/08	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2008 E 13166514 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2716656**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales que se unen a hemaglutinina del virus de la gripe aviar del subtipo H5 y usos de los mismos**

30 Prioridad:
15.06.2007 CN 200710111167

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2017

73 Titular/es:
**XIAMEN UNIVERSITY (50.0%)
No. 422 Si Ming Nan Road Siming District
Xiamen, Fujian 361005 , CN y
BEIJING WANTAI BIOLOGICAL PHARMACY
ENTERPRISE CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:
**CHEN, YIXIN;
LUO, WENXIN;
ZHANG, JUN;
XIA, NINGSHAO;
GUAN, YI y
CHEN, HONGLIN**

74 Agente/Representante:
SALVA FERRER, Joan

ES 2 609 818 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 se unen a hemaglutinina del virus de la gripe aviar del subtipo H5 y usos de los mismos.

5

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a hemaglutinina (HA) del virus de la gripe aviar del subtipo H5 y la variante conservativa o el fragmento activo de los mismos, o la secuencia codificante relacionada de polipéptido o análogo polipeptídico, o líneas celulares que producen dichos anticuerpos monoclonales, y los anticuerpos y fragmentos de los mismos para uso para diagnóstico, prevención y tratamiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

[0002] La investigación indica que el virus de la gripe aviar H5N1 que infectó al ser humano en Hong Kong en 1997 tiene 8 fragmentos génicos, todos derivados de la gripe aviar euroasiática y tiene la capacidad de unirse al receptor de ácido $\alpha(2,3)$ salival, mostrando los caracteres típicos de los virus de la gripe aviar (Matrosovich, M. y col., *J Virol*, 1999, 73(2): 1146-55). Y los virus de la gripe aviar H5N1 de 1997 fueron erradicados tras sacrificar todas las aves de corral en Hong Kong. Sin embargo, el virus A/goose/Guangdong/1/96(H5N1) del que se deriva el H5N1 en 1997 fue prevalente sucesivamente en el sudeste de China (Cauthen, A.N. y col., *J Virol*, 2000,74(14): 6592-9; Webster, R.G. y col., *J Virol*, 2002, 76(1): 118-26), y pronto el virus fue sustituido por diferentes clases de genotipos (Guan, Y. y col., *Proc Natl Acad Sci EE. UU.*, 2002, 99(13): 8950-5) que fueron mortales para pollos pero no para patos. Y estos virus H5N1 fueron erradicados de nuevo sacrificando todas las aves de corral hasta que virus sustitutos de nuevos genotipos surgieron en 2002. Entre 1997 y 2001, las HA de estas cepas de virus de diferentes genotipos presentan inmunogenicidad similar. Pero una deriva antigénica obvia se produjo en 2002 (Guan, Y. y col., *Proc Natl Acad Sci EE. UU.*, 2004,101(21): 8156-61; Sturm-Ramirez, K.M. y col., *J Virol*, 2004, 78(9): 4892-901). Es raro que el carácter típico del virus H5N1 de finales de 2002 dé como resultado elevada mortalidad para patos y otras aves acuáticas. La muerte de un gran número de aves acuáticas ocurrió la última vez en 1961 cuando muchos charranes murieron por causa del A/tern/South Africa/61(H5N3).

[0003] A principios de febrero de 2003, una familia de Hong Kong resultó infectada por el virus H5N1 (Peiris, JS y col., *Lancet*, 2004, 363 (9409): 617-9). La hija de la familia murió de infección de las vías respiratorias por razón desconocida durante su visita a Fujian, el padre y el hijo presentaron dolencia respiratoria aguda después de volver a Hong Kong. Eventualmente, el padre murió pero el hijo se recuperó de la enfermedad. Tanto al padre como al hijo se les diagnosticó infectados por los virus de la gripe H5N1 que son altamente similares en antigenicidad y nivel molecular con los virus que son altamente mortales para pollos y patos después de la deriva antigénica. (Guan, Y. y col., *Proc Natl*).

Una gripe aviar a gran escala sin precedentes se produjo en Asia en 2004 incluyendo el H5N1 aparecido en China, Japón, Corea, Tailandia, Vietnam, Indonesia, Camboya y Laos, el H7N3 en Pakistán, y el H5N2 en Taiwán. Un gran número de aves de corral, especialmente pollos, fueron sacrificadas debido a la infección pandémica de gripe aviar. Hasta ahora, casos de infección humana de gripe aviar aparecieron en aquellos países donde se produjo propagación epidémica a gran escala, y muchos de los infectados murieron. Estos virus H5N1 se descubrieron en primer lugar en aves acuáticas migratorias muertas incluyendo garcetas, garzas reales y gansos canadienses en Hong Kong en noviembre de 2002. Después de analizar los virus obtenidos de las aves muertas, se descubrió que, en comparación con los virus previos en Hong Kong, la antigenicidad de estos virus ha cambiado de forma severa y estos virus han obtenido la capacidad de causar la muerte de un gran número de patos infectados. (Sturm-Ramirez, K.M. y col., *J Virol*, 2004, 78(9): 4892-901). El aspecto inusual de este acontecimiento es que todos los virus H5N1 altamente patógenos se aislaron a partir de las aves migratorias que volaron hasta Hong Kong en el invierno de 2002-2003. Y en ese momento algunas personas predijeron que las aves migratorias propagarían el virus después de que volaran de vuelta en verano (Sturm-Ramirez, K.M. y col., *J Virol*, 2004, 78(9): 4892-901). Esto fue cierto, un gran número de aves migratorias fueron infectadas por H5N1 en el Lago Qinghai, y de acuerdo con la investigación, todos los virus H5N1 presentes en Europa y África fueron traídos de Asia por las aves migratorias.

[0004] Genéticamente, el virus H5N1 pandémico en Asia en 2004 era muy similar al genotipo Z del virus que apareció en Hong Kong en 2003 y se convirtió en el virus que se propagó principalmente. En ese momento, el virus pandémico de Asia era muy similar al A/Vietnam/1203/04(H5N1) a nivel antigénico y genético y tienen los 8 fragmentos génicos derivados de la gripe aviar euroasiática. Tanto en Vietnam como en Tailandia, aparecieron casos de seres humanos infectados por virus de este genotipo.

[0005] Los virus H5N1 pandémicos tienen el potencial de transmitirse con éxito a mamíferos. Debido a evolución sucesiva y la tendencia de recombinación, se produjeron diversos genotipos diferentes de virus H5N1, se produjo deriva antigénica de la HA de virus H5N1 y los virus ya han tenido capacidad patógena elevada para aves acuáticas.

[0006] Las estadísticas de la OMS (Organización Mundial de la Salud, OMS) muestran que actualmente Asia, África, Europa y Norteamérica todas han notificado aves infectadas por virus de la gripe aviar altamente patógeno [Organization, WH, H5N1 avian influenza: Timeline of major events. 2007]. De 2003 al 2 de abril de 2007, en 12 países ubicados en Asia oriental, el sudeste de Asia, oriente medio, África y Europa, se confirmaron casos infectados de infección en ser humano con virus H5N1 mediante diagnóstico de laboratorio, el número total de personas infectadas es de 288 y 170 de ellas murieron [Organization, W.H., Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/ (H5N1) Reported to WHO. 2007]. La tendencia a una propagación epidémica no cesó, centrando la atención de todo el mundo.

[0007] En combinación con la propagación de H5N1 en los últimos años, su brote en aves, su transmisión a diversos mamíferos, su infección de seres humanos y su posible propagación en mamíferos (Thanawongnuwech, R. y col., *Emerg Infect Dis*, 2005, 11 (5): 699-701; Ungchusak, K. y col., *N Engl J Med*, 2005, 352 (4): 333-40), un brote a gran escala de virus H5N1 en seres humanos es solamente cuestión de tiempo (Hien, T.T. y col., *N Engl J Med*, 2004, 351 (23): 2363-5; Stohr, K. y col., *N Engl J Med*, 2005, 352 (4): 405-7).

La primera línea de prevención de la gripe es un anticuerpo neutralizante, y el anticuerpo más eficaz es producido por HA, así que la vacuna contra gripe H5N1 puede desarrollarse basándose en la proteína HA. Sin embargo, la vacuna necesita "mejorar" constantemente con el fin de seguir el ritmo de la mutación del virus, dado que el gen de HA presenta una elevada variabilidad y la deriva antigénica puede hacer a la vacuna ineficaz. Con el fin de superar esto, cada año, la OMS necesita seleccionar nuevas cepas de vacuna como vacunas para la temporada epidémica del año siguiente de acuerdo con el resultado de monitorización de la mutación de las cepas de virus epidémicas del año anterior, y es necesario inyectar nuevas vacunas cada año para garantizar el mantenimiento de la protección eficaz contra la cepa de virus epidémica actual. Una gran cantidad de vacunas contra la gripe tradicionales se produjeron mediante el procedimiento de cultivo de embriones de pollo o el procedimiento de cultivo celular, éstas son principalmente vacunas de virus completos inactivados, vacunas líticas o vacunas de subunidad. Estas vacunas de la gripe tradicionales siguen ocupando el mercado actual, pero su inmunogenicidad, seguridad y efectos secundarios aún no son fiables. Dado que los virus H5N1 tienen elevada toxicidad para el embrión de pollo, la capacidad de producción limitada original de los fabricantes de vacunas no puede cumplir los requisitos del mercado en un estado de brote global. Y la aplicación de diferentes clases de vacunas de la gripe atenuadas vivas estaba limitada debido a problemas de seguridad y efectos secundarios (Horimoto T. y col., *Trends in Molecular medicine*, 2006, 12(11): 506-514). Con el desarrollo de la ciencia y la tecnología, el uso de la nueva técnica de biología molecular para estudiar nuevas vacunas de la gripe se ha convertido en una nueva tendencia de la presente investigación de vacunas de la gripe, tales como vacuna de ácido nucleico, vacuna manipulada genéticamente, vacuna de epítipo.

[0008] Actualmente, después de un uso a largo plazo, dos clases de fármacos han confirmado ser capaces de tratar la gripe eficazmente, estos están divididos en dos tipos: inhibidores de los canales iónicos M2 tales como amantadina (amantadina) y rimantadina (rimantadina), e inhibidores de neuraminidasa tales como oseltamivir (oseltamivir) y zanamivir (zanamivir) (Monto, *AS Vaccine*, 2003. 21 (16): 1796-800). Los dos primeros mostraron sus efectos anti-virales suprimiendo la proteína de los canales iónicos M2 del virus, y los dos últimos pueden inhibir selectivamente la actividad de neuraminidasa en la superficie del virus, impedir la replicación y liberación de virus de la progenie en células huésped, prevenir el resfriado y aliviar los síntomas eficazmente. De este modo, los inhibidores de neuraminidasa son los fármacos anti-gripales relativamente eficaces. Sin embargo, la resistencia a inhibidores de neuraminidasa en H5N1 se ha descubierto de forma continua. Y, si se toman en los 2 primeros días, pueden acortar el desarrollo de enfermedades, incluso salvar la vida del paciente. Aunque los inhibidores de los canales iónicos son muy útiles para algunos subtipos de virus de la gripe (Dolin, R. y col., *N Engl J Med*, 1982. 307(10): 580-4), también causa efectos secundarios graves y, por lo tanto, las cepas resistentes aparecen pronto (Shiraishi, K. y col., *J Infect Dis*, 2003, 188(1): 57-61). Y las cepas resistentes no han mostrado capacidad de transmisión y patogenicidad debilitadas. Hasta ahora, la resistencia a los inhibidores de los canales iónicos aparecía ampliamente por el mundo (Bright, R.A. y col., *Lancet*, 2005, 366(9492): 1175-81), así que el CDC de los Estados Unidos se opuso al uso de inhibidores de los canales iónicos como fármacos terapéuticos y preventivos contra la gripe en la temporada de gripe 2005-2006. Sin embargo, considerando muchas ventajas de los inhibidores de los canales iónicos, deben usarse para tratamiento adicional, pero en combinación con otros fármacos. La dosis se reducirá así como los efectos secundarios y, mientras tanto, el riesgo de resistencia al fármaco se reducirá

(Tsiodras, S. y col., *Bmj*, 2007, 334 (7588): 293-4). En 2005, se notificó una cepa de virus H5N1 resistente a Osetamivir (Le, Q.M. y col., *Nature*, 2005, 437: 1108; de Jong, M.D. y col., *Engl J Med.*, 2005, 353: 2667-2672).

[0009] Algunos pacientes infectados y recuperados de H5N1 presentan anticuerpos capaces de neutralizar virus en ensayo in vitro, lo que indica que el anticuerpo puede ser uno de los procedimientos usados para tratar infección por virus de la gripe (de Jong, M.D. y col., *Nat Med.*, 2006,12: 1203-1207). Clínicamente, los anticuerpos policlonales y monoclonales se usan eficazmente para prevenir infección por HAV, HBV, rabia y RSV (Sawyer, L.A., *Antiviral Res.*, 2000, 47:57-77). Durante la gripe española de 1918, la mortalidad se redujo en un 50% mediante el tratamiento usando suero de convaleciente humano (Luke, T.C. y col., *Ann Intern Med.*, 2006, 145: 599-609). En China, la exitosa experiencia de tratamiento de pacientes de SARS y H5N1 también mostró que, el suero de paciente convaleciente podía inhibir la replicación viral in vivo eficazmente, de modo que pacientes moribundos podían recuperarse. En modelos en ratón, anticuerpos monoclonales de ratón humanizados específicos de H5N1, anticuerpos monoclonales humanizados enteramente y fragmento F(ab')₂ han demostrado tener eficacia para la prevención y el tratamiento de infección por H5N1 (Lu, J. y col., *Respir Res.*, 2006, 7: 43; Simmons, C.P. y col., *PLOS Medicine*, 2007, 4(5): 928-936; Hanson, B.J. y col., *Respir Res.*, 2006, 7: 126). La persistente mutación antigénica de H5N1 de gripe aviar altamente patógeno en el sitio de unión al receptor, concretamente deriva antigénica, desafía a la capacidad de tratamiento anti-viral de amplio espectro de estos anticuerpos. De este modo, obteniendo anticuerpos monoclonales con capacidad de neutralización de amplio espectro se ha convertido en la esperanza para el tratamiento de H5N1, y el uso de anticuerpos monoclonales de neutralización de amplio espectro anti-H5N1 de alta calidad para tratar pacientes de H5N1 puede inhibir la replicación in vivo del virus H5N1 y obtener efectos de tratamiento ideales. Ésta es una nueva manera de tratamiento anti-viral.

[0010] Además, el estudio de epidemiología molecular muestra que, aproximadamente el 30% de los patos infectados positivamente no presentan ningún síntoma, el 10% de los pollos que portan el virus epidémico no muestran ningún síntoma. Estos animales infectados pueden causar continuamente nuevas infecciones para ser humano, lo que supone una enorme amenaza para la salud humana. Todos los expertos relacionados opinan que la propagación del virus de la gripe aviar altamente patógeno de tipo H5 en toda Asia oriental, Asia suroriental y Europa estará bien controlada. El diagnóstico en fase temprana es la condición previa, y a continuación puede aplicarse cuarentena temprana, manipulación temprana y el ser humano debe ser tratado pronto.

[0011] Se tardan 4-5 días en diagnosticar un virus de la gripe aviar con el procedimiento de diagnóstico de separación viral y suero tradicional, además, la mayoría de laboratorios de control de enfermedades humanas y animales carecen de laboratorio de bioseguridad de 3º nivel, así que el diagnóstico de un brote de H5 en países y regiones del sudeste de Asia está aparentemente obsoleto. La situación común es que aún no hay informe de diagnóstico de los laboratorios después de la muerte de un gran número de pollos y la finalización de los sacrificios, lo que causa gran incomodidad para el control de un brote del virus. Además, dado que una minoría de aves (especialmente aves acuáticas, tales como patos domésticos) no muestra ningún síntoma de infección por el virus, y no hay medios de ensayo eficaces en el sistema de cuarentena, la situación anterior sigue desarrollándose, dando origen a un brote repetitivo del virus en muchos países y regiones.

[0012] Mientras tanto, dado que el virus de la gripe aviar H5 (entre los cuales, Goose/Guangdong/1/96 es la cepa representativa) pertenece a virus altamente patógenos, es fatal para los modelos animales usados habitualmente en la actualidad, y la antigenicidad de la proteína hemaglutinina (HA) expresada mediante el procedimiento de ingeniería genética no puede obtenerse completamente. Muchos de los laboratorios famosos en el mundo han intentado sucesivamente preparar un anticuerpo monoclonal contra las series de virus pero han fracasado. Actualmente, el análisis de antigenicidad del virus tiene que usar el anticuerpo monoclonal preparado con A/chicken/Pennsylvania/1370/83(H5N2) y A/chicken/Pennsylvania/8125/83 (H5N2), cuya especificidad y reactividad obviamente no pueden satisfacer los requisitos del reactivo de diagnóstico.

[0013] Debido a la situación anterior, actualmente, se requiere urgentemente un procedimiento de diagnóstico cómodo, rápido y en tiempo real. Por lo tanto, pacientes de la primera generación infectados de forma heteroespecífica pueden aislarse y tratarse, previniendo la infección por virus entre seres humanos, y la cadena de transmisión puede interrumpirse antes de que el virus se haya adaptado a los seres humanos, de modo que la amenaza de gripe a escala humana del virus puede eliminarse fundamentalmente.

[0014] Dentro de China, estudios sobre la detección del virus de la gripe aviar del subtipo H5 se han descrito en la bibliografía. Qin Aijian y col. del College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Yangzhou University (Qin Aijian, Shao Hongxia, Qian Xian y col., *Journal of Chinese Prevention Veterinary Medicine* 2003, No. 3) prepararon anticuerpos monoclonales específicos de hemaglutinina contra el subtipo H5 y el subtipo H9 de virus de

la gripe aviar, y se confirmó que con estos anticuerpos monoclonales, el virus de la gripe aviar correspondiente puede detectarse rápidamente en el plazo de 24 horas mediante ensayo de inmunofluorescencia indirecto. El tiempo de detección para el subtipo H5 altamente patógeno del virus de la gripe aviar se acortó hasta 4 horas, lo que fue conseguido por la Beijing Office for Entry-Exit Inspection and Quarantine con una RT-PCR fluorescente rápida. Se confirmó clínicamente el 10 de diciembre de 2005. Guo Yuanji revisó en su artículo con el título "Present Situation of Human Avian Influenza Research" que un experimento de micro-neutralización o ELISA con alta especificidad era necesario para detectar el anticuerpo contra la cepa del virus del subtipo H5 (Guo Yuanji, Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2004, No. 3). Pero no había ningún informe de investigación sobre la detección del subtipo H5 mediante ELISA.

10

[0015] Se han elaborado informes de investigación en el extranjero sobre la detección de anticuerpo contra H5N1 usando ELISA. Rowe y col., notificaron que usando proteína hemaglutinina recombinante como antígeno de la envuelta para detectar anticuerpo contra H5N1 indirectamente mediante ELISA, la sensibilidad del ELISA es del 80%, y la especificidad es del 62% (Rowe T, y col., J Clin Microbiol. Abril de 1999; 37 (4): 937-43). Pero esta bibliografía no se refiere a un anticuerpo monoclonal específico para el gen de hemaglutinina HA del subtipo H5N1. Zhou y col. (Zhou EM y col., Avian Dis. 1998, 42 (4): 757 - 61) y Shafer y col. (Shafer, AL y col., Avian Dis. 1998, 42 (1): 28-34) detectaron anticuerpo anti-proteína del núcleo del virus de la gripe aviar usando ELISA competitivo, pero los sujetos de detección fueron todos anticuerpos para proteínas NP de todos los subtipos H1-H16 de gripe aviar de tipo A, y el subtipo no se podía determinar. Lu describió un procedimiento para detectar virus de la gripe aviar (AIV) mediante Dot-ELISA basándose en un anticuerpo monoclonal. Este procedimiento detectaba el antígeno del AIV directamente y su especificidad es que no presenta ninguna reacción cruzada con otros virus aviares (Lu H. Avian Dis. 2003 47 (2): 361-9). Aunque Sala y col., establecieron ELISA basado en un anticuerpo monoclonal específico para una glucoproteína superficial del subtipo H7, pero el subtipo fue H7, y el anticuerpo monoclonal era específico para la glucoproteína superficial (Sala G, Cordioli P, Moreno-Martin y col., Avian Dis. 2003, 47 (3 Supl.): 1057-9), en lugar de específico para el gen de hemaglutinina HA del subtipo H5.

[0016] Es lamentable que la mayoría de los anticuerpos monoclonales usados en el actual diagnóstico por inmunología de virus de la gripe aviar sean contra la proteína del núcleo (proteína NP), usados de este modo para detectar virus de la gripe de tipo A. Pero el virus de la gripe de tipo A incluye en realidad los subtipos H1-H16 con 16 subtipos en total, entre los cuales la mayoría de los subtipos no tienen ninguna patogenicidad o solamente baja patogenicidad mientras que solamente el subtipo H5 del virus de la gripe aviar es el virus de la gripe aviar más dañino con elevada patogenicidad. Por lo tanto, las tecnologías disponibles están lejos de satisfacer las demandas de las detecciones clínicas.

[0017] Luo y col. (Chinese Journal of Virology, marzo de 2007, 23(2): 85-90) y Fang y col. (Chinese Journal of Biotechnology, marzo de 2007, 23(2): 292-296) describen anticuerpos ampliamente neutralizantes para la detección, el diagnóstico, la prevención y el tratamiento del subtipo H5 de AIV. Luo y col., describen el anticuerpo monoclonal 8H5 contra la hemaglutinina del AIV de subtipo H5 que muestra elevada reactividad con 33 cepas de aislados del virus H5N1 mediante ensayo de HI y ensayo de neutralización. Fang y col., describen un anticuerpo (10F7) con buena actividad neutralizante que es altamente específico para 34 cepas de H5N1 diferentes. El objetivo final de la presente invención es superar los defectos de la presente detección inmunitaria, el tratamiento y la prevención de AIV, el anticuerpo monoclonal usado es contra proteína hemaglutinina (HA) del subtipo H5. En modelos en ratón, este anticuerpo monoclonal puede tratar eficazmente infecciones de muchos tipos de cepas de mutación del virus H5N1, también puede usarse para detectar específicamente virus de la gripe aviar del subtipo H5 altamente patógeno y para la producción de una vacuna y otro fármaco terapéutico contra H5N1.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0018] La invención es tal como se define mediante las reivindicaciones. La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína hemaglutinina (HA) de virus de la gripe aviar H5, y anticuerpos monoclonales que pueden bloquear la actividad de unión de al menos el 50% de los anticuerpos monoclonales que se unen a la proteína hemaglutinina (HA) de virus de la gripe aviar H5, en los que dicho anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada variable que comprende las CDR1-CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos tal como se expone en las SEQ ID NO: 19-21 y comprende además una cadena ligera variable que comprende las CDR1-CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos tal como se expone en las SEQ ID NO: 22-24. La presente invención también proporciona líneas celulares de hibridoma relacionadas, una molécula de ácido nucleico aislada, así como una composición farmacéutica que contiene dicho anticuerpo monoclonal. La presente invención también proporciona este anticuerpo monoclonal para uso para la prevención y el tratamiento de virus de la gripe aviar, especialmente virus de la gripe aviar del subtipo H5.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0019]

5

La figura 1 es el diagrama del vector de expresión para el anticuerpo quimérico.

La figura 2 muestra el resultado de la detección de actividad del producto de cribado, cribado con 8G9 de una biblioteca de doce péptidos.

10

La figura 3 muestra el resultado de ELISA de unión específica de péptido de fago con 8G9.

A: resultados de reacciones de péptido de fago G1, G2, G3, G4, G5 con múltiples anticuerpos monoclonales;

B: resultados de reacciones de péptido de fago G10 con múltiples anticuerpos monoclonales.

15

La figura 4 muestra la reactividad de proteínas de fusión 239-G1, 239-G2, 239-G3, 239-G5 y HBc-DG1, HBc-DG2, HBc-DG3, HBc-DG5 con el anticuerpo marcado con enzima 8G9-HRP.

La figura 5 muestra el resultado de detección de ELISA competitivo de péptidos sintetizados y virus de la gripe aviar

20

La figura 6 muestra el resultado del experimento de inhibición de hemaglutinina (HI) de bloqueo de los péptidos sintetizados G1, G2, G3 y G5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 **[0020]**

Las definiciones de términos relevantes relacionados con la presente invención son las siguientes:

[0021]

El término "hemaglutinina" se refiere a una glucoproteína de la envuelta del virus de la gripe aviar. Las hemaglutininas median en adsorción y la penetración de la aguja del virus de la gripe en una célula huésped. Las proteínas hemaglutinina del virus de la gripe aviar tienen dieciséis subtipos serológicos diferentes, de HA1 a HA16, correspondientes a los dieciséis subtipos virales H1-H16 respectivamente.

30

[0022]

El término "anticuerpo" se refiere a cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos capaces de unirse a un antígeno específico. Un anticuerpo completo comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada consiste en una región variable y una primera, segunda y tercera región constante, mientras que cada cadena ligera consiste en una región variable y una región constante. El anticuerpo tiene forma de "Y", con el tallo de la "Y" consistiendo en la segunda y tercera regiones constantes de las dos cadenas pesadas unidas entre sí mediante la formación de puentes disulfuro. Cada brazo de la "Y" consiste en la región variable y la primera región constante de una de las cadenas pesadas y las regiones variable y constante de una cadena ligera. Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada determinan la unión al antígeno. La región variable de cada cadena contiene tres regiones altamente variables llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) (las CDR de cadena ligera (L) incluyen L1, L2 y L3, las CDR de cadena pesada (H) incluyen H1, H2 y H3) (son definidas por Kabat, y col., véase Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición (1991), vol. 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md.). Entre éstas, las tres CDR están separadas por regiones armazón (FR), que son más conservativas que las CDR y forman una estructura marco para soportar la región hipervariable. Las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera son irrelevantes para unión al antígeno, pero tienen funciones efectoras diversas. Los anticuerpos son asignados a diferentes clases basándose en la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas. Las clases fundamentales de anticuerpos son IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, con varias de estas clases divididas en subclases tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2.

50

[0023]

Además de una inmunoglobulina intacta, el término "anticuerpo" se refiere además a un fragmento de inmunoglobulina del mismo (es decir, al menos un fragmento inmunológicamente activo de una molécula de inmunoglobulina), tal como un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, una molécula de anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo multiespecífico formado a partir de cualquier fragmento de una molécula de inmunoglobulina que comprende una o más CDR. Además, un anticuerpo relacionado con la presente descripción también puede comprender una o más CDR de una inmunoglobulina humana particular injertada en una región armazón de una o más inmunoglobulinas humanas diferentes.

55

[0024]

Fragmento "Fab" con respecto a un anticuerpo se refiere a parte de la molécula de anticuerpo que

comprende las regiones variable y constante de una cadena ligera y las regiones variable y constante de una cadena pesada, que están unidas por un puente disulfuro.

[0025] Fragmento "Fab'" se refiere a un fragmento Fab que contiene parte de la región bisagra.

[0026] "F(ab')₂" se refiere a un dímero de Fab'.

[0027] "Fc" de un anticuerpo se refiere a esa parte del anticuerpo que consiste en la segunda y tercera regiones constantes de una primera cadena pesada unidas a la segunda y tercera regiones constantes de una segunda cadena pesada mediante la formación de puentes disulfuro. La parte Fc del anticuerpo tiene múltiples funciones diferentes pero no está implicada en la unión al antígeno.

[0028] "Fv" de un anticuerpo se refiere al fragmento más pequeño del anticuerpo capaz de unirse al sitio de unión al antígeno completo. Un fragmento Fv consiste en la región variable de una cadena ligera unida a la región variable de una cadena pesada.

[0029] "Anticuerpo de cadena sencilla" o "scFv" se refiere a un anticuerpo genomanipulado que consiste en una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada conectadas entre sí directamente o mediante un enlazador peptídico. (Houston 1988).

[0030] "Anticuerpo de cadena sencilla Fv-Fc" o "scFv-Fc" también incluye un anticuerpo genomanipulado que consiste en un scFv conectado a la región Fc de un anticuerpo.

[0031] "Determinante antigénico" (o llamado epítipo) se refiere al grupo de átomos o aminoácido de una molécula de antígeno a la que se une un anticuerpo.

[0032] La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo obtenido de una población de anticuerpos altamente homólogos, es decir, un grupo de anticuerpos idénticos excepto posibles mutaciones naturales que pueden producirse en casos raros. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos para un único epítipo en el antígeno. Los anticuerpos monoclonales son diferentes de anticuerpos policlonales, que comprenden moléculas de anticuerpo que reconocen diferentes epítopos en la superficie de un antígeno. Aunque anticuerpos monoclonales tradicionales son secretados por hibridomas, los anticuerpos monoclonales de la presente descripción no están limitados a este procedimiento de producción. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la presente descripción pueden obtenerse mediante la técnica de hibridoma descrita en primer lugar por Kohler y col., (Nature, 256:495 1975), o pueden obtenerse mediante técnica de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.816.567).

[0033] La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que la otra parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo. En cualquier caso, dichos fragmentos aún preservan la actividad de unión al antígeno diana. (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567 de Cabilly y col.; Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 81: 6851 6855 (1984)).

[0034] La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que toda o parte de la región CDR es sustituida por la región CDR de un anticuerpo no humano (anticuerpo donador). El anticuerpo donador puede ser un anticuerpo de ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y reactividad deseadas. Además, la secuencia de aminoácidos de la región armazón (FR) de inmunoglobulina humana también puede sustituirse por la secuencia de aminoácidos correspondiente de un anticuerpo no humano. Además, el residuo de aminoácido del anticuerpo humanizado puede no ser del anticuerpo receptor ni de la región CDR o la secuencia FR del anticuerpo donador. El objetivo de estas modificaciones es afinar u optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado se refiere a un anticuerpo, que comprende al menos una, y habitualmente dos, regiones variables casi completas. En estas regiones variables, todas o sustancialmente todas las regiones CDR correspondientes proceden de un anticuerpo no humano y todas o sustancialmente todas las regiones FR proceden de un anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado ideal comprende al menos parte de una región Fc de inmunoglobulina, habitualmente la región Fc de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, por favor véase Jones y col., Nature, 321: 522 525 (1986); Reichmann y col., Nature, 332: 323 329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct.

Biol., 2: 593 596 (1992); y Clark, Immunol. Today 21: 397 402 (2000).

5 **[0035]** El término “aislado” significa obtenido mediante maneras artificiales en estado natural. Si una sustancia o composición “aislada” aparece en la naturaleza, entonces su entorno natural podría haber cambiado o podría estar separado de su entorno natural, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente de forma natural en un mamífero vivo no está “aislado”, mientras el mismo polinucleótido o polipéptido de alta pureza separado de su estado natural se denomina “aislado”. “Aislado”, tal como se usa en el presente documento, no excluye mezcla con materiales artificiales o sintéticos, o la presencia de otras impurezas que no interfieren en la actividad de la sustancia.

10 **[0036]** El término “vector” se refiere a una herramienta de transporte de ácido nucleico, en la que puede insertarse un polinucleótido que codifica una proteína, de modo que la proteína se exprese. Puede usarse un vector para transformar, transducir o transfectar una célula huésped, de modo que el elemento genético que porta sea expresado dentro de la célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales tales como cromosomas artificiales de levadura (YAC), cromosomas artificiales bacterianos (BAC), o cromosomas artificiales derivados de P1 (PAC), bacteriófagos tales como fagos lambda o fagos M13, y virus animales. Las categorías de virus animales usados como vectores incluyen retrovirus (incluyendo lentivirus), adenovirus, virus adeno-asociados, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple), poxvirus, baculovirus, papilomavirus y papovavirus (por ejemplo, SV40). Un vector puede contener múltiples elementos que controlan la expresión, incluyendo secuencia promotora, secuencia de inicio de la transcripción, secuencia potenciadora, elemento de selección y gen informador. Además, el vector puede contener un origen de replicación. Un vector también puede incluir material que ayuda a su entrada en la célula, tal como una partícula viral, un liposoma, o un revestimiento proteico, pero no solamente estos materiales.

25 **[0037]** La expresión “célula huésped” se refiere a una célula en la que se introduce un vector. Esto incluye los siguientes tipos celulares, por ejemplo células procariontas tales como células de *E. coli* o *B. subtilis*, células fúngicas tales como células de levadura o células de *Aspergillus*, células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 o *Spodoptera* Sf9, o células animales tales como fibroblastos, células CHO, células COS, células NSO, células HeLa, células BHK, células HEK 293 o células humanas.

30 **[0038]** La expresión “anticuerpo neutralizante” se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que es capaz de eliminar o reducir significativamente la virulencia de unión de un antígeno viral diana.

35 **[0039]** La expresión “porcentaje (%) de identidad de secuencia” se refiere al porcentaje de ácidos nucleicos o aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticas a los ácidos nucleicos o aminoácidos correspondientes de la secuencia de ácido nucleico o la secuencia polipeptídica respectivamente. La expresión “porcentaje (%) de identidad de secuencia” mencionada en el presente documento con respecto a las secuencias de ácido nucleico o polipeptídicas se define como el porcentaje de secuencia de ácido nucleico o secuencia de residuos de aminoácidos candidatas que es idéntico a la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos diana, respectivamente. Para cierta secuencia, alinearla con la secuencia diana y, si fuera necesario, saltar huecos de mutación, para conseguir el porcentaje de identidad de secuencia máximo, sin considerar ninguna mutación conservativa de secuencias similares. En la técnica pueden usarse múltiples procedimientos de alineamiento para determinar la similitud de la secuencia de ácido nucleico o aminoácidos, por ejemplo, el software informático disponible incluye BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden establecer parámetros apropiados para alineamiento, incluyendo cualesquiera algoritmos necesarios para conseguir alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que están siendo comparadas.

50 **[0040]** La expresión “se une específicamente” se refiere a una reacción de unión no aleatoria entre dos moléculas, tal como entre un anticuerpo y un antígeno contra el que se genera el anticuerpo. En este caso, un anticuerpo que se une a un primer antígeno no muestra afinidad de unión detectable o afinidad de unión a nivel bajo con un segundo antígeno. En ciertos aspectos, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno se une al antígeno con una afinidad de unión (K_D) de $\leq 10^{-5}$ M (por ejemplo, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, etc.). K_D , que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la relación de la velocidad de disociación respecto a la velocidad de asociación (k_{off}/k_{on}), puede determinarse usando procedimientos conocidos por el experto en la materia.

55 ANTICUERPO

[0041] La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que puede unirse específicamente a la hemaglutinina del virus de la gripe aviar del subtipo H5 y sus fragmentos de unión al antígeno correspondientes, en

el que dicho anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada variable que comprende las CDR1-CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos tal como se expone en las SEQ ID NO: 19-21, y comprende además una cadena ligera variable que comprende las CDR1-CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos tal como se expone en las SEQ ID NO: 22-24.

5

[0042] La presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales anti-H5 que son secretados por las estirpes celulares de hibridoma de ratón 13D4 y 20A11. La solicitud describe además anticuerpos monoclonales anti-H5 que son secretados por la estirpe celular de hibridoma de ratón 8G9. Estos anticuerpos monoclonales reciben su nombre de las estirpes celulares de hibridoma que los producen. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales anti-H5 son producidos por las estirpes celulares de hibridoma de ratón 8G9, 13D4 y 20A11 respectivamente, y son nombradas como anticuerpos monoclonales 8G9, 13D4 y 20A11 respectivamente. Los anticuerpos monoclonales 8G9, 13D4 y 20A11 pueden unirse específicamente a la hemaglutinina del virus de la gripe aviar del subtipo H5. Las estirpes celulares de hibridoma de ratón 8G9, 13D4 y 20A11 han sido depositados en el China Center for Typical Culture Collection (CCTCC, Wuhan University, Wuhan, China) el 13 de diciembre de 2006 con los números de depósito del CCTCC - C200639 (estirpe celular de hibridoma 8G9), CCTCC - C200605 (estirpe celular de hibridoma 3C8), CCTCC - C200638 (estirpe celular de hibridoma 20A11). La estirpe celular de hibridoma de ratón 13D4 también se depositó el 29 de mayo de 2007 con el número de depósito CCTCC - C200721.

[0043] La presente descripción también proporciona anticuerpos monoclonales que puedan bloquear la unión de anticuerpos monoclonales 13D4 y 20A11 a la hemaglutinina del virus de la gripe aviar del subtipo H5. La solicitud también describe anticuerpos monoclonales que pueden bloquear la unión de anticuerpos monoclonales 8G9 a la hemaglutinina del virus de la gripe aviar del subtipo H5. Los epítomos de hemaglutinina a los que se unieron estos anticuerpos monoclonales de bloqueo pueden ser los mismos que los reconocidos por anticuerpos monoclonales 8G9, 13D4 y 20A11. Los epítomos reconocidos por estos anticuerpos monoclonales de bloqueo también pueden solaparse estéricamente con aquellos reconocidos por anticuerpos monoclonales 8G9, 13D4 y 20A11. Esos anticuerpos monoclonales de bloqueo pueden reducir la unión de anticuerpos monoclonales 8G9, 13D4 y 20A11 a la hemaglutinina de virus de la gripe aviar del subtipo H5 en al menos un 50%, o al menos un 60%, o preferentemente al menos un 70%, o más preferentemente al menos un 75%, o más preferentemente al menos aproximadamente un 80%, más preferentemente al menos un 85%, o aún más preferentemente al menos un 90%, o aún más preferentemente al menos un 95%, o de la manera más preferente al menos un 99%.

[0044] La capacidad de un anticuerpo monoclonal desconocido de reducir la unión de un anticuerpo monoclonal conocido a la hemaglutinina H5 se mide mediante un procedimiento rutinario tal como el descrito en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Por ejemplo, en primer lugar revestir previamente una placa de microvaloración con antígenos, y a continuación incubar las placas revestidas previamente mencionadas anteriormente con diluciones sucesivas de los anticuerpos de ensayo sin marcar mezclados con una concentración seleccionada de los anticuerpos conocidos marcados. Después de lavar, detectar y medir la cantidad de los anticuerpos conocidos unidos a las placas a las diversas diluciones de los anticuerpos de ensayo. Cuanto más fuerte sea la capacidad de los anticuerpos de ensayo para competir con los anticuerpos conocidos para unión a los antígenos, más débil será la capacidad de los anticuerpos conocidos para unirse a los antígenos. Habitualmente, los antígenos son aplicados previamente como un revestimiento sobre una placa de 96 pocillos, y la capacidad de anticuerpos no marcados de bloquear la unión de anticuerpos marcados se mide usando marcas radiactivas o enzimáticas.

[0045] Pueden generarse anticuerpos monoclonales mediante el método del hibridoma descrito por Kohler y col., *Nature* 256: 495 (1975). En primer lugar, un ratón u otro animal huésped apropiado se inmuniza inyectando un inmunógeno (y un adyuvante si fuera necesario). Normalmente, la forma de inyección del inmunógeno o adyuvante son múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. Conjugar el inmunógeno de antemano a ciertas proteínas conocidas, tales como albúmina del suero, o inhibidor de tripsina de soja puede ser útil para incrementar la inmunogenicidad del antígeno en células huésped. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y MPL-TDM. Después de la inmunización, el animal huésped fabrica linfocitos que producen anticuerpos que se unen específicamente a inmunógenos. Como alternativa, pueden obtenerse linfocitos mediante inmunización *in vitro*. Recoger linfocitos deseados y fusionarlos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como PEG, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal antibodies: Principles and Practice*, págs. 59 103, Academic Press, 1996).

[0046] Las células de hibridoma preparadas de este modo pueden sembrarse y cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, para células de mieloma parentales que carecen

de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), añadir sustancias tales como hipoxantina, aminopterina y timidina al medio de cultivo (medio HAT) impediría el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

5 **[0047]** Las células de mieloma preferidas deben tener las capacidades de fusionarse de forma eficiente, capacidades estables de la secreción de anticuerpos, y ser sensibles al medio HAT. Entre estas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOP-21 y MC-11 (THE Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. EE. UU.), y líneas celulares SP-2/0 o X63-Ag8-653 (American Type Culture Collection, Rockville, Md. EE. UU.). Además, las líneas celulares de mieloma humana y
10 heteromieloma de ratón-humana han sido descritas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol. 133: 3001 (1984); Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Technique and Applications, págs. 51- 63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987).

[0048] El medio de cultivo en el que se cultivan células de hibridoma se usa para detectar la producción de
15 anticuerpos monoclonales dirigidos contra un antígeno específico. La especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard descrito por Munson y col., en Anal. Biochem. 107: 220 (1980).
20

[0049] Después de que la especificidad, afinidad y reactividad de los anticuerpos producidos por células de hibridoma se determinan, las líneas celulares diana pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante estándar tal como se describe en Goding, Monoclonal antibodies: Principles and Practice, págs. 59 103, Academic Press, 1996. Medios de cultivo adecuados pueden ser, por ejemplo, medio DMEM o RPMI-1640. Además,
25 las células de hibridoma pueden cultivarse in vivo como tumores ascíticos en un animal.

[0050] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden separarse del medio de cultivo, líquido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía por
30 afinidad.

[0051] También pueden obtenerse anticuerpos monoclonales mediante procedimientos recombinantes de ingeniería genética. Las moléculas de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales pueden aislarse de las células de hibridoma mediante amplificación por PCR usando sondas de ácido nucleico que se unen específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales. Las moléculas de ADN se insertan en vectores de expresión, que se transfectan a continuación al interior de células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), u otras células de mieloma que no producen proteína inmunoglobulina. Las células huésped transfectadas se cultivan en condiciones específicas y expresan los anticuerpos deseados.
40

[0052] Los anticuerpos de la presente descripción pueden unirse a la hemaglutinina H5 con elevada especificidad y afinidad. Estos anticuerpos podrían tener baja reactividad cruzada con otros subtipos de hemaglutinina, preferentemente, estos anticuerpos tienen completamente ninguna reactividad cruzada con otros subtipos de hemaglutininas. En un aspecto, la descripción proporciona anticuerpos que se unen a hemaglutinina H5
45 con un valor de K_D de menos de 1×10^{-5} M. Preferentemente, el valor de K_D es menor que 1×10^{-6} M. Más preferentemente, el valor de K_D es menor que 1×10^{-7} M. De la manera más preferente, el valor de K_D es menor que 1×10^{-8} M.

[0053] Los anticuerpos de la presente descripción pueden ser los anticuerpos de estructura en forma de "Y" convencionales compuestos por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Además, los anticuerpos también pueden ser el fragmento Fab, el fragmento Fab', el fragmento $F(ab)_2$ o el fragmento Fv, u otros tipos de fragmento parcial de los anticuerpos en forma de "Y" convencionales que conservan afinidad de unión a la hemaglutinina. La afinidad de unión de los fragmentos a hemaglutinina puede ser mayor o menor que la de los anticuerpos en forma de "Y" convencionales.
50

[0054] Los fragmentos de anticuerpo de la presente descripción pueden obtenerse mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase Morimoto y col., J. Biochem. Biophys. Methods 24: 107-117 (1992) y Brennan y col., Science 229: 81 (1985)). Adicionalmente, estos fragmentos también pueden ser producidos directamente por células huésped recombinantes (revisado en Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11: 548-557 (1999);
55

Little y col., Immunol. Today 21: 364 370 (2000)). Por ejemplo, fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de E. coli o acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., Bio/Technology 10: 163 167 (1992)). En otro ejemplo, el fragmento F(ab')₂ puede obtenerse usando la cremallera de leucina GCN4 para ensamblaje. Además, también pueden aislarse fragmentos Fv, Fab o F(ab')₂ directamente a partir de cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo son completamente conocidos por un experto en la materia.

SECUENCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO DE ANTICUERPOS

10 **[0055]** La presente descripción proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a hemaglutinina H5. Las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos pueden aislarse a partir de células de hibridoma. Las secuencias de ácido nucleico de las moléculas pueden determinarse usando técnicas rutinarias conocidas por un experto en la materia. Las moléculas de ácido nucleico de la presente descripción también pueden prepararse usando técnicas recombinantes de ingeniería genética convencionales o un procedimiento de síntesis química. En un aspecto, la secuencia de la molécula de ácido nucleico del anticuerpo de la presente descripción comprende secuencias de ácido nucleico que codifican la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-H5 o una parte de la molécula de ácido nucleico de la molécula de anticuerpo. En otro aspecto, la secuencia de la molécula de ácido nucleico del anticuerpo de la presente descripción también comprende secuencias de ácido nucleico que codifican la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-H5 o una parte de la molécula de ácido nucleico de la molécula de anticuerpo. En otro aspecto, la secuencia de la molécula de ácido nucleico del anticuerpo de la presente descripción también comprende las secuencias de CDR de las regiones variables de cadena pesada o de cadena ligera del anticuerpo. La región determinante de la complementariedad (CDR) es el sitio de unión al epítipo en el antígeno. La CDR en la presente investigación se determina de acuerdo con IMGTV-QUEST (<http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>). Pero la secuencia de CDR determinada mediante un procedimiento diferente es ligeramente diferente.

30 **[0056]** Un aspecto de la presente descripción proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpos monoclonales 13D4 y 20A11. La solicitud describe además moléculas de ácido nucleico que codifican las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpos monoclonales 8G9. Las secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones variables de cadena pesada de anticuerpos monoclonales 8G9, 13D4 y 20A11 corresponden a la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 45 y la SEQ ID NO: 9, respectivamente. Las secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones variables de cadena ligera de anticuerpos monoclonales 8G9, 13D4 y 20A11 corresponden a la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 11, respectivamente. La presente descripción también incluye variantes o análogos de las moléculas de ácido nucleico que codifican las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpos monoclonales 13D4 y 20A11. La solicitud también describe variantes o análogos de las moléculas de ácido nucleico que codifican las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpos monoclonales 8G9.

40 **[0057]** En otro aspecto, la presente solicitud también describe diversas variantes de ácido nucleico aisladas, cuyas secuencias son idénticas a las siguientes secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11. Específicamente, las variantes de ácido nucleico comparten al menos el 70% de identidad de secuencia, preferentemente al menos el 75% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 80% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 85% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 90% de identidad de secuencia, de la manera más preferente al menos el 95% de identidad de secuencia, con las secuencias de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 45, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 11.

50 **[0058]** La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican fragmentos de anticuerpo que son capaces de unirse específicamente al subtipo H5 del virus de la gripe aviar.

55 **[0059]** La presente descripción se refiere además a moléculas de ácido nucleico aisladas correspondientes que codifican una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en las SEQ ID NO: 19-21. La solicitud describe moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en las SEQ ID NO: 13-15 y las SEQ ID NO: 25-27. La presente descripción también se refiere a moléculas de ácido nucleico correspondientes que codifican una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en las SEQ ID NO: 22-24. La solicitud describe moléculas de ácido nucleico que codifican una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en las SEQ ID

NO: 16-18 y las SEQ ID NO: 28-30.

[0060] La presente descripción se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico. También se refiere a células huésped transformadas con las moléculas de ácido nucleico. Además, la presente solicitud también describe un procedimiento de cultivar células huésped que contienen dicha moléculas de ácido nucleico en condiciones específicas y aislar los anticuerpos de la invención.

SECUENCIAS POLIPEPTÍDICAS DE ANTICUERPOS

[0061] Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de los anticuerpos monoclonales 8G9, 13D4 y 20A11 pueden deducirse a partir de sus respectivas secuencias de ácido nucleico. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales 8G9, 13D4 y 20A11 se exponen en la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 46 y la SEQ ID NO: 10, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera de los anticuerpos monoclonales 8G9, 13D4 y 20A11 se exponen en la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 12. En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada contenidas en los anticuerpos monoclonales anti-H5 proporcionados por la presente invención se exponen en la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 46 y la SEQ ID NO: 10. En otro aspecto, las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera contenida en los anticuerpos monoclonales anti-H5 proporcionados por la presente invención se exponen en la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 12.

[0062] En otro aspecto, la presente descripción proporciona una cadena pesada de anticuerpo que comprende una región variable, la similitud de las secuencias de aminoácidos de esta región con las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 46 o la SEQ ID NO: 10 es de al menos el 70%, preferentemente al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, más preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90%, de la manera más preferente al menos el 95%. La solicitud también describe una cadena pesada de anticuerpo que comprende una región variable, la similitud de las secuencias de aminoácidos de esta región con las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 42 es de al menos el 70%, preferentemente al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, más preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90%, de la manera más preferente al menos el 95%.

[0063] En otro aspecto, la presente descripción proporciona una cadena ligera de anticuerpo que comprende una región variable, la similitud de las secuencias de aminoácidos de esta región con las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 12 es de al menos el 70%, preferentemente al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, más preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90%, de la manera más preferente al menos el 95%. La solicitud también describe una cadena ligera de anticuerpo que comprende una región variable, la similitud de las secuencias de aminoácidos de esta región con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 es de al menos el 70%, preferentemente al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, más preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90%, de la manera más preferente al menos el 95%.

[0064] Las secuencias de aminoácidos de las CDR de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de los anticuerpos monoclonales 8G9, 13D4 y 20A11 se han determinado de la siguiente manera:

Las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 8G9 se describen en las SEQ ID NO: 13-15, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 8G9 se describen en las SEQ ID NO: 16-18, respectivamente.

[0065] Las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 13D4 se describen en las SEQ ID NO: 19-21, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 13D4 se describen en las SEQ ID NO: 22-24, respectivamente.

[0066] Las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 20A11 se describen en las SEQ ID NO: 25-27, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 20A11 se describen en las SEQ ID NO: 28-30, respectivamente.

5 **[0067]** En otro aspecto, la presente solicitud describe una cadena pesada de anticuerpo monoclonal anti-H5 o un fragmento del mismo, que comprende las siguientes CDR: (i) una o más CDR seleccionadas entre las SEQ ID NO: 13-15; (ii) una o más CDR seleccionadas entre las SEQ ID NO: 19-21; (iii) una o más CDR seleccionadas entre las SEQ ID NO: 25-27. La cadena pesada de anticuerpo monoclonal anti-H5 de la invención o un fragmento del mismo comprende tres CDR que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 19-21, respectivamente.

10 **[0068]** En otro aspecto, la presente solicitud describe una cadena ligera de anticuerpo monoclonal anti-H5 o un fragmento del mismo, que comprende las siguientes CDR: (i) una o más CDR seleccionadas entre las SEQ ID NO: 16-18; (ii) una o más CDR seleccionadas entre las SEQ ID NO: 22-24; (iii) una o más CDR seleccionadas entre las SEQ ID NO: 28-30. La cadena ligera de anticuerpo monoclonal anti-H5 de la invención o un fragmento del mismo comprende tres CDR que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 22-24, respectivamente.

15 **[0069]** Las variantes generadas mediante sustitución, adición o delección de aminoácidos en las regiones variables de los anticuerpos descritos anteriormente aún conservan la capacidad de unirse específicamente al subtipo H5 del virus de la gripe aviar. La presente descripción también incluye dichas variantes de fragmentos de unión al antígeno.

20 **[0070]** Pueden obtenerse variantes de anticuerpo monoclonal de la presente descripción mediante procedimientos de ingeniería genética convencionales. Un experto en la materia conoce completamente el procedimiento de reconstruir moléculas de ADN usando mutación de ácido nucleico. Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de cadena pesada y ligera también pueden obtenerse mediante síntesis
25 química.

ANTICUERPOS QUIMÉRICOS, ANTICUERPOS HUMANIZADOS Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN

30 **[0071]** En otro aspecto, la presente descripción también proporciona anticuerpos quiméricos que comprenden, en todo o en parte, las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos monoclonales murinos 13D4 o 20A11 o una variante de los mismos, combinadas con las regiones constantes de un anticuerpo monoclonal humano. Adicionalmente, la presente descripción incluye anticuerpos humanizados que comprenden una o más de las CDR de los anticuerpos monoclonales murinos 13D4 o 20A11 o una variante de los mismos, injertadas en un armazón de anticuerpo humano. La solicitud describe además anticuerpos quiméricos que
35 comprenden, en todo o en parte, las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos monoclonales murinos 8G9 o una variante de los mismos, combinadas con las regiones constantes de un anticuerpo monoclonal humano, y anticuerpos humanizados que comprenden una o más de las CDR de los anticuerpos monoclonales murinos 8G9 o una variante de los mismos, injertadas en un armazón de anticuerpo humano.

40 **[0072]** En otro aspecto, la presente descripción también proporciona una proteína de fusión que comprende, en todo o en parte, el anticuerpo monoclonal de la descripción, conjugado con ciertas moléculas.

45 **[0073]** Los anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y las proteínas de fusión pueden obtenerse, todos, usando procedimientos de ingeniería genética convencionales. Por ejemplo, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales puede modificarse sustituyendo la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (Morrison, y col., Proc. Nat. Acad. Sci. 81: 6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante no de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de una inmunoglobulina para producir los anticuerpos quiméricos o humanizados o las
50 proteínas de fusión.

ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

[0074] En otro aspecto, la presente descripción proporciona anticuerpos anti-H5 que son capaces de neutralizar la actividad viral del virus de la gripe aviar del subtipo H5. En un aspecto, dichos anticuerpos
55 neutralizantes son capaces de neutralizar al menos el 60%, o al menos el 70%, o preferentemente al menos el 75%, o preferentemente al menos el 80%, o preferentemente al menos el 85%, o preferentemente al menos el 90%, aún más preferentemente al menos el 95%, de la manera más preferente al menos el 99% de la actividad viral del virus de la gripe aviar del subtipo H5.

[0075] Un experto en la materia conoce completamente que la capacidad de un anticuerpo de neutralizar la actividad viral del virus de la gripe aviar del subtipo H5 puede determinarse usando procedimientos convencionales. El ensayo de neutralización descrito en el ejemplo 1 de la presente descripción puede usarse para determinar la actividad neutralizante de cierto anticuerpo monoclonal anti-H5 de la descripción.

5

PÉPTIDOS CORTOS

[0076] La presente solicitud también describe un péptido corto que imita el epítipo de reconocimiento del anticuerpo monoclonal.

10

[0077] La presente solicitud describe 9 péptidos cortos (SEQ ID NO: 31-39, 40) que comprenden doce aminoácidos que se unen específicamente al anticuerpo monoclonal 8G9.

PROCEDIMIENTOS DE DETECCIÓN

15

[0078] La presente solicitud describe además un procedimiento para detectar un antígeno y/o un anticuerpo en una muestra de virus de la gripe aviar de tipo H5 usando un anticuerpo monoclonal de la descripción.

[0079] En un aspecto, la presente solicitud describe un procedimiento para detectar el virus de la gripe aviar del subtipo H5 que comprende las siguientes etapas: (i) poner en contacto el virus en dicha muestra con un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo de la descripción para formar un complejo de dicho anticuerpo o fragmento con dicho virus; (ii) detectar dicho complejo para determinar la presencia de dicho virus en dicha muestra.

[0080] En otro aspecto, la presente solicitud describe un procedimiento para detectar el virus de la gripe aviar del subtipo H5 en una muestra, que comprende las siguientes etapas: (i) fijar un primer anticuerpo a un sustrato sólido; (ii) añadir una muestra que se sospecha que tiene virus de la gripe aviar del subtipo H5 a dicho sustrato; (iii) añadir un segundo anticuerpo que está enlazado a un agente de marcado a dicho sustrato; (iv) detectar la presencia del agente de marcado para medir la presencia de virus de la gripe aviar del subtipo H5.

[0081] Otro aspecto de la presente solicitud describe un procedimiento para detectar el virus de la gripe aviar del subtipo H5 en una muestra, que comprende las siguientes etapas: (i) fijar un anticuerpo a un sustrato sólido; (ii) añadir una muestra que se sospecha que tiene virus de la gripe aviar del subtipo H5 pre-mezclado con hemaglutinina H5 marcada a dicho sustrato; y (iii) detectar la presencia de la hemaglutinina H5 marcada.

[0082] Los procedimientos de detección pueden usar ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo enzimático, inmunoensayo por quimioluminiscencia, radioinmunoensayo, inmunoensayo por fluorescencia, inmunocromatografía, ensayo por competición y procedimientos de detección similares. Los procedimientos de detección anteriores pueden usarse para detectar los antígenos o anticuerpos diana mediante procedimientos de competición o sándwich.

40

[0083] El procedimiento de competición es una relación cuantitativa que compara la unión competitiva de un antígeno en una muestra y una cantidad conocida de un antígeno marcado al anticuerpo monoclonal de la presente descripción. Para llevar a cabo un ensayo inmunológico basado en el procedimiento de competición, una muestra que contiene una cantidad desconocida del antígeno diana se añade a un sustrato sólido en el que el anticuerpo monoclonal de la presente descripción se extiende como un revestimiento físico o químicamente mediante medios conocidos, y se permite continuar a la reacción. Simultáneamente, se añade una cantidad predeterminada del antígeno diana marcado previamente y se permite continuar a la reacción. Después de la incubación, el sustrato sólido se lava y se mide la actividad del agente de marcado unido al sustrato sólido.

[0084] En el procedimiento de sándwich, el antígeno diana en una muestra se intercala entre el anticuerpo monoclonal inmovilizado y el anticuerpo monoclonal marcado, a continuación se añade un sustrato de marcado tal como una enzima, se detectan cambios de color del sustrato y, de este modo, se detecta la presencia del antígeno. Para llevar a cabo un ensayo inmunológico basado en el procedimiento de sándwich, por ejemplo, una muestra que contiene una cantidad desconocida del antígeno diana se añade a un sustrato sólido en el que el anticuerpo monoclonal de la presente descripción se extiende como un revestimiento físico o químicamente mediante medios conocidos, y se permite continuar a la reacción. Seguidamente, se añade el anticuerpo monoclonal marcado de la descripción y se permite continuar a la reacción. Después de la incubación, el sustrato sólido se lava y se mide la actividad del agente de marcado unido al sustrato sólido. El agente de marcado puede ser radioisótopos tales como ¹²⁵I, enzimas, sustratos enzimáticos, sustancias luminiscentes tales como isoluminol y ésteres de acridina,

55

sustancias fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, biotina, y sustancias teñidas tales como partículas de látex teñidas y oro coloidal. Las enzimas de marcado pueden ser peroxidasa (por ejemplo peroxidasa de rábano picante (HRP)), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, y glucosa oxidasa. Los sustratos adecuados para las reacciones pueden ser ácido 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), luminol- H_2O_2 , o-fenilendiamina- H_2O_2 (contra peroxidasa), fosfato de p-nitrofenilo, fosfato de 4-metilumbeliferilo, 3-(2'-espiroadamantan)-4-metoxi-4-(3"-fosforyloxi)fenil-1,2-dioxetano (contra fosfatasa alcalina), p-nitrofenil- β -D-galactosa y metilumbeliferil- β -D-galactosa (contra β -galactosidasa). Las marcas adicionales incluyen nanopartículas "quantum dots"-marcas, marcas cromóforas etiquetas, marcas enzimáticas, marca de ligando de afinidad, marcas de espín electromagnéticas, marcas de átomos pesados, sondas marcadas con marcas de dispersión de luz de nanopartículas u otras sondas de nanopartículas, isotiocianato de fluoresceína (FITC), TRITC, rodamina, tetrametilrodamina, R-ficoeritrina, Cy-3, Cy-5, Cy-7, Texas Red, Phar-Red, alofococianina (APC), marcadores de epítipo como el epítipo FLAG o HA, y marcadores enzimáticos tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa y conjugados de haptenos tales como digoxigenina o dinitrofenilo, o miembros de un par de unión que son capaces de formar complejos tales como estreptavidina/biotina, avidina/biotina o un complejo antígeno/anticuerpo incluyendo, por ejemplo, IgG de conejo y anti-IgG de conejo; fluoróforos tales como umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, proteína verde fluorescente, eritrosina, cumarina, metilcumarina, pireno, verde de malaquita, estilbena, amarillo lucifer, Cascade Blue, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, ficoeritrina, complejos de lantánidos fluorescentes, tales como los que incluyen europio y terbio, Cy3, Cy5, balizas moleculares y derivados fluorescentes de los mismos, un material luminiscente tal como luminol; materiales dispersantes de la luz o resonantes del plasmón tales como partículas de oro o plata o *quantum dots*; o un material radiactivo que incluye ^{14}C , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I , Tc99m, ^{35}S o 3H ; o envueltas esféricas, y sondas marcadas con cualquier otra marca que genera señales conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, las moléculas detectables incluyen, aunque no se limitan a, fluoróforos así como otros conocidos en la técnica tal como se describen, por ejemplo, en Principles of Fluorescence Spectroscopy, editado por Joseph R. Lakowicz (Editor), Plenum Pub Corp, 2ª edición (julio de 1999) y la 6ª edición del Molecular Probes Handbook de Richard P. Hoagland. En algunos aspectos, las marcas comprenden nanocristales semiconductores tales como *quantum dots* (es decir, Qdots), véase la patente de Estados Unidos No. 6.207.392. Los Qdots están disponibles en el mercado de Quantum Dot Corporation. Los nanocristales semiconductores útiles en la práctica de la descripción incluyen nanocristales semiconductores del Grupo II-VI tales como MgS, MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, BaTe, ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe, HgS, HgSe y HgTe así como composiciones mixtas de los mismos; así como nanocristales de semiconductores del Grupo III-V tales como GaAs, InGaAs, InP e InAs y combinaciones mixtas de los mismos. El uso de semiconductores del Grupo IV tales como germanio o silicio, o el uso de semiconductores orgánicos, puede ser factible en ciertas condiciones. Los nanocristales semiconductores también pueden incluir aleaciones que comprenden dos o más semiconductores seleccionados entre compuestos del Grupo III-V, compuestos del Grupo II-VI, elementos del Grupo IV, y combinaciones de los mismos.

[0085] En algunos aspectos, un aceptor de energía fluorescente está enlazado como una marca a una sonda de detección. En un aspecto, el aceptor de energía fluorescente puede formarse como resultado de un compuesto que reacciona con oxígeno singlete para formar un compuesto fluorescente o un compuesto que pueda reaccionar con un compuesto auxiliar que se convierte en lo sucesivo en un compuesto fluorescente. Dichos compuestos pueden estar compuestos por tampones contenidos en un dispositivo de la descripción. En otros aspectos, el aceptor de energía fluorescente puede ser parte de un compuesto que incluye el quimioluminiscente o grupo. Por ejemplo, el aceptor de energía fluorescente puede incluir un complejo metálico de un metal de las tierras raras tal como, por ejemplo, europio, samario, telurio y similares. Estos materiales son particularmente atractivos debido a su nítida banda de luminiscencia. Además, marcas de lantánidos, tales como europio (III) permiten una emisión de señales eficaz y prolongada y no son fáciles de fotoblanquear, permitiendo de este modo que los dispositivos de ensayo que contienen la muestra procesada/que reaccionó se dejen a un lado, si fuera necesario, durante un periodo de tiempo prolongado. Las nanopartículas de complejo de europio (III) fluorescentes de larga vida se han aplicado como marcas en diversos inmunoensayos heterogéneos y homogéneos. Véase, por ejemplo, Huhtinen y col. Clin. Chem. Oct., de 2004; 50(10): 1935-6. El rendimiento del ensayo puede mejorar cuando estas nanopartículas marcadas intrínsecamente se usan en combinación con detección de fluorescencia resuelta en el tiempo. En ensayos heterogéneos, el intervalo dinámico de ensayos a bajas concentraciones puede prolongarse. Además, las características cinéticas de los ensayos también pueden mejorar mediante el uso de marcas de nanopartículas de actividad específica elevada, revestidas con anticuerpo de detección en lugar de anticuerpos de detección marcados de forma convencional. En ensayos homogéneos, las nanopartículas de europio (III) son donadores eficientes para transferencia de energía de resonancia por fluorescencia, permitiendo un cribado sencillo, rápido y eficiente. En algunos aspectos, una marca (por ejemplo, marca fluorescente) descrita en el presente documento, incluye una marca de nanopartícula conjugada con biomoléculas. En otras palabras, una nanopartícula

puede utilizarse como una sonda de detección o de captura. Por ejemplo, una nanopartícula marcada con europio (III) enlazada a anticuerpos monoclonales o estreptavidina (SA) para detectar un analito particular en una muestra puede utilizarse en la práctica de la presente descripción (por ejemplo, inmunoensayo basado en nanopartículas). Las nanopartículas pueden servir como sustrato al que se fijan los agentes de unión específicos, estos agentes de unión específicos son para el analito y el resto de detección (es decir, marca) o captura. Ejemplos de marcas pueden encontrarse en las patentes de Estados Unidos No. 4.695.554; 4.863.875; 4.373.932; y 4.366.241. Metales coloidales y partículas colorantes se describen en las patentes de Estados Unidos No. 4.313.734 y 4.373.932. La preparación y el uso de coloides no metálicos se describen en la patente de Estados Unidos No. 4.954.452. Partículas de látex polimérico orgánico para uso como marcas se describen en la patente de Estados Unidos No. 4.252.459.

[0086] Los agentes de marcado pueden unirse al antígeno o anticuerpo mediante el procedimiento de maleimida (J. Biochem. (1976), 79, 233), procedimiento de biotina activada (J. Am. Chem. Soc. (1978), 100, 3585), procedimiento de unión hidrófoba, procedimiento de éster activado o procedimiento de isocianato ("Enzyme immunoassay techniques", publicado en 1987 por Igaku Shoin).

[0087] Cuando el agente de marcado anterior es radioisótopos, es necesario llevar a cabo la medición usando un contador de pocillo o un contador de centelleo líquido. Cuando el agente de marcado es una enzima, es necesario que se añada el sustrato y la actividad enzimática se mide mediante colorimetría o fluorometría. Cuando el agente de marcado es una sustancia fluorescente, sustancia luminiscente o sustancia teñida, la medición puede realizarse respectivamente mediante un procedimiento conocido en la técnica.

[0088] Las muestras usadas para detectar virus de la gripe aviar del subtipo H5 incluyen, aunque sin limitarse a, los residuos de animales o pacientes, secreciones de las cavidades bucal y nasal, virus intactos o virus líticos en cultivo embrionario de pollo, etc.

DISPOSITIVOS Y KITS DE DETECCIÓN

[0089] Esta solicitud describe además un kit para el diagnóstico de la infección por virus de la gripe aviar del subtipo H5, especialmente un kit para detectar el antígeno o anticuerpo del virus de la gripe aviar del subtipo H5 en la muestra. El kit de diagnóstico descrito en el presente documento comprende al menos una especie de anticuerpo monoclonal de la invención. El anticuerpo monoclonal de la descripción, que se usará en el kit de diagnóstico descrito en el presente documento, no está particularmente restringido pero puede ser cualquiera de aquellos anticuerpos monoclonales que reconocen el antígeno hemaglutinina H5, y también puede ser cualquier fragmento de anticuerpo específico de antígeno de los anticuerpos monoclonales de la descripción tales como F(ab')₂, Fab', Fab y similares.

[0090] En un aspecto, esta solicitud describe dos clases de kits para detectar virus de la gripe aviar del subtipo H5 que contienen al menos uno de los anticuerpos monoclonales de la descripción o sus fragmentos activos o variantes. Preferentemente, los kits descritos en el presente documento también contienen reactivo de detección adecuado para detectar las reacciones antígeno-anticuerpo.

[0091] En otro aspecto, esta solicitud describe un kit para detectar anticuerpo anti-virus de la gripe aviar del subtipo H5, que contiene al menos uno de los anticuerpos monoclonales de la descripción o sus fragmentos activos o variantes. Preferentemente, el kit contiene el reactivo de detección adecuado para detectar las reacciones antígeno-anticuerpo.

[0092] El sustrato sólido a usar en el kit de diagnósticos incluye, aunque sin limitarse a, microplacas, partículas magnéticas, papeles de filtro para inmunocromatografía, polímeros tales como poliestireno, perlas de vidrio, filtros de vidrio y otros portadores insolubles. En un aspecto, un sustrato sólido que contiene muchos compartimentos o regiones tiene al menos un compartimento revestido con anticuerpos de la descripción. Preferentemente, al menos un compartimento (o el primer compartimento) está revestido con anticuerpos de la invención, además, al menos uno de los restantes compartimentos (o el segundo compartimento) está revestido con anticuerpos que pueden unirse específicamente a subtipos excepto H5 del virus de la gripe aviar (por ejemplo H1, H2, H3, H4, H6, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H13, H14, H15 o H16). Los subtipos preferidos son H1, H3, H7, H9.

[0093] El agente de diagnóstico también comprende otro constituyente. El otro constituyente incluye, aunque sin limitarse a, enzimas para marcado, sustratos de las mismas, radioisótopos, sustancias que reflejan la luz, sustancias fluorescentes, sustancias teñidas, soluciones tampón y placas, y los mencionados anteriormente en el

presente documento.

[0094] En el agente de diagnóstico, el anticuerpo monoclonal de la descripción debe inmovilizarse sobre un sustrato sólido de antemano. En un aspecto preferido, orientar el anticuerpo monoclonal inmovilizado será útil para mejorar la eficiencia de unión del anticuerpo al antígeno. TaeWoon Cha y col., (Proteomics 5, 416-419 (2005)) han demostrado que el control de la conformación de moléculas de proteína inmovilizadas y el diseño de un entorno químico ideal sobre la superficie del sustrato sólido son útiles para preservar y mejorar la actividad y potencia de reacción de las proteínas inmovilizadas. Diversos procedimientos para fijar anticuerpos a un sustrato sólido en una orientación de conformación deseada se han descrito mediante la bibliografía. Shawn Weng y col., (Proteomics 2, 48-57 (2002)) describieron un procedimiento de orientar proteínas de una manera uniforme sobre una superficie a través de ácidos nucleicos enlazados a las proteínas. Soellner, M. y col., (J. AM. CHEM. SOC. 125, 11790-11791 (2003)) describieron un procedimiento siguiendo el cual proteínas que incluyen anticuerpos y antígenos se unieron a una superficie de una manera uniforme a través de ligamiento de Staudinger en el que una azida y fosfinotioéster reaccionan para formar una amida. Hairong Zhang y col., (Anal. Chem, 78, 609-616 (2006)) describió un procedimiento de orientación de anticuerpo sobre partículas magnéticas revestidas de oro a través de reacción de los tioles libres de los fragmentos Fab' de los anticuerpos con la superficie de las partículas, según el cual todos los sitios de unión al antígeno de los anticuerpos se orientaron en una conformación favorable. Hai Xu y col., (J. Phys. Chem. B, 110, 1907-1914 (2006)) describieron procedimientos de adsorber anticuerpos a la superficie de óxido de silicio/agua hidrófila. Seung-yong Seong y col., (Proteomics, 3, 2176-2189 (2003)) revisaron procedimientos para inmovilización orientada de procedimientos a una superficie y las moléculas de proteína usadas en dichos procedimientos.

[0095] En el kit de diagnóstico, el anticuerpo monoclonal o antígeno debe estar marcado con el agente de marcado mencionado anteriormente de antemano.

[0096] La presente solicitud describe además un dispositivo de detección automatizado que es capaz de detectar virus de la gripe aviar en una muestra a través de procesos automatizados.

[0097] Diversos dispositivos para detectar la presencia de un analito en una muestra de fluido biológico a través del uso de inmunoquímica se han descrito en la técnica. Estos dispositivos pueden utilizar el llamado ensayo en "sándwich", por ejemplo, un analito diana tal como un antígeno se "intercala" entre un anticuerpo marcado y un anticuerpo inmovilizado sobre un soporte sólido. El ensayo es leído observando la presencia y/o cantidad de complejo antígeno unido-anticuerpo marcado. Estos dispositivos también pueden incorporar un inmunoensayo de competición, en el que un anticuerpo unido a una superficie sólida se pone en contacto con una muestra que contiene una cantidad desconocida de analito del antígeno y con antígeno marcado del mismo tipo. La cantidad de antígeno marcado unido sobre la superficie sólida se determina a continuación para proporcionar una medida indirecta de la cantidad de analito del antígeno en la muestra. Diferentes ensayos pueden utilizar dispositivos adaptados para ensayar diferentes analitos, por ejemplo, incorporando diferentes anticuerpos o antígenos en regiones designadas o abordables del sustrato de ensayo (por ejemplo, membranas absorbentes o no absorbentes). Dado que estos y otros procedimientos descritos a continuación pueden detectar tanto anticuerpos como antígenos, estos se denominan generalmente ensayos de ligando-receptor inmunoquímicos o simplemente inmunoensayos.

[0098] Los dispositivos de inmunoensayo en fase sólida, ya sean de tipo de sándwich o de competición, pueden proporcionar una detección sensible de un analito en una muestra de fluido biológico tal como sangre u orina. Los dispositivos de inmunoensayo en fase sólida comprenden un soporte sólido al que está unido un miembro de un par ligando-receptor, habitualmente un anticuerpo, antígeno o hapteno. Habitualmente, formas de soportes sólidos anteriores fueron placas, tubos o perlas de poliestireno que se conocían bien en los campos de radioinmunoensayo e inmunoensayo enzimático. Más recientemente, una serie de materiales porosos tales como nylon, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos se han empleado como soportes sólidos. Una serie de kits de inmunoensayo autónomos que usan materiales porosos como portadores en fase sólida de componentes inmunoquímicos tales como antígenos, haptenos o anticuerpos han sido descritos por personas. Estos kits son habitualmente de diseño de tira reactiva, flujo continuo o migratorio. Cualquiera de los dispositivos conocidos convencionales para realizar inmunoensayos o ensayos de unión específica pueden utilizarse en la invención para detectar gripe.

[0099] En ciertos aspectos, la presente solicitud describe dispositivos para la detección de infección causada por diversos tipos de virus de la gripe o subtipos del mismo. En algunos aspectos, una muestra que contiene uno o más virus de la gripe o anticuerpos anti-virus de la gripe se administra a un dispositivo para determinar si la muestra es de un sujeto infectado con uno o más tipos de virus de la gripe o subtipos del mismo. Un dispositivo que

comprende un soporte sólido puede comprender anticuerpos anti-virus de la gripe o antígenos del virus de la gripe dispuestos sobre él, de este modo es capaz de ensayar una muestra que se sospecha que contiene un virus de la gripe, proteína del virus de la gripe o un anticuerpo anti-virus de la gripe. En diversos aspectos, los anticuerpos utilizados en dispositivos descritos en el presente documento incluyen aunque sin limitarse a: un anticuerpo 5 policlonal, un anticuerpo monoclonal (MAb), o variantes conservativas o funcionales de los mismos, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo remodelado, un anticuerpo humanizado, un fragmento bioactivo de los mismos, o cualquier combinación de dichos anticuerpos; cualquiera de dichos anticuerpos funcionales o fragmentos de los mismos, en conjunto, remítase al anticuerpo. Los anticuerpos de la descripción pueden adaptarse a cualesquiera dispositivos para detectar virus de la gripe. Por ejemplo, el virus de la gripe aviar H5 puede detectarse dirigiéndose a una 10 proteína H5 o un anticuerpo anti-subtipo H5 en una muestra. En un aspecto, H5 es de virus de la gripe aviar (AIV).

[0100] Muchos dispositivos disponibles en el mercado puede adaptarse fácilmente para incorporar anticuerpos o antígenos descritos en el presente documento. Estos dispositivos pueden incorporar un sustrato sólido usado en los procedimientos de detección, incluyendo sin limitación microplacas, partículas magnéticas, papeles de 15 filtro para inmunocromatografía, polímeros tales como poliestireno, perlas de vidrio, filtros de vidrio y otros portadores insolubles. El sustrato generalmente estará en formas que incluyen, aunque sin limitarse a, una tira, lámina, chip, esfera, perla, pocillo como un pocillo en una placa de microvaloración, o cualesquiera otras formas adecuadas. Además, el sustrato al que está unido un socio de unión (es decir, antígeno o anticuerpo) puede estar en cualquiera de diversas formas, por ejemplo, una placa de microvaloración, un tubo de ensayo, una tira reactiva, un 20 tubo de microcentrifuga, una perla, un disco giratorio, y similares. Los materiales adecuados incluyen vidrio, plástico (por ejemplo, poletileno, PVC, polipropileno, poliestireno, y similares), proteína, papel, carbohidrato, y otros soportes sólidos. Otros materiales que pueden emplearse incluyen cerámica, metales, metaloides, materiales semiconductores, cementos y similares. En algunos aspectos, las placas de microvaloración utilizados en inmunoensayos (por ejemplo, ELISA) comprenden placas de formatos de 96 pocillos, 384 pocillos o 1536 pocillos, o 25 mayor número de pocillos, tales como otras placas comerciales.

[0101] Algunos dispositivos disponibles incluyen tira reactiva, flujo lateral, cartucho, multiplexado, placa de microvaloración, microfluidicos, placa o matrices (*arrays*) o plataformas de alto rendimiento, tales como las descritas en las patentes de Estados Unidos No. 6.448.001; 4.943.522; 6.485.982; 6.656.744; 6.811.971; 5.073.484; 30 5.716.778; 5.798.273; 6.565.808; 5.078.968; 5.415.994; 6.235.539; 6.267.722; 6.297.060; 7.098.040; 6.375.896; 7.083.912; 5.225.322; 6.780.582; 5.763.262; 6.306.642; 7.109.042; 5.952.173 y 5.914.241. Dispositivos microfluidicos ejemplares incluyen los descritos en la patente de Estados Unidos No. 5.707.799 y el documento WO 2004/029221.

35 Tira reactiva

[0102] En algunas formas muy comunes de ensayos con tira reactiva, como en kits de detección de embarazo y ovulación domésticos, los componentes inmunoquímicos tales como anticuerpos están unidos a una fase sólida. El dispositivo de ensayo se “sumerge” para incubación en una muestra que se sospecha que contiene 40 un analito del antígeno desconocido. Como alternativa una pequeña cantidad de muestra puede estar colocada sobre una zona de recepción de muestra. Un anticuerpo marcado se añade a continuación y la marca es detectada como una indicación de la presencia del analito de interés. En algunos casos, la marca es una enzima así que es necesario añadir un anticuerpo marcado con enzima, simultáneamente o después de un periodo de incubación. A continuación, el dispositivo se lava y a continuación se inserta en una segunda solución que contiene un sustrato 45 para la enzima. La enzima-marca, si está presente, interactúa con el sustrato, causando la formación de productos teñidos que se depositan como un precipitado sobre la fase sólida o producen un cambio de luz visible en la solución de sustrato. Baxter y col., en el documento EP-A 0 125 118 describen dicho inmunoensayo de tira reactiva de tipo sándwich. Kali y col., en el documento EP-A 0 282 192 describen un dispositivo de tira reactiva que puede usarse en ensayos de tipo de competición. Los materiales de la tira reactiva en T, formatos y marcas se conocen y pueden 50 usarse en un ensayo de gripe. Los dispositivos de tira reactiva ejemplares incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos No. 4.235.601, 5.559.041, 5.712.172 y 6.790.611. En algunos aspectos, los anticuerpos de la presente descripción pueden estar dispuestos sobre un dispositivo de tira reactiva. Por ejemplo, anticuerpo anti-AIV del subtipo H5 en una muestra puede detectarse a través del uso de una tira reactiva de soporte en fase sólida, que puede fijarse en uno o más cuadrados matriciales. Un cuadrado matricial puede tener un anticuerpo de control no 55 específico o un fragmento funcional del mismo fijado. Estos cuadrados matriciales pueden ser los sitios de unión a la proteína y/o unión al antígeno en y están hechos habitualmente de nitrocelulosa; sin embargo, puede utilizarse cualquier medio adecuado conocido en la técnica, tal como ciertos nylons y polivinilidenos. En algunos aspectos, una multitud de matrices pueden estar fijadas al soporte sólido. Cada matriz contiene un antígeno o anticuerpo para una pluralidad de subtipos de virus de la gripe.

Flujo continuo

[0103] El diseño de dispositivos de inmunoensayo de tipo de flujo continuo puede obviar la necesidad de exhaustivas etapas de incubación y engorrosas etapas de lavado en ensayos de tira reactiva. Valkirs y col., en la patente de Estados Unidos No. 4.632.901 describen un dispositivo que comprende un anticuerpo (específico para un analito de antígeno diana) unido a una membrana o filtro poroso al que se añade una muestra de líquido. Dado que el líquido fluye por o fluye continuamente a través de la membrana, el analito diana se une al anticuerpo. La adición de la muestra puede venir seguida por la adición de anticuerpo marcado. La detección visual de anticuerpo marcado puede indicar la presencia de analito del antígeno diana en la muestra. Korom y col., en el documento EP-A 0 299 359 describe una mejora en el dispositivo de flujo continuo en el que el anticuerpo marcado se incorpora en una membrana que actúa como sistema de suministro de reactivo. Dichos dispositivos pueden comprender capas que sirven como filtros para componentes en la muestra e incluyen los reactivos utilizados en el ensayo. A medida que la muestra fluye de una capa a otra, contacta y reacciona con los reactivos de unión específicos y, en algunos casos, los componentes del sistema de marcado pueden proporcionar una indicación de la presencia del analito diana.

Dispositivos de inmunofiltración.

[0104] Los dispositivos de inmunofiltración están disponibles en el mercado (por ejemplo, Pierce, Rockford, IL) y pueden adaptarse fácilmente para incorporar anticuerpos de la presente descripción. En un procedimiento de ensayo de flujo inmunológico ligado a enzimas (ELIFA), se usa una membrana de nitrocelulosa intercalada entre una placa de aplicación de muestras de 96 pocillos y una cámara de vacío. Se añaden reactantes a la placa de aplicación de muestras y el vacío permite que los reactantes pasen a través de la membrana. Cánulas transfieren productos no unidos a la cámara de recogida. Para detección, una placa de microensayo (placa de micropocillos) se coloca en la cámara de recogida antes de añadir en sustrato enzimático. El vacío permite la transferencia del producto teñido al interior de los pocillos de la placa de microensayo para análisis en un lector de placas de microensayo automatizado. El sistema ELIFA está compuesto por plexiglás cortado con precisión con juntas de sellado herméticas que proporcionan caudales constantes de un pocillo a otro. Las cánulas pueden transferir de forma precisa producto teñido a los pocillos de la placa de microensayo para análisis. Básicamente, un anticuerpo de captura de la descripción se coloca sobre el sustrato (por ejemplo, placa de microvaloración, membrana o chip). Una muestra biológica que se sospecha que contiene virus de la gripe o antígenos del virus de la gripe se aplica y se incuba para permitir que los anticuerpos de captura se unan. Posteriormente, se añade un anticuerpo de detección. Un dispositivo de inmunofiltración e alto rendimiento se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0108949. Dichos dispositivos pueden comprender capas que sirven como filtros y/o incluyen los reactivos utilizados en el ensayo. Dado que la muestra reacciona con los reactivos de unión específicos y en algunos casos componentes del sistema de marcado pueden proporcionar una indicación de la presencia de cierto analito.

Dispositivos de flujo lateral

[0105] En ensayos de tipo de flujo lateral, una membrana se impregna con algunos o todos de los reactivos necesarios para realizar un ensayo. Se proporciona una zona de detección del analito en el que el analito marcado se detecta. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.366.241 de Tom y col., y el documento EP-A 0 143 574 de Zuk. Es conocido que pueden realizarse muchas mejoras para dispositivos de ensayo de flujo lateral. Este dispositivo puede comprender algunos de los reactivos para el ensayo de unión específica (la muestra puede reaccionar con algunos reactivos antes de aplicar a la tira de flujo lateral o reactivos adicionales pueden aplicarse secuencialmente a la tira) o la tira puede contener todos los reactivos necesarios para el ensayo de unión específica. Los dispositivos de flujo lateral frecuentemente incorporan dentro de ellos reactivos que pueden fijarse a marcas teñidas, de este modo el resultado de la detección puede observarse directamente sin la adición de sustancias adicionales. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.770.853 de Bernstein, el documento WO 88/08534 de May y col., y el documento EP-A 0 299 428 de Ching y col. Los dispositivos de esta clase están contruidos generalmente para incluir una ubicación para la aplicación de la muestra, una zona de reactivo y una zona de detección. El dispositivo está hecho normalmente de un material absorbente, lo que permite que la muestra fluya continuamente desde la zona de aplicación de la muestra a través de la zona de reactivo o de reacción hasta la zona de detección. Aunque algunas de las reacciones pueden haberse producido antes de la aplicación de la muestra a la tira, en algunos aspectos, la zona de reacción incluye los reactivos para el inmunoensayo. Un reactivo de unión específico, por ejemplo un anticuerpo, puede estar unido de forma difusiva a la tira en la zona de aplicación de la muestra o una zona de reacción de modo que pueda unirse al antígeno en la muestra y fluir con la muestra a lo largo de la tira. El complejo antígeno-anticuerpo puede estar capturado en la zona de detección directamente con otro socio de unión específico para el antígeno o anticuerpo o con otros socios de unión específicos, tales como

avidina o estreptavidina y biotina para capturar indirectamente. Análogamente, la marca puede fijarse directa o indirectamente al antígeno o anticuerpo. Para dispositivos de flujo lateral ejemplares, véase las patentes de Estados Unidos No. 4.818.677, 4.943.522, 5.096.837 (RE 35.306), 5.096.837, 5.118.428, 5.118.630, 5.221.616, 5.223.220, 5.225.328, 5.415.994, 5.434.057, 5.521.102, 5.536.646, 5.541.069, 5.686.315, 5.763.262, 5.766.961, 5.770.460, 5.773.234, 5.786.220, 5.804.452, 5.814.455, 5.939.331 y 6.306.642. Otros dispositivos de flujo lateral que pueden modificarse para uso en la detección de múltiples analitos en una muestra de fluido se describen en las patentes de Estados Unidos No. 4.703.017, 6.187.598, 6.352.862, 6.485.982, 6.534.320 y 6.767.714.

[0106] En la técnica convencional, múltiples analitos de una muestra pueden analizarse usando una única tira de ensayo estableciendo zonas de detección independientes para cada analito. Distinguir entre diferentes analitos puede conseguirse usando diferentes marcas o midiendo la misma marca en las diferentes zonas de detección. El ensayo para múltiples analitos puede conseguirse con cualquiera de los dispositivos convencionales.

[0107] Los inmunoensayos utilizan mecanismos de los sistemas inmunitarios, en los que se producen anticuerpos en respuesta a la presencia de antígenos que son patógenos o extraños para los organismos. Estos anticuerpos y antígenos, es decir, inmunorreactantes, son capaces de unirse entre sí, causando de este modo un mecanismo de reacción altamente específico que puede usarse para determinar la presencia o concentración de un antígeno particular en una muestra de ensayo.

[0108] Dicho dispositivo de flujo lateral habitualmente comprende una membrana porosa opcionalmente soportada por un material rígido. En general, la membrana porosa puede estar hecha de cualesquiera materiales a través de los cuales se le permite pasar a un fluido. Por ejemplo, los materiales usados para formar la membrana porosa pueden incluir, aunque sin limitarse a, material natural, material sintético, o materiales de origen natural que se modifican de forma sintética, tales como polisacáridos (por ejemplo, materiales de celulosa tales como papel y derivados de celulosa, tales como acetato de celulosa y nitrocelulosa); poliéster sulfona; polietileno; nylon; PVDF; poliéster; polipropileno; sílice; materiales inorgánicos, tales como alúmina desactivada, tierra de diatomeas, MgSO₄, u otro material finamente dividido inorgánico dispersado uniformemente en una matriz polimérica porosa, con polímeros tales como cloruro de vinilo, copolímero de cloruro de vinilo-propileno, y copolímero de cloruro de vinilo-acetato de vinilo; paño, tanto de origen natural (por ejemplo, algodón) como sintético (por ejemplo, nylon o rayón); geles permeables porosos, tales como gel de sílice, agarosa, dextrano, y gelatina; películas poliméricas, tales como poliácridamida y similares. En un aspecto particular, dicha membrana permeable porosa está formada de materiales de nitrocelulosa y/o poliéster sulfona. Debe entenderse que el término "nitrocelulosa" se refiere a ésteres de ácido nítrico de celulosa, que puede ser nitrocelulosa en solitario, o su mezcla con éster de ácido nítrico u otros ésteres de ácido, tales como ésteres de ácido carboxílico alifáticos que tienen de 1 a 7 átomos de carbono.

[0109] Dicho dispositivo también puede contener una tira con una almohadilla absorbente dispuesta aguas arriba o aguas abajo de las zonas de ensayo/detección o control. Como es bien conocido por el experto en la materia, la almohadilla absorbente puede ayudar a promover la acción capilar y el flujo de fluida a través de la membrana. En algunos aspectos, las almohadillas absorbentes pueden contener reactivos de inmunoensayo movilizables (por ejemplo, anticuerpos). Por supuesto, es necesario entender que los reactivos de inmunoensayo movilizables o inmovilizados también pueden disponerse en cualquier parte aguas arriba de las zonas de detección/ensayo o control, como en componentes independientes de un sistema de detección.

[0110] En muchos aspectos, algunos materiales adecuados que pueden usarse para formar la almohadilla para la muestra incluyen, aunque sin limitarse a, nitrocelulosa, celulosa, almohadillas de polietileno porosas, y almohadillas de fibra de vidrio. Si se desea, la almohadilla para la muestra también puede contener uno o más reactivos de ensayo pretratados, fijados covalente o no covalentemente a ella. La muestra de ensayo se desplaza desde la almohadilla para la muestra hasta una almohadilla de conjugado que está colocado en comunicación con un extremo de la almohadilla para la muestra. La almohadilla de conjugado está formada de un material a través del cual un fluido es capaz de pasar. Por ejemplo, en un aspecto, la almohadilla de conjugado está formada de fibra de vidrio. Debe entenderse que también pueden usarse otras almohadillas de conjugado. Como alternativa, en algunos aspectos pueden incluirse conjugados u otros inmunorreactivos en un componente que se mezcla con una muestra a la aplicación a una tira de ensayo.

[0111] Para facilitar la detección de la presencia o ausencia de un analito dentro de la muestra de ensayo, pueden aplicarse diversas sondas de detección a la almohadilla de conjugado. Aunque contenidas sobre la almohadilla de conjugado, estas sondas de detección permanecen disponibles para unión con el analito a medida que pasa desde la almohadilla de muestreo a través de la almohadilla de conjugado. Tras la unión con el analito, las sondas de detección se utilizan a continuación para identificar la presencia o ausencia del analito. Las sondas de

detección pueden usarse para la detección o calibración del ensayo. En aspectos alternativos, sin embargo, sondas de calibración independientes pueden aplicarse a la almohadilla de conjugado para uso junto con las sondas de detección para facilitar calibración y detección simultánea, eliminando de este modo imprecisiones creadas a menudo mediante sistemas de calibración de ensayo convencionales.

5

[0112] En algunos casos, puede desearse modificar las sondas de detección de alguna manera de modo que sean más fácilmente capaces de unirse al analito. En dichos casos, las sondas de detección pueden modificarse mediante ciertos miembros de unión específicos que se adhieren a ellas para formar sondas conjugadas. Miembros de unión específicos generalmente se refieren a un miembro de un par de unión específico, es decir, dos moléculas diferentes donde una de las moléculas se une química y/o físicamente a la segunda molécula. Por ejemplo, miembros de unión específicos inmunorreactivos pueden incluir antígenos, haptenos, aptámeros, anticuerpos (primarios o secundarios), y complejos de los mismos, incluyendo aquellas sustancias formadas mediante procedimientos de ADN recombinante o procedimientos de síntesis peptídica. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, una proteína recombinante o una o más mezclas o fragmentos de los mismos, o una mezcla de un anticuerpo y otros miembros de unión específicos. Los detalles de la preparación de dichos anticuerpos y su sostenibilidad para uso como miembros de unión específicos se describen en el presente documento. Otros pares de unión específicos comunes incluyen, aunque sin limitarse a, biotina y avidina (o derivados de los mismos), biotina y estreptavidina, carbohidratos y lectinas, secuencias de nucleótidos complementarias (incluyendo secuencias de ácido nucleico de sonda y de captura usados en ensayos de hibridación de ADN para detectar una secuencia de ácido nucleico diana), secuencias peptídicas complementarias que incluyen aquellas formadas mediante procedimientos recombinantes, moléculas efectoras y receptoras, hormonas y proteína de unión a hormonas, cofactores enzimáticos y enzimas, inhibidores enzimáticos y enzimas, y así sucesivamente. Además, pares de unión específicos incluyen miembros que son similares al miembro específico original. Por ejemplo, puede usarse un derivado o fragmento del analito, por ejemplo, un análogo de analito, siempre que tenga al menos un epítipo en común con el analito.

[0113] En un aspecto, por ejemplo, el fluido que contiene la muestra de ensayo es transportado hasta la almohadilla de oro, donde el analito se mezcla con sondas de detección modificadas con un miembro de unión específico para formar complejos de analito. Dado que el flujo no está obstruido entre la almohadilla de oro y la membrana porosa, los complejos pueden migrar desde la almohadilla de oro hasta una zona de detección presente sobre la membrana porosa. Como alternativa, pueden utilizarse múltiples zonas de detección incorporando anticuerpos específicos para diferentes antígenos (por ejemplo, diferentes virus de la gripe o antígenos virales de diferentes virus de la gripe). La zona o zonas de detección pueden contener un reactivo de inmovilización que es generalmente capaz de formar un enlace químico o físico con el analito y/o complejos del mismo (por ejemplo, complejos del analito con las sondas de detección). En algunos aspectos, el reactivo puede ser un reactivo biológico, tal como anticuerpos descritos en el presente documento. Otros reactivos biológicos son bien conocidos por el experto en la materia y pueden incluir, aunque sin limitarse a, antígenos, haptenos, anticuerpos, proteína A o G, avidina, estreptavidina, o complejos de los mismos. En algunos casos, se desea que estos reactivos biológicos sean capaces de unirse al analito y/o los complejos del analito con las sondas de detección.

40

[0114] Estos reactivos sirven como sitios de unión estacionarios para la detección de complejos sonda/analito. En algunos casos, los analitos, tales como anticuerpos, antígenos, etc., tienen dos sitios de unión. Tras alcanzar la zona o zonas de detección, uno de estos sitios de unión está ocupado por el miembro de unión específico de las sondas complejadas. Sin embargo, el sitio de unión libre del analito puede unirse al reactivo de inmovilización. Una vez unidas al reactivo de inmovilización, las sondas complejadas forman un nuevo complejo en sándwich ternario.

45

[0115] La zona o zonas de detección o ensayo pueden proporcionar generalmente cualquier número de regiones de detección distintas, de modo que un usuario pueda determinar mejor la presencia de un analito particular dentro de una muestra de ensayo. Cada región contiene los reactivos de muestra, o contiene diferentes reactivos para inmovilizar múltiples analitos. Por ejemplo, la zona o zonas de detección puede incluir dos o más regiones de detección distintas (por ejemplo, líneas, puntos, etc.).

50

[0116] En algunos casos, la membrana también puede definir una zona de control (no mostrada) que puede usarse para dar al usuario una señal de que el ensayo se está realizando apropiadamente. Por ejemplo, la zona de control (no mostrada) puede contener un reactivo de inmovilización que generalmente tiene la capacidad de formar un enlace químico y/o físico con sondas o con el reactivo inmovilizado sobre las sondas. Dichos reactivos incluyen, aunque sin limitarse a, por ejemplo, antígenos, haptenos, anticuerpos, proteína A o G, avidina, estreptavidina, anticuerpos secundarios, o complejos de los mismos. Además, también puede desearse utilizar diversos materiales

55

no biológicos para el reactivo de la zona de control. Por ejemplo, en algunos aspectos, el reactivo de la zona de control también puede incluir un polielectrolito, tal como el descrito anteriormente, que puede unirse a sondas no capturadas. Dado que el reactivo en la zona de control es solamente específico para sondas, se forma una señal independientemente de si el analito está presente. La zona de control puede estar situada en cualquier ubicación a lo largo de la membrana, pero está preferentemente situada aguas arriba de la zona de detección.

[0117] Pueden usarse diversos formatos para ensayar la presencia o ausencia de un analito que usa el ensayo. Por ejemplo, en el aspecto descrito anteriormente, se utiliza un formato de “sándwich”. Para otros ejemplos que usan dichos ensayos de tipo sándwich, véase las patentes de Estados Unidos No. 4.168.146 de Grubb, y col., y 4.366.241 de Tom, y col. Además, otros formatos, tales como formatos “competitivos”, también pueden utilizarse. En un ensayo competitivo, la sonda marcada está generalmente emparejada con una molécula que es idéntica a, o similar a, el analito. De este modo, la sonda marcada compite con el analito de interés por el reactivo disponible. Los ensayos competitivos se usan habitualmente para la detección de analitos tales como haptenos, cada hapteno monovalente es capaz de unirse solamente a una molécula de anticuerpo. Para ejemplos de dispositivos de inmunoensayo competitivo, véase las patentes de Estados Unidos No. 4.235.601 de Deutsch, y col., 4.442.204 de Liotta, y 5.208.535 de Buechler, y col. Para dispositivos de otras formas, véase la patente 5.395.754 de Lambotte, y col.; la patente 5.670.381 de Jou, y col.; y la patente 6.194.220 de Malick, y col.

Dispositivos microfluídicos

[0118] Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden incorporarse en un dispositivo microfluídico. El dispositivo es un sistema de flujo microfluídico capaz de unirse a uno o más analitos. Los analitos unidos pueden analizarse directamente en el dispositivo o retirarse del dispositivo, por ejemplo, para análisis o procesamiento adicionales. Como alternativa, pueden recogerse analitos no unidos al dispositivo, por ejemplo, para procesamiento o análisis adicional.

[0119] Un dispositivo ejemplar es un aparato de flujo que tiene un canal de placa plana a través del cual fluye una muestra; para dicho dispositivo, véase la patente de Estados Unidos No. 5.837.115. Las muestras pueden transferirse a dicho dispositivo por gravedad, capilaridad o mediante una fuerza activa, tal como mediante una bomba de infusión para perfundir una muestra, por ejemplo, sangre, al interior del dispositivo microfluídico. También pueden usarse otros procedimientos de transferencia conocidos. Los dispositivos microfluídicos pueden depender opcionalmente de una matriz de estructuras en el dispositivo para captura de analitos. Las estructuras pueden fabricarse mediante diversos procesos que incluyen, aunque sin limitarse a grabado con láser, gofrado, Lithographie Galvanoformung Abformung (litografía, electrodeposición y moldeo) (LIGA), electrochapado, electroformación, fotolitografía, ataque químico con iones reactivos, fresado con haz de iones, moldeo por compresión, colada, moldeo por inyección con fuerza motriz, moldeo por inyección y micromaquinado del material. Según sea necesario para su comprensión, los procedimientos utilizados para fabricar los dispositivos de la presente descripción no son críticos siempre que el procedimiento dé como resultado grandes cantidades de estructuras y dispositivos uniformes. Además, el procedimiento debe dar como resultado una gran área superficial de la estructura y dispuesta en proximidad cercana entre sí para producir un canal estrecho. Dicho canal estrecho permite que se produzca la difusión de analito en el fluido para mejorar la eficiencia de captura del analito y/o reactivo marcado en el sitio de captura.

[0120] Las estructuras producidas en masa están hechas preferentemente de cualquier número de materiales poliméricos. Se incluyen entre estos, aunque sin limitarse a, poliolefinas tales como polipropileno y polietileno, poliésteres tales como tereftalato de polietileno, polímeros que contienen estireno tales como poliestireno, estireno-acrilonitrilo, y acrilonitrilobutadienoestireno, policarbonato, polímeros acrílicos tales como polimetilmetacrilato y poliacrilonitrilo, polímeros que contienen cloro tales como cloruro de polivinilo y cloruro de polivinilideno, homopolímeros y copolímeros de acetal, celulósicos y sus ésteres, nitrato de celulosa, polímeros que contienen flúor tales como fluoruro de polivinilideno, politetrafluoroetileno, poliamidas, poliimidas, polieteretercetona, polímeros que contienen azufre tales como sulfuro de polifenileno y polietersulfona, poliuretanos, polímeros que contienen silicio, tales como polidimetilsiloxano. Además, dichas estructuras pueden estar hechas a partir de copolímeros, mezclas y/o laminados de los materiales anteriores, laminillas de metal tales como papel de aluminio, películas metalizadas y metales depositados sobre los materiales anteriores, así como materiales de vidrio y cerámica. En un procedimiento de este tipo, un láser, tal como un láser de excimeros puede usarse para iluminar una fotomáscara de modo que la luz que pasa a través de la fotomáscara retire un material subyacente formando canales en el sustrato del material. Sercel, J., y col., SPIE Proceedings, Vol. 998, (septiembre de 1988).

[0121] Generalmente, los dispositivos microfluídicos pueden comprender un orificio de entrada en el que

- entra la muestra de ensayo. Generalmente, los canales son capilares y proporcionan transporte de la muestra de ensayo desde el orificio de entrada al interior del dispositivo, una matriz de estructuras que proporcionan un sitio de captura, y un respiradero, tal como un orificio de salida, que ventila gases. Además, pueden añadirse cámaras y capilares adicionales cuando se personaliza el dispositivo. Generalmente, la muestra de ensayo se mueve a través del dispositivo que depende de fuerzas de capilaridad. Además, pueden usarse uno o más capilares para llevar la muestra de ensayo desde el orificio de entrada a los canales. Adicionalmente, pueden usarse uno o más capilares para salir del área de estructuras del dispositivo. Sin embargo, puede usarse presión diferencial para impulsar el flujo de fluido en los dispositivos en lugar de, o además de fuerzas de capilaridad.
- 10 **[0122]** Los canales se crean entre estructuras adyacentes a través de los cuales puede fluir el fluido. Los diseños del canal y la estructura son importantes para optimizar el contacto entre las superficies de la estructura y las moléculas de fluido. Normalmente, la profundidad de los canales varía entre aproximadamente 1 micrómetro (μm) y aproximadamente 1 milímetro (mm). La anchura promedio de los canales normalmente varía entre aproximadamente 0,02 μm y 20 μm . Los canales pueden incluir estructuras de diversas formas, incluyendo
- 15 diamantes, hexágonos, círculos, o cuadrados con una altura que varía normalmente de aproximadamente 1 μm y 1 mm y la anchura promedio normalmente varía entre 1 μm y 1 mm.
- [0123]** El reactivo de inmovilización puede estar fijado covalente o no covalentemente sobre la superficie de las estructuras como dentro de los capilares y/o las cámaras. El reactivo puede ser un reactivo liberado con el tiempo, reactivo separado espacialmente, o extendido como un revestimiento y secado sobre la superficie. Dichas técnicas de colocación del reactivo de inmovilización sobre las superficies son bien conocidas por los expertos en la materia. En un aspecto, los reactivos de inmovilización son anticuerpos descritos en el presente documento que se dirigen a antígenos del virus de la gripe (por ejemplo, AIV H5).
- 20 **[0124]** Los procedimientos para utilizar dispositivos de la presente descripción implican usar miembros de unión específicos. Los procedimientos de detección implican la unión de una marca teñida tal como un colorante fluorescente o una partícula teñida. Como alternativa, la detección puede implicar la unión de una enzima que puede producir un producto teñido.
- 25 **[0125]** Pueden usarse una o más trayectorias de flujo alternativas en los dispositivos de la presente descripción. El capilar se ramifica en diferentes trayectorias después de transportar la muestra de ensayo desde el orificio de entrada, la trayectoria principal hasta las estructuras y las trayectorias alternativas. Las trayectorias alternativas pueden permitir la presencia de múltiples sitios de captura y permitir constataciones simultáneas de la presencia o cantidad de múltiples analitos en un único sitio de ensayo. En un aspecto preferido, los múltiples analitos
- 30 (diferentes subtipos de la gripe) se determinan en los dispositivos de ensayo.
- [0126]** Las trayectorias alternativas pueden incluir áreas para mezclar muestras de ensayo de dichos kits. Por ejemplo, pueden usarse cámaras como áreas de adición de reactivos. Además, dispositivos de captura pueden estar incluidos en la trayectoria del dispositivo para retirar constituyentes del fluido por encima de cierto tamaño. Por ejemplo, los dispositivos de la presente descripción pueden incluir un separador, por ejemplo, para separar plasma o suero de la sangre completa. Por ejemplo, una matriz de material permeable poroso sinterizado hidrófilo puede tener un agente aglutinante de glóbulos rojos aplicado a su superficie. La matriz podría colocarse en el dispositivo anteriormente a las estructuras. Los glóbulos rojos en la muestra de sangre completa se quedan capturados en los intersticios de la matriz mientras que suero o plasma sustancialmente libre de células sanguíneas pasa a través de la
- 35 matriz y es transportado mediante acción capilar a la parte de estructuras del dispositivo. Se hace referencia a la patente de Estados Unidos No. 4.933.092.

Automatización

- 50 **[0127]** Los anticuerpos de esta descripción pueden adaptarse fácilmente a analizadores de inmunoquímica automatizados. Para facilitar la automatización de los procedimientos descritos en el presente documento y para reducir el tiempo de renovación, un anticuerpo de captura en un inmunoensayo descrito en el presente documento necesita estar acoplado a partículas magnéticas.
- 55 **[0128]** El anticuerpo se acopla a dichas perlas magnéticas usando tecnología disponible en el mercado como las perlas magnéticas Dynabeads revestidas de IgG anti-conejo de oveja M-280 de Dynal, Inc. [Lake Success, N.Y. (EE. UU.)] y anticuerpo de conejo a una proteína diana, o usando Dynabeads tosilactivadas M-450 de Dynal, Inc. y acoplado covalentemente un anticuerpo relevante a ellas. Como alternativa, podría usarse un agente tal como glutaraldehído para acoplar covalentemente un anticuerpo objeto a un soporte sólido, preferentemente perlas

magnéticas. Los agentes de acoplamiento representativos pueden incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehídos, diazobencenos y hexametilendiaminas.

5 **[0129]** Un sistema automatizado/de inmunoensayo preferido es el sistema de quimioluminiscente automatizado ACS: 180.RTM. (Bayer Corporation; Tarrytown, N.Y. y Medfield, Mass. (EE. UU.); que incluye el sistema ACS: 180 PLUS; el sistema ACS: 180 SE; y el sistema ACS: CENTAUR. RTM.). Para el sistema de inmunoensayo automatizado ACS: 180.RTM., véase Dudley, B. S., J. Clin. Immunoassay, 14 (2): 77 (verano de 1991). El sistema usa marcas quimioluminiscentes como trazadores y partículas paramagnéticas (PMP) como
10 reactivos de fase sólida. El sistema ACS: 180 proporciona ensayos de tipo tanto de unión competitiva como de sándwich, en los que cada una de las etapas están automatizadas. El sistema ACS: 180 usa partículas paramagnéticas de tamaño micrométrico que maximizan el área superficial disponible, y proporcionan un medio de rápida separación magnética de un trazador unido de un trazador no unido sin centrifugado. Los reactivos pueden añadirse simultánea o secuencialmente. Otros marcadores, tales como un marcador enzimático, pueden usarse en
15 lugar de una marca quimioluminiscente, tales como, éster de acridinio. Las señales luminiscentes serían detectadas preferentemente por un luminómetro. Preferentemente usar el sistema de inmunoensayo Immuno 1.TM de Bayer. Otros dispositivos automatizados ejemplares que pueden adaptarse para realizar inmunoensayos que utilizan anticuerpos de la presente descripción, incluyen las patentes de Estados Unidos 5.807.522 y 6.907.722.

20 **[0130]** En otro aspecto, los anticuerpos anti-gripe de la descripción pueden incorporarse en una plataforma de múltiples pocillos automatizada para utilizar procedimientos de inmunoensayo. Los módulos de ensayo de múltiples pocillos (por ejemplo, placas) están adaptados para ensayos basados en luminiscencia química inducida dentro de uno o más pocillos o cámaras de un módulo de ensayo de múltiples pocillos (por ejemplo, los pocillos de una placa de ensayo de múltiples pocillos). Las placas de ensayo de múltiples pocillos pueden incluir varios
25 elementos que incluyen, por ejemplo, la parte superior de una placa, la parte inferior de una placa, pocillos, electrodos de trabajo, contraelectrodos, electrodos de referencia, materiales dieléctricos, superficies de contacto para conexiones eléctricas, agujeros pasantes conductores que conectan eléctricamente los electrodos y las superficies de contacto, adhesivos, reactivos de ensayo, y marcas o etiquetas identificativas. Los pocillos de las placas pueden ser aberturas en la parte superior de la placa; las paredes internas de las aberturas pueden ser las
30 paredes del pocillo. La parte inferior de la placa puede estar fijada a la parte superior de la placa (directamente o con ayuda de otros componentes) y puede servir como la parte inferior del pocillo.

[0131] Los módulos de ensayo de múltiples pocillos (por ejemplo, placas) pueden tener cualquier número de pocillos y/o cámaras de cualquier tamaño o forma, dispuestos en cualquier patrón o configuración, y estar
35 compuestos por diversos materiales diferentes. En un aspecto preferido, las placas de ensayo de múltiples pocillos son placas de múltiples pocillos que usan formatos estándar en la industria para el número, tamaño, forma y configuración de la placa y los pocillos. Los ejemplos de formatos estándar incluyen placas de 96, 384, 1536 y 9600 pocillos, con los pocillos configurados en matrices bidimensionales. Otros formatos incluyen placas de un solo pocillo, dos pocillos, seis pocillos y veinticuatro pocillos y 6144 pocillos. Preferentemente, los pocillos y/o las cámaras
40 tienen al menos un primer electrodo incorporado en su interior, y más preferentemente incluyen al menos un segundo electrodo. De acuerdo con aspectos preferidos, los pocillos y/o las cámaras tienen al menos un electrodo de trabajo incorporado en su interior y, más preferentemente, también incluyen al menos un contraelectrodo. De acuerdo con un aspecto particularmente preferido, los electrodos de trabajo, contraelectrodos y opcionalmente, electrodos de referencia están incorporados en los pocillos y/o las cámaras. Las placas de ensayo son
45 preferentemente planas, pero también pueden ser curvas (no planas).

[0132] Además, uno o más reactivos de ensayo pueden estar incluidos en los pocillos, cámaras y/o dominios de ensayo de un módulo de ensayo (por ejemplo, en los pocillos de una placa de ensayo de múltiples pocillos). Por ejemplo, reactivos de ensayo que incluyen anticuerpos para diferentes virus de la gripe o diferentes epítomos de un
50 polipéptido de virus de la gripe pueden utilizarse en diferentes regiones de las una o más placas de micro-valoración. Estos reactivos de ensayo pueden estar inmovilizados o colocados sobre una o más superficies de pocillos y/o cámaras (preferentemente sobre la superficie de un electrodo, de la manera más preferente un electrodo de trabajo) y pueden estar inmovilizados o colocados en uno o más dominios de ensayo (por ejemplo reactivos en matrices modeladas se inmovilizan sobre una o más superficies de un pocillo y/o cámara, preferentemente sobre las
55 superficies de electrodos de trabajo y/o contraelectrodos, de la manera más preferente sobre superficies de un electrodo de trabajo). Los reactivos de ensayo también pueden estar contenidos o localizados dentro de un pocillo y/o cámara por su perfil. Por ejemplo, materiales dieléctricos modelados pueden confinar o localizar fluidos.

[0133] En un aspecto, un aparato de la descripción puede usarse para inducir y medir luminiscencia en

módulos de ensayo, preferentemente en placas de ensayo de múltiples pocillos. Éste puede incorporar, por ejemplo, uno o más fotodetectores; un recinto estanco a la luz; conectores eléctricos para poner en contacto los módulos de ensayo; mecanismos para transportar módulos de ensayo de múltiples pocillos dentro y fuera del aparato (y en particular, dentro y fuera de los recintos estancos a la luz); mecanismos para alinear y orientar módulos de ensayo de múltiples pocillos con el uno o más fotodetectores y con contactos eléctricos; mecanismos para rastrear e identificar módulos (por ejemplo uno o más lectores de código de barras (por ejemplo, un lector de código de barras para leer un lado de una placa o módulo y otro para leer otro lado de la placa o módulo); uno o más sensores de orientación; mecanismos que establecen conexiones eléctricas con módulos, una o más fuentes de energía eléctrica para inducir luminiscencia en los módulos; y componentes electrónicos y software apropiados.

10

[0134] El aparato también puede incluir mecanismos para almacenar, apilar, mover y/o distribuir uno o más módulos de ensayo (por ejemplo apiladores de placas de múltiples pocillos). El aparato puede usar ventajosamente matrices de fotodetectores (por ejemplo matrices de fotodiodos) o fotodetectores de generación de imágenes (por ejemplo, cámaras CCD) para medir la luminiscencia. Estos detectores permiten al aparato medir la luz procedente de múltiples pocillos (y/o cámaras) simultáneamente y/o generar una imagen de la intensidad y la distribución espacial de la luz emitida desde un pocillo (y/o cámara) individual.

15

[0135] Preferentemente, el aparato puede medir la luz procedente de uno o más sectores de un módulo de ensayo, un módulo de ensayo preferido es una placa de ensayo de múltiples pocillos. En algunos aspectos, un sector comprende un grupo de pocillos (y/o cámaras) numerados entre y un número menor que el número total de pocillos (y/o cámaras) en el módulo de ensayo (por ejemplo una fila, columna, o sub-matriz bidimensional de pocillos en una placa de múltiples pocillos). En un aspecto preferido, un sector comprende entre el 4 por ciento y el 50 por ciento de los pocillos de una placa de múltiples pocillos. En un aspecto especialmente preferido, las placas de ensayo de múltiples pocillos se dividen en sectores columnares (teniendo cada sector una fila o columna de pocillos) o sectores cuadrados (por ejemplo, una placa de múltiples pocillos de tamaño estándar se divide en seis sectores cuadrados de igual tamaño). En algunos aspectos, un sector comprende uno o más pocillos con más de una región de contención de fluido dentro de los pocillos. El aparato, preferentemente, puede inducir secuencialmente ECL y/o medir ECL a partir de los sectores en un módulo dado (preferentemente placa).

20

25

30

[0136] El aparato también puede incorporar microprocesadores y ordenadores para controlar ciertas funciones dentro del instrumento y para ayudar al almacenamiento, análisis y presentación de datos. Estos microprocesadores y ordenadores pueden residir en el aparato, o pueden residir en ubicaciones remotas que están conectadas con el aparato (por ejemplo, a través de conexiones en red).

35 Membranas/superficies

[0137] En diversos aspectos descritos en el presente documento, los dispositivos que incorporan antígenos del virus de la gripe o anticuerpos anti-virus de la gripe comprenden una superficie o membrana. Diversas superficies o membranas pueden proporcionar una superficie para diversos dispositivos de inmunoensayo convencionales, sobre la cual se inmoviliza o se dispone un anticuerpo o antígeno. Por lo tanto, las membranas pueden proporcionar regiones que comprenden regiones de ensayo así como de control que utilizan inmunorreactivos que permiten la visualización del resultado de un ensayo (por ejemplo, si una muestra contiene uno o más virus). En diversos aspectos, membranas que tienen antígenos del virus de la gripe o anticuerpos anti-virus de la gripe dispuestos sobre ellas están dispuestas, a su vez, sobre un sustrato sólido (por ejemplo, dispositivo de flujo lateral o de tira reactiva).

40

45

[0138] La membrana o superficie a la que un antígeno/anticuerpo puede estar fijado se compone de un material que incluye, aunque sin limitarse a, celulosa, nitrocelulosa, nylon, nylon cationizado que porta una carga amino cuaternaria (sonda Zeta), papel de aminofeniltioéter (APT) que se convierte en DPT, el derivado diazo (éste no puede teñirse cuando se usa con marcas detectables por enzimas) o difluoruro de polivinilideno hidrófilo (PVDF) (disponible de Millipore, Billerica, Mass.). El término "nitrocelulosa" se refiere a cualquier éster de ácido nítrico de celulosa. Por lo tanto, los materiales adecuados pueden incluir nitrocelulosa en combinación con ésteres de ácido carboxílico de celulosa. El tamaño de poro de las membranas de nitrocelulosa puede variar ampliamente, pero frecuentemente está dentro de aproximadamente 5 a 20 micrómetros, preferentemente aproximadamente 8 a 15 micrómetros. Sin embargo, puede ser esperado por los expertos en la materia que otros materiales bien conocidos también puedan usarse. En algunos aspectos, la región de ensayo comprende un conjunto de banda de nitrocelulosa hechas de rollo de nitrocelulosa de Millipore laminado a un sustrato de Mylar transparente. En otro aspecto, la región que comprende antígenos/anticuerpo (o "región de ensayo") está hecho de nylon. En otro aspecto, la región de ensayo está compuesta por partículas que pueden inmovilizar el látex u otras partículas que pueden portar otro reactivo capaz de unirse específicamente a un analito, definiendo de este modo una zona de ensayo, por

50

55

ejemplo, polvo de nylon comprimido, o fibra de vidrio. En algunos aspectos, la región de ensayo está compuesta por un material que es opaco cuando está en estado seco, y transparente cuando está en un estado humedecido.

Zonas de ensayo y de control

5

[0139] Los dispositivos pueden incluir membranas/superficies que comprenden zonas de ensayo y de control. La región de ensayo puede estar construida de cualquiera de los materiales que se han enumerado anteriormente. A menudo, las zonas de ensayo y de control pueden definir los componentes de la región de ensayo. En un aspecto, las zonas de ensayo y de control están compuestas por el mismo material que la región de ensayo. Frecuentemente, la expresión "región de ensayo" se utiliza en el presente documento para explicar una región en/sobre un dispositivo que comprende al menos una zona de ensayo y de control. En algunos aspectos, el dispositivo utiliza un material absorbente pero en algunos aspectos para proporcionar flujo no absorbente, es necesario tratar estos materiales con agentes bloqueantes que puedan bloquear las fuerzas que justifican la naturaleza absorbente de las membranas absorbente. Los agentes de bloqueo adecuados incluyen albúmina de suero bovino, albúmina de suero bovino metilada, suero animal completo, caseína, y leche deshidratada desnatada, una serie de detergentes y polímeros, por ejemplo, PEG, PVA y similares. En algunos aspectos, los sitios de interferencia en las membranas absorbentes no tratadas están completamente bloqueados debido a la presencia del agente bloqueante para permitir que el flujo no absorbente pase a su través. Tal como se indica en el presente documento, el dispositivo de ensayo es un dispositivo con múltiples zonas de ensayo y de control.

20

[0140] La región de ensayo generalmente incluye una o más zonas de control, esto es muy útil para verificar si el flujo de muestra es como se espera. Cada una de las zonas de control comprende una región espacialmente distinta que a menudo incluye un miembro inmovilizado de un par de unión específico que puede reaccionar con un reactivo de control marcado. En algunos aspectos, la zona de control procedimental contiene una auténtica muestra del analito de interés, o un fragmento del mismo. En este aspecto, se utiliza un tipo de reactivo marcado, en el que la muestra de fluido porta el reactivo marcado a las zonas de ensayo y de control; y el reactivo marcado no unido a un analito de interés se unirá a continuación a la auténtica muestra del analito de interés situada en la zona de control. En otro aspecto, la línea de control contiene anticuerpo que es específico para el reactivo marcado, o se proporciona para reactivo marcado inmovilizado. En funcionamiento, un reactivo marcado está restringido en cada una de las una o más zonas de control, incluso cuando alguno o todos de los análisis de interés están ausentes de la muestra de ensayo.

30

[0141] En algunos aspectos, los soportes sólidos comprenden regiones modeladas que comprenden áreas matriciales de unión a antígeno/anticuerpo, que pueden estar diseñadas en cualquier forma deseada (por ejemplo, cuadrado, óvalo, círculo, líneas verticales u horizontales). Por ejemplo, las áreas matriciales de unión al antígeno se disponen sobre una tira reactiva de soporte sólido que puede estar hecha de materiales tales como plástico o Mylar. Es posible detectar múltiples subtipos de anticuerpo anti-AIV H5 en un único ensayo a través de la incorporación de múltiples cuadrados matriciales que contienen, cada uno, diferentes antígenos específicos en diversas posiciones en una única tira de ensayo, o en una única tira reactiva de soporte en fase sólida.

40

[0142] En diversos aspectos, un dispositivo que comprende anticuerpos de la descripción y se utiliza en un inmunoensayo puede estar incluido en un kit. El kit contiene los reactivos necesarios para la utilización en inmunoensayo de formato particular. El kit contiene una tira reactiva y reactivos diferentes utilizados con ésta, un dispositivo de flujo lateral en el que están inmovilizados los anticuerpos necesarios para el ensayo de múltiples subtipos de gripe, o cualquier dispositivo convencional con los reactivos necesarios. Por ejemplo, a través de un proceso de sumergir frecuentemente la tira reactiva a través de la serie de reactivos proporcionados en el kit, la presencia o ausencia de anti-subtipo de virus de la gripe particular (por ejemplo, anticuerpo para AIV H5) o antígeno del virus de la gripe (por ejemplo, antígeno H5) en una muestra puede evaluarse de forma sencilla y rápida. Dichos kits serían adecuados para uso por expertos y profesionales. Usar el kit descrito en el presente documento puede permitir el rápido diagnóstico serológico del virus de la gripe (por ejemplo, AIV) obtenido de fluidos corporales tales como sangre, orina, esputo, semen, heces, saliva, bilis, líquido cerebral, frotis nasal, frotis urogenital, aspirado nasal, líquido cefalorraquídeo, etc.

50

[0143] En otro aspecto, una tira reactiva de soporte en fase sólida o dispositivo de flujo lateral se coloca en un tubo de ensayo o receptáculo similar al que se añade la muestra de espécimen del paciente o animal que se sospecha que está infectado con virus de la gripe (por ejemplo, AIV). La muestra de espécimen reacciona con antígenos/anticuerpos unidos sobre la tira reactiva. La tira reactiva se retira a continuación y se lava suavemente. La tira reactiva de soporte en fase sólida se retira de la solución de lavado y se coloca en otro tubo que contiene inmunoglobulina purificada por afinidad, altamente diluida, que es específica de la especie de la que se obtuvo la

55

muestra, y puede conjugarse a fosfatasa alcalina u otras enzimas adecuadas. La tira reactiva se retira a continuación de la segunda solución de anticuerpo y se coloca en un recipiente de solución de lavado. Tras la retirada de la solución de lavado, la tira reactiva se coloca en un tubo final de solución cromógena premezclada u otra solución de sustrato adecuada. Una reacción positiva puede evaluarse mediante simple comparación visual del control (línea superior) con la línea positiva (línea inferior). Si la línea positiva es más oscura que el control, entonces el resultado del ensayo es positivo. Las enzimas que están unidas covalentemente a la inmunoglobulina purificada por afinidad reaccionan con sustratos que producen un producto de reacción de color al final de la reacción enzima-sustrato. De esta manera, la presencia de inmunoglobulina purificada por afinidad unida puede detectarse fácilmente, indicando de este modo la presencia de anticuerpos en la muestra de espécimen que son específicos para virus de la gripe (por ejemplo, anticuerpo para H5). La tecnología incorpora las técnicas de ELISA conocidas, tal como se describe también en el presente documento.

[0144] Debe entenderse que técnicas de selección de enzimas y sustratos apropiados y las condiciones de reacción apropiadas son conocidas por un experto en la materia. Estas enzimas permanecen activas después de haber sido conjugadas a moléculas de inmunoglobulina. Cada reacción química de par enzima-sustrato genera un producto teñido. Además, existen múltiples maneras alternativas de emparejamiento en las que la enzima y el sustrato pueden conjugarse ambas con la inmunoglobulina purificada por afinidad pero la enzima y el sustrato solamente reaccionan para formar el producto de reacción teñido después de que la inmunoglobulina purificada por afinidad se ha unido al anticuerpo de espécimen.

[0145] Por supuesto, utilizando diferentes anticuerpos/antígenos, una muestra puede cribarse fácilmente para un panel de diferentes tipos o subtipos de virus. Un experto en la materia debe entender que es necesario ensayar diversos paneles mediante los inmunoensayos descritos en el presente documento. Véase CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (Coligan, John E. et. al., eds. 1999).

Matrices

[0146] Los anticuerpos de la presente descripción pueden adaptarse fácilmente para uso en dispositivos adaptados para procedimientos rápidos de detección de analitos, incluyendo detección de una o más proteínas del virus de la gripe (por ejemplo, H5) o de uno o más anticuerpos anti-virus de la gripe en una muestra. En dichos procedimientos, los anticuerpos pueden presentarse en un formato de matriz (*array*) que contiene otros anticuerpos, que se dirigen a múltiples virus diferentes tales como otros subtipos de gripe (por ejemplo, AIV). En otros aspectos, los anticuerpos pueden dirigirse al mismo antígeno o unirse específicamente a un epítipo diferente en un polipéptido dado.

[0147] En un aspecto adicional de la presente descripción, la matriz de anticuerpos comprende un sustrato, y una pluralidad de parches dispuestos en regiones discretas conocidas en las partes de la superficie del sustrato en las que (i) cada parche comprende anticuerpos inmovilizados sobre el sustrato, en el que dichos anticuerpos de un parche dado son capaces de unirse a un producto de expresión viral particular, fragmento del mismo, o proteína huésped, tal como un anticuerpo anti-viral y (ii) la matriz comprende una pluralidad de diferentes anticuerpos, cada uno de los cuales es capaz de unirse a un producto de expresión viral diferente, fragmento del mismo, o proteína huésped, tal como un anticuerpo anti-viral.

[0148] Los anticuerpos están preferentemente inmovilizados covalentemente sobre los parches de la matriz, directa o indirectamente. En la mayoría de los casos, la matriz comprende al menos diez parches. En un aspecto preferido, la matriz comprende al menos 50 parches. En un aspecto particularmente preferido, la matriz comprende al menos 100 parches. En un aspecto preferido alternativo, la matriz de anticuerpos puede comprender más de 10^3 , 10^4 o 10^5 parches.

[0149] El área de superficie del sustrato cubierta por cada uno de los parches es preferentemente no más de $0,25 \text{ mm}^2$. Preferentemente, el área de la superficie de sustrato cubierta por cada uno de los parches está entre $1 \text{ }\mu\text{m}^2$ y $1000 \text{ }\mu\text{m}^2$. En un aspecto particularmente preferido, cada parche cubre un área de la superficie de sustrato de $1 \text{ }\mu\text{m}^2$ a $2.500 \text{ }\mu\text{m}^2$. En un aspecto alternativo, un parche en la matriz puede cubrir un área de la superficie de sustrato de tan solo 2.500 nm^2 , aunque parches de un tamaño así de pequeño generalmente no son necesarios en el uso de la matriz.

[0150] Los parches de la matriz pueden ser de cualquier forma geométrica. Por ejemplo, los parches pueden ser rectangulares o circulares. Los parches de la matriz también pueden ser de formas irregulares. Los parches también pueden estar elevados opcionalmente desde el plano mediano del sustrato subyacente.

[0151] La distancia que separa los parches de la matriz puede variar. Preferentemente, la distancia entre parches adyacentes en la matriz es de aproximadamente 1 μm a 500 μm . Normalmente, la distancia que separa los parches es aproximadamente proporcional al diámetro o la longitud lateral de los parches en la matriz si los parches 5 tiene diámetros mayores de 10 μm . Si el tamaño del parche es relativamente pequeño, entonces la distancia que separa los parches es generalmente mayor que los diámetros del parche.

[0152] En particular, todos los parches de la matriz pueden estar contenidos dentro de un área de aproximadamente 1 cm^2 o menos sobre la superficie del sustrato. En una matriz preferida, por lo tanto, la matriz 10 comprende 100 o más parches dentro de un área total de aproximadamente 1 cm^2 o menos sobre la superficie del sustrato. Como alternativa, una matriz particularmente preferida comprende 10^3 o más parches dentro de un área total de aproximadamente 1 cm^2 o menos. Una matriz preferida puede comprender incluso opcionalmente 10^4 o 10^5 o más parches dentro de un área de aproximadamente 1 cm^2 o menos sobre la superficie del sustrato. En otros 15 aspectos, todos los parches de la matriz están contenidos dentro un área de aproximadamente 1 mm^2 o menos sobre la superficie del sustrato.

[0153] Normalmente, solamente un anticuerpo está presente en un único parche de la matriz. Si más de un anticuerpo está presente en un único parche, entonces todos los anticuerpos en ese parche deben compartir un socio de unión común. Por ejemplo, un parche puede comprender diversos anticuerpos para la proteína viral de la gripe 20 (aunque, potencialmente, los anticuerpos pueden unirse a diferentes epítomos en un virus de la gripe dado). En aspectos preferidos, la proteína/antígeno viral de la gripe es H5 y el virus de la gripe es AIV.

[0154] Las matrices pueden tener cualquier número de diferentes anticuerpos. Normalmente, la matriz comprende al menos diez anticuerpos diferentes. Preferentemente, la matriz comprende al menos 50 anticuerpos 25 diferentes. Más preferentemente, la matriz comprende al menos 100 anticuerpos. Matrices preferidas alternativas comprenden más de 10^3 anticuerpos diferentes o más de 10^4 anticuerpos diferentes. La matriz puede comprender incluso opcionalmente más de 10^5 anticuerpos diferentes.

[0155] Cada uno de los parches de la matriz puede comprender un anticuerpo diferente. Por ejemplo, una 30 matriz que comprende aproximadamente 100 parches podría comprender aproximadamente 100 anticuerpos diferentes. Del mismo modo, una matriz de aproximadamente 10.000 parches podría comprender aproximadamente 10.000 anticuerpos diferentes. En un aspecto alternativo, sin embargo, cada anticuerpo diferente está inmovilizado sobre más de un parche independiente en la matriz. Por ejemplo, cada anticuerpo diferente puede estar presente 35 opcionalmente en de dos a seis parches diferentes. Una matriz, por lo tanto, puede comprender aproximadamente tres mil parches de anticuerpo, pero solamente comprenden aproximadamente mil anticuerpos diferentes, dado que cada anticuerpo diferente está presente en tres parches diferentes.

[0156] Normalmente, el número de diferentes proteínas a las que pueden unirse la pluralidad de anticuerpos diferentes en la matriz es al menos diez. Sin embargo, se prefiere que la pluralidad de anticuerpos diferentes en la 40 matriz sea capaz de unirse a un gran número de diferentes proteínas, tales como al menos aproximadamente 50 o al menos aproximadamente 100. Más preferentemente, la pluralidad de anticuerpos diferentes en la matriz es capaz de unirse a al menos aproximadamente 10^3 proteínas.

[0157] El uso de las matrices de anticuerpos puede implicar opcionalmente colocar la matriz bidimensional en 45 una cámara de flujo con aproximadamente 1-10 μl de volumen de fluido por 25 mm^2 de área superficial global. La cubierta sobre la matriz en la cámara de flujo puede ser transparente o translúcida. La cubierta puede comprender Pyrex o vidrio de cuarzo. La cubierta también puede ser parte de un sistema de detección que monitoriza la interacción entre los anticuerpos inmovilizados sobre la matriz y la proteína en una solución tal como un extracto celular. Las cámaras de flujo debe permanecer llena con soluciones acuosas apropiadas para preservar anticuerpo. 50 La sal, la temperatura, y otras condiciones se mantienen preferentemente similares a las de condiciones fisiológicas normales. Las muestras en una solución de fluido pueden mezclarse en la cámara de flujo para interactuar de forma segura con los anticuerpos inmovilizados. Se debe dar suficiente tiempo para permitir que la unión entre los anticuerpos y sus socios de unión se produzca. La cantidad de tiempo requerida para esto depende de la afinidad de los anticuerpos por sus socios de unión. No se requieren bombas, válvulas o técnicas de mezcla microfluidicas 55 especializadas para el suministro de fluido a la matriz.

Medios de detección

[0158] Tal como es aplicable a cualquier dispositivo que utiliza anticuerpos de la presente descripción, una

amplia gama de componentes de detección están disponibles para detectar la presencia de socios de unión. La detección puede ser cuantitativa o cualitativa. La matriz puede tener una interfaz con procedimientos de detección óptica tales como absorción en el intervalo visible o ultravioleta, quimioluminiscencia, y fluorescencia (incluyendo vida útil, polarización, espectroscopía de correlación por fluorescencia FCS), y transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET)). Además, otros modos de detección tales como los basados en guías de onda ópticas, véase la publicación PCT (WO 96/26432 y patente de Estados Unidos No. 5.677.196), resonancia del plasmón superficial, sensores de cambio superficial, y sensores de fuerza superficial son compatibles con muchos aspectos de la descripción. Como alternativa, técnicas tales como las basadas en microscopía de ángulo de Brewster (BAM) (Schaaf y col., Langmuir, 3: 1131-1135 (1987)) y elipsometría (patentes de Estados Unidos No. 5.141.311 y 5.116.121; Kim, Macromolecules, 22: 2682-2685 (1984)) podrían aplicarse. Microbalanzas de cristal de cuarzo y procesos de desorción (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.719.060) también proporcionan otros medios de detección alternativos adecuados para algunos aspectos de la matriz. Un sistema biosensor óptico compatible tanto con algunas matrices de la presente descripción como diversos procedimientos de detección sin marca tales como resonancia del plasmón superficial, fluorescencia de reflexión total interna (TIRF), microscopía de ángulo de Brewster, espectroscopía en modo de luz de guía de onda (OWLS) puede encontrarse en la patente de Estados Unidos No. 5.313.264 .

[0159] Los dispositivos que incorporan los anticuerpos de la descripción pueden incorporarse en un sistema que incluye un lector, particularmente un lector incorporado en un ordenador, tal como un lector basado en reflectancia y/o fluorescencia, y software de procesamiento de datos que emplea algoritmos de reducción de datos y ajuste de curva, preferentemente en combinación con una red neuronal entrenada para determinar con precisión la presencia y concentración de analito en una muestra biológica. Tal como se usa en el presente documento, un lector se refiere a un instrumento para detectar y/o cuantificar datos, tales como en tiras de ensayo incluidas en un dispositivo de ensayo que utiliza anticuerpos de la presente descripción. Los datos serán visibles a simple vista, pero no es necesario que lo sean. Los procedimientos incluyen las etapas de realizar un inmunoensayo en una muestra del paciente, leer los datos usando un lector basado en reflectancia y/o fluorescencia y procesar los datos resultantes usando software de procesamiento de datos que emplea reducción de datos. El software preferido incluye algoritmos de ajuste de curva, opcionalmente en combinación con una red neuronal entrenada, para determinar la presencia y concentración de analito en una muestra dada. Los datos obtenidos del lector pueden procesarse a continuación adicionalmente mediante el sistema de diagnóstico médico que procesa y emite datos para proporcionar una evaluación del riesgo o un diagnóstico de una afección médica. Como alternativa, los datos de salida pueden usarse como entrada en un sistema de soporte de decisión posterior, tal como una red neuronal, que puede estar entrenada para evaluar dichos datos.

[0160] El lector puede ser un lector de reflectancia, transmisión, fluorescencia, quimio-bioluminiscencia, magnético o de amperometría (o combinaciones de dos o más), dependiendo de la señal que se va a detectar desde el dispositivo. Además, algunos de los procedimientos de detección usados habitualmente para inmunoensayos tradicionales que requieren el uso de marcas pueden aplicarse a las matrices descritas en el presente documento. Estas técnicas incluyen inmunoensayos no competitivos, inmunoensayos competitivos, marca doble, inmunoensayos radiométricos. Estas técnicas particulares son adecuadas principalmente para uso con las matrices de anticuerpos cuando el número de anticuerpos diferentes con diferente especificidad es pequeño (aproximadamente menos de 100). En el procedimiento competitivo, la ocupación del sitio de unión se determina indirectamente. En este procedimiento, los anticuerpos de la matriz están expuestos en un agente de desarrollo marcado, que es generalmente un analito marcado o un análogo de analito. El agente de desarrollo compite por los sitios de unión en los anticuerpos con el analito. La unión del agente de desarrollo a los anticuerpos de los parches individuales puede formar una pequeña fracción de ocupación de los anticuerpos en diferentes parches.

[0161] En el procedimiento no competitivo, la ocupación del sitio de unión se determina directamente. En este procedimiento, los parches de la matriz están expuestos en un agente de desarrollo marcado capaz de unirse al analito unido o los sitios de unión ocupados en el agente de captura de proteínas. Por ejemplo, el agente de desarrollo puede ser un anticuerpo marcado dirigido contra sitios ocupados (es decir, un "ensayo en sándwich"). Como alternativa, una marca doble, el enfoque radiométrico se toma donde el anticuerpo está marcado con una marca y el agente de desarrollo está marcado con una segunda marca (Ekins, y col., Clinica Chimica Acta., 194: 91-114, 1990). Pueden usarse muchos procedimientos de marcado diferentes en las técnicas mencionadas anteriormente, incluyendo procedimientos radioisotópicos, enzimáticos, quimioluminiscentes, y fluorescentes. En algunos aspectos, se prefieren procedimientos de detección fluorescentes. Los procedimientos de detección incluyen, aunque sin limitarse a, cambios de color, absorción de la luz, o transmisión de la luz, pH, conductividad, fluorescencia, cambio de fase física o similar.

[0162] Las muestras de ensayo proporcionarán un componente detectable del sistema de detección, o dichos componentes pueden añadirse. Los componentes variarán ampliamente dependiendo de la naturaleza del sistema de detección. Un procedimiento de detección de este tipo implica el uso de partículas, donde partículas proporcionan dispersión de luz o un cambio en la velocidad de flujo. Las partículas pueden ser, aunque sin limitarse a, células, 5 partículas poliméricas que son inmiscibles con un sistema líquido, partículas de látex, partículas de cerámica, partículas de ácido nucleico, partículas aglutinadas o similares. La elección de partículas dependerá del procedimiento de detección, la dispersabilidad o la estabilidad de la dispersión, inercia, participación en el cambio de flujo, o similares. La unión de un analito a un miembro de unión específico en el sitio de captura puede detectarse opcionalmente a través de la presión de la muestra de ensayo en el dispositivo. Por ejemplo, un detector de presión 10 conectado a la muestra de ensayo que entra y sale del canal permitirá la detección de descensos de presión causadas por la unión al analito, que da como resultado la ralentización del flujo del canal.

[0163] Por ejemplo, para cuantificar la cantidad de marca detectable presente (por ejemplo, anticuerpo-conjugado), y la cantidad de antígeno presente, pueden usarse el procedimiento y el aparato de Hazelgrove y col., 15 (véase Anal. Biochem 150: 449-456, 1985). Este procedimiento se basa en una cámara de TV conectada a un ordenador. Las marcas se visualizan en una caja luminiscente de la que se obtienen imágenes mediante la cámara de TV, y digitalizadas con una placa de digitalización (Techmar, Inc.). Después de la digitalización, el ordenador leerá la posición, anchura, altura y área relativa de cada marca. También se usan mediciones de densidad óptica (DO) para medir las concentraciones de proteína absoluta. 20

[0164] En otro aspecto, un dispositivo que incorpora un ensayo Dot-ELISA se usa para detectar una proteína diana directamente a partir de cualquier muestra. Por lo tanto, pueden utilizarse anticuerpos de la presente descripción en un proceso que comprende las siguientes etapas:

- 25 (a) proporcionar un soporte sólido para realizar un ensayo del anticuerpo monoclonal;
 (b) aplicar al soporte sólido una muestra que se sospecha que contiene un virus de la gripe;
 (c) aplicar al soporte sólido una solución que contiene un ácido orgánico, tal como ácido cítrico o láctico;
 (d) aplicar al soporte sólido una solución que contiene un agente mucolítico y un detergente;
 (e) poner en contacto el soporte sólido con un MAb primario, MAb quimérico, una variante o fragmento del mismo
 30 durante un tiempo suficiente para permitir que el MAb, MAb quimérico, variante o fragmento y una proteína de AIV H5 se unan entre sí para formar un MAb primario unido al antígeno;
 (f) poner en contacto lo anterior con un conjugado anti-MAb marcado con enzima durante un tiempo suficiente para facilitar la unión del MAb unido al antígeno al conjugado; y
 (g) aplicar un reactivo de color al soporte sólido, en el que el reactivo de color es catalizado por la enzima para
 35 desarrollar un marcado de color que permita la detección visual de la presencia de una proteína de AIV H5 en la muestra.

[0165] Un procedimiento Dot-ELISA se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0246429.

40 **[0166]** En algunos aspectos, puede utilizarse un dispositivo o kit en el campo del ámbito de la atención sanitaria, donde un sistema de detección cromógeno, tal como un sistema que emplea fosfatasa alcalina. Por ejemplo, viales independientes que comprenden conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina en tampón, nitroazul tetrazolio (NBT), o fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP), que están diseñados para usarlos en secuencia para alcanzar el color deseado pueden suministrarse como componentes de un kit. Con los sistemas de detección 45 cromógenos, los resultados pueden visualizarse a simple vista con ayuda de cualquier equipo. Un dispositivo puede utilizar fosfatasa alcalina para cuantificar la cantidad de AIV presente. Dicho dispositivo que comprende fosfatasa alcalina puede proporcionar resultados cuantitativos precisos cuando se usan junto con un densitómetro.

[0167] Un kit para la detección de una proteína de AIV H5 o un anticuerpo anti-AIV del subtipo H5, puede 50 comprender una marca detectable tal como conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina unido sobre él; un reactivo que comprende NBT o fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP); y un estándar de referencia.

[0168] La muestra de ensayo puede suministrarse desde una fuente tal como, aunque sin limitarse a, una fuente fisiológica. Las muestras de ensayo que pueden administrarse a dispositivos incluyen muestras que se 55 sospecha que contienen un antígeno o anticuerpo, que puede obtenerse a partir de un animal no humano o un sujeto humano, e incluyen, aunque sin limitarse a, fluidos fisiológicos tales como sangre, suero, plasma, saliva, fluido de lentes oculares, líquido cefalorraquídeo, pus, exudado, leche, sudor, lágrimas, flujo auditivo, esputo, linfa, orina, excrementos, secreción de las cavidades bucal o nasal, tejidos tales como pulmón, bazo e hígados, el líquido del virus completo o el virus lítico de cultivo de embrión de pollo, y otras muestras que se sospecha que contienen una

proteína de virus de la gripe o anticuerpos anti-virus de la gripe que son solubles o pueden suspenderse en un fluido adecuado. La muestra de ensayo puede someterse a tratamiento anterior tal como, extracción, adición, separación, dilución, concentración, filtración, destilación, diálisis o similares. Además de los fluidos fisiológicos, pueden emplearse otras muestras de ensayo líquidas y los componentes de interés puede ser líquidos o sólidos siempre que los sólidos estén disueltos o suspendidos en un medio líquido. En un aspecto, una muestra se toma de la cavidad nasal. Los dispositivos a menudo contienen una superficie a la que pueden fijarse uno o más antígenos o anticuerpos.

PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

10

[0169] La presente solicitud describe un procedimiento de prevención o tratamiento de pacientes infectados con virus asociados con el virus de la gripe aviar en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos monoclonales de la presente descripción. La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos monoclonales de la presente invención o una sal farmacéutica de los mismos. La invención se refiere además a un anticuerpo monoclonal de la invención para uso para prevenir y tratar una infección por virus de la gripe aviar.

15

[0170] La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse a un sujeto a través de vías de administración convencionales, que incluyen sin limitación, las vías oral, bucal, sublingual, ocular, tópica, parenteral, rectal, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intravesical, local (por ejemplo, en polvo, pomada o gotas) o nasal.

20

[0171] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección ex-intestinal y ex-estomacal pueden comprender soluciones acuosas o no acuosas, dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles farmacéuticamente aceptables, y polvos estériles para reconstitución extemporánea en soluciones o dispersiones inyectables. Por ejemplo, portadores, vehículos acuosos y no acuosos adecuados y diversos diluyentes tales como agua, etanol, polioles (tales como propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva), y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento de lecitina. El tamaño de partícula apropiado se mantiene, por ejemplo, mediante el uso de dispersiones y tensioactivos.

25

30

[0172] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además adyuvantes, tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y agentes dispersantes. Para impedir la contaminación por microorganismos, las composiciones pueden comprender también componentes instantáneos tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede comprender agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio, y similares. La absorción prolongada de composiciones farmacéuticas inyectables puede conseguirse mediante el uso de agentes capaces de retrasar la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina y similares.

35

40

[0173] Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, polvos, y gránulos, etc. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente (o vehículo) farmacéutico inerte convencional, tal como citrato sódico o fosfato dicálcico, o (a) cargas o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, manitol y ácido silícico; (b) aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga; (c) humectantes, tales como glicerol; (d) agentes disgregantes, tales como agar, carbonato de calcio, polvo de patata o tapioca; (e) retardantes de la solución, tales como parafina; (f) acelerantes de la absorción, tales como mezclas de amonio cuaternario; (g) agentes humectantes, tales como alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (h) adsorbentes, tales como caolín y bentonita; (i) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, o mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas y comprimidos, también pueden estar incluidos los agentes tampón.

45

50

[0174] Las formas de dosificación sólidas pueden formularse como formas de dosificación de liberación mejorada y liberación pulsátil que contienen excipientes, tales como los detallados anteriormente, para formas de dosificación de liberación inmediata junto con excipientes adicionales que actúan como modificadores de la velocidad de liberación, estando estos aplicados como un revestimiento o incluidos en las formas de dosificación. Los modificadores de la velocidad de liberación incluyen hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa, acetato de celulosa, óxido de polietileno, goma xantana, copolímero de metacrilato de amonio, aceite de ricino hidrogenado, cera de carnauba, cera de parafina, acetato ftalato de celulosa,

55

ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímero de ácido metacrílico y sus mezclas. Las formas de dosificación de liberación mejorada y liberación pulsátil pueden contener uno o una combinación de excipientes que mejoran la velocidad de liberación.

5 **[0175]** Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender además formulaciones de dosificación de dispersión o disolución rápida (FDDF) que contienen los siguientes ingredientes: aspartamo, acesulfamo de potasio, ácido cítrico, croscarmelosa sódica, crospovidona, ácido diascórbico, acrilato de etilo, etilcelulosa, gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, metacrilato de metilo, aroma de menta, polietilenglicol, sílice ahumada, dióxido de silicio, almidón glicolato sódico, estearil fumarato sódico,
10 sorbitol y xilitol. Los términos dispersión o disolución, tal como se usan en el presente documento para describir las FDDF dependen de la solubilidad del principio activo usado es decir, donde el principio activo es insoluble, puede prepararse una forma de dosificación de dispersión rápida, y donde el principio activo es soluble, puede prepararse una forma de dosificación de disolución rápida.

15 **[0176]** También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas de gelatina blanda o dura usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, u otros polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.

[0177] Pueden prepararse formas de dosificación sólidas tales como comprimidos, grageas, cápsulas y
20 gránulos con revestimientos y envueltas, tales como revestimientos entéricos y otros bien conocidos por un experto en la materia. Estos también pueden comprender agentes opacificantes, y también pueden ser de composición similar que liberen el uno o más compuestos activos de manera retardada, sostenida o controlada. Las composiciones que pueden emplearse para inclusión son sustancias poliméricas y ceras etc. El uno o más compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada, si fuera apropiado, con uno o más de los
25 excipientes mencionados anteriormente.

[0178] Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables, etc. Además de los compuestos activos, la forma de dosificación líquida puede contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como agua u otros
30 disolventes, agentes emulsionantes y solubles, como por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites, en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino, y aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de estas sustancias, y similares.

35 **[0179]** Además de dichos diluyentes inertes, la composición farmacéutica también puede incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, aromatizantes y agentes perfumantes. La composición farmacéutica puede incluir además agentes de suspensión, tales como alcoholes etoxilados de isoestearilo, sorbitol de polioxietileno y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de
40 aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias, y similares.

[0180] La composición farmacéutica de la presente invención también se prepara como una mezcla, una sal veterinariamente aceptable de la misma, o un solvato o profármaco veterinariamente aceptable de la misma para tratamientos en uso veterinario. Y se prepara como una formulación adecuada con el régimen de dosificación y la
45 vía de administración más apropiada para un animal en particular, de acuerdo con la práctica veterinaria normal y el practicante veterinario.

[0181] Uno o más anticuerpos monoclonales de esta descripción pueden usarse en combinación con otros agentes anti-virales para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades asociadas con la infección por virus de la
50 gripe aviar H5. Los anticuerpos monoclonales pueden administrarse simultáneamente, por separado o secuencialmente con los otros agentes antivirales. Otros agentes antivirales incluyen sin limitación ribavirina, amantadina, hidroxiourea, IL-2, IL-12 y pentafusida

[0182] PROCEDIMIENTOS DE CRIBADO DE PÉPTIDOS Y PÉPTIDOS RECONOCIDOS POR LOS
55 ANTICUERPOS Y LAS VACUNAS

[0183] La presente solicitud describe un procedimiento de cribado de polipéptidos que simulan los epítopos reconocidos por los anticuerpos monoclonales de la presente descripción. Además, también se describen polipéptidos que simulan los epítopos reconocidos por los anticuerpos monoclonales de la presente descripción. En

un aspecto, la presente solicitud describe péptidos cortos que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 31-39. Estos polipéptidos pueden unirse a los anticuerpos monoclonales de la descripción. Estos polipéptidos también pueden usarse para preparar una vacuna contra el subtipo H5 del virus de la gripe aviar y usarse para diagnosticar la presencia de anticuerpos anti-hemaglutinina H5. Estos polipéptidos pueden usarse además para el cribado y la evaluación de optimización de adyuvante de la gripe aviar del subtipo H5.

[0184] En otro aspecto, el procedimiento de cribado comprende las siguientes etapas (i) cultivar una biblioteca de presentación de polipéptidos en condiciones adecuadas para la expresión de polipéptidos; (ii) mezclar la solución de cultivo con anticuerpos monoclonales de la presente descripción; (iii) seleccionar los clones de fago que se unen específicamente a dichos anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales usados para el cribado no están limitados a los anticuerpos monoclonales 8G9, 13D4 y 20A11. Los ejemplos 11 a 13 de esta solicitud describen en detalle un ensayo que cribaba con éxito péptidos cortos que se unan a los anticuerpos monoclonales de la descripción usando bibliotecas de polipéptidos de presentación en fagos.

15 EJEMPLOS

[0185] La presente invención se ilustra adicionalmente con los siguientes ejemplos y dibujos, pero no debe interpretarse que estas ilustraciones limitan el alcance de la presente invención.

20 **[0186]** Ejemplo 1: Preparación de anticuerpos monoclonales contra el gen de HA del virus de la gripe aviar del subtipo H5

Preparación del antígeno.

25 **[0187]** Embriones fertilizados de pollo de 9 días de edad fueron inoculados con la cepa del virus Ck/HK/Yu22/02 (H5N1) (denominada, "Yu22") durante 2 días a 30°C. Se recogió el sobrenadante de embrión de pollo para obtener el virus Yu22 amplificado. Los virus vivos se recogieron y se inactivaron con formalina al 0,03% a 4°C. La HA de virus inactivados se detectó y se midió el valor cuantitativo de virus inactivados (por favor consulte las directrices de la OMS para los procedimientos específicos para la determinación del valor cuantitativo de HA y la detección de la inhibición de la hemaglutinación (HI). Se seleccionó la cepa del virus HA = 1024, que fue proporcionada por el Departamento de Microbiología de la Universidad de Hong Kong).

Ratones

35 **[0188]** Ratones Balb/c hembra de 6 semanas de edad fueron proporcionados por el Experimental animal Center of School of Life Sciences, Universidad de Xiamen.

Producción de hibridoma.

40 **[0189]** Se usaron procedimientos de inmunización y fusión a PEG *in vivo* estándar para producir el anticuerpo monoclonal. Para detalles de los procedimientos, por favor consulte el documento *Antibodies: A Laboratory Manual* (Ed Harlow y col., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). El procedimiento se describe brevemente a continuación.

45 **[0190]** Inmunización de ratones. El sobrenadante de virus pre-tratado mencionado anteriormente se mezcló y se emulsionó con adyuvante completo de Freund (CFA) en un volumen igual. La mezcla se inyectó en múltiples puntos de los músculos de las cuatro patas de los ratones a la dosis de 300 µl por ratón por inyección. La misma dosis de sobrenadante de virus con adyuvante incompleto de Freund fue inyectada como refuerzos en el día 15 y 29 después de la primera inmunización, respectivamente. Después del segundo refuerzo, se tomó una muestra de sangre de los ratones para determinar la potencia de inhibición mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación. Cuando la potencia alcanzó 1:640, se tomó el bazo del ratón para llevar a cabo el experimento de fusión. Otro refuerzo se inyectó 72 h antes del experimento de fusión a la dosis de 50 µl por ratón a través de la vena caudal. Se produjeron 10 placas de fusión.

50 **[0191]** Fusión: la célula esplénica de ratón con el mayor valor cuantitativo de HI se fusionó con células de mieloma de ratón. En primer lugar, el bazo se molió para obtener la suspensión de células de bazo, que a continuación se fusionó con células de mieloma SP2/0 de ratón en fase logarítmica de crecimiento, el número de células de las células de mieloma es 10 veces menor que la de las células esplénicas. Las células se fusionaron entre sí en presencia de PEG1500 durante 1 minuto. A continuación, 100 ml de la solución de células fusionadas se cultivaron en 10 placas de 96 pocillos. El medio de fusión era el medio de selección completo RPMI1640 que

contenía HAT y el 20% de FBS. Los clones que tenían especificidad por el antígeno deseado se rastrearon mediante ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI), y se obtuvieron líneas de células productoras de anticuerpos monoclonales estables después de tres rondas de clonación.

5 **[0192]** Cribado de hibridoma: las células fusionadas se cultivaron en una placa de células de 96 pocillos durante 10 días. El sobrenadante celular se extrajo para realizar el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI). Los pocillos que contenían los clones positivos fueron clonados adicionalmente hasta que los anticuerpos secretados por la línea celular estable podían inhibir la aglutinación entre la cepa de virus Yu22 y sangre de pollo.

10 **[0193]** Resultados del cribado: se obtuvieron tres líneas celulares de anticuerpo monoclonal, 8G9, 13D4 y 20A11.

[0194] Cultivo de hibridoma: líneas celulares de anticuerpos monoclonales de hibridoma estables se cultivaron por primera vez en una incubadora de CO₂ usando placas de 96 pocillos, y a continuación se transfirieron a placas de 24 pocillos, a continuación se transfirieron a un matraz de 50 ml de cultivo de células para su posterior amplificación. Las células en el matraz de cultivo se recogieron y se inyectaron en la cavidad abdominal de un ratón. El líquido ascítico se extrajo de la cavidad abdominal del ratón después de 7-10 días.

Purificación de anticuerpos monoclonales.

20 **[0195]** El líquido ascítico se precipitó en primer lugar con sulfato de amonio al 50%, a continuación se dializó con PBS a pH 7,2, se purificó con columna de DEAE mediante HPLC para obtener los anticuerpos monoclonales purificados. La pureza del anticuerpo monoclonal purificado se determinó con SDS-PAGE.

25 Prueba de actividad en ensayo de inhibición de hemaglutinación de los anticuerpos monoclonales

[0196] Quince cepas de virus H5N1 de Vietnam, Indonesia, Malasia, Tailandia, Hong Kong, China y Europa, etc., que pertenecen a diferentes subtipos de virus (Chen y col., PNAS., 103: 2845 (2006)) y 14 cepas de virus no H5 (H1~H13, NDV de pollo) se seleccionaron para poner a prueba la reactividad de los anticuerpos monoclonales seleccionados con virus usando ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI). Los resultados se muestran en las tablas 1 y 2. Los resultados mostraron que las tres cepas de los anticuerpos monoclonales tenían una buena especificidad, y que no reaccionaban con los virus no H5. Y para las reacciones con las cepas del virus H5, las tres cepas de los anticuerpos monoclonales pueden reaccionar con todas las cepas de virus, mostrando excelentes espectros de reacción.

35 Tabla 1. Velocidades de reacción positivas entre anticuerpos monoclonales y cepas de virus H5 o no H5 usando el ensayo de inhibición de hemaglutinación

Anticuerpo monoclonal	Subtipo de anticuerpo	Cepa del virus H5 (número positivo/ número total de virus)	Cepa del virus H5 (número positivo/ número total de virus)
8G9	IgG2b	15/15	0/14
13D4	IgG2a	15/15	0/14
20A11	IgG2a	15/15	0/14

Tabla 2. Valor cuantitativo de inhibición de hemaglutinación de anticuerpos monoclonales para 15 cepas del virus H5

Cepas de H5N1	Valor cuantitativo de inhibición de hemaglutinación		
	8G9	13D4	20A11
GD1.1	12800	6400	12800
GD3.1	12800	12800	12800
GD4.1	12800	12800	12800
IDN1.1	12800	12800	12800
IDN3.1	12800	12800	12800
IDN6.1	12800	12800	12800
IDN8.1	12800	12800	12800
VTM1.1	12800	6400	12800
VTM4.1	12800	12800	12800
VNM2-2.1	12800	12800	12800
YN2.1	12800	12800	12800

HN3.1	12800	12800	12800
QH1.1	12800	12800	12800
Mixed1.1	12800	6400	12800
FJ1.5	12800	12800	12800

Ensayo de neutralización entre anticuerpos monoclonales y virus

[0197] Las actividades de neutralización de los anticuerpos monoclonales mencionados anteriormente con 15 cepas de diferentes sublinajes de virus H5N1 se detectaron mediante el ensayo de neutralización en micro-pocillos (Hulse-Post y col. PNAS, 102: 10682-7 (,2005)), los resultados en la tabla 3 demostraron que tres cepas del anticuerpo monoclonal tenían buenas actividades de neutralización contra todas las cepas del virus H5N1.

Tabla 3. Valor cuantitativo del ensayo de neutralización del anticuerpo monoclonal para el virus H5N1

Cepas de H5N1	Valor cuantitativo de inhibición de hemaglutinación		
	8G9	13D4	20A11
GD1.1	12800	12800	12800
GD3.1	12800	12800	12800
GD4.1	12800	12800	12800
IDN1.1	12800	12800	12800
IDN3.1	12800	12800	12800
IDN6.1	12800	12800	12800
IDN8.1	12800	12800	12800
VTM1.1	12800	12800	12800
VTM4.1	12800	12800	12800
VNM2-2.1	12800	12800	12800
YN2.1	12800	12800	12800
HN3.1	12800	12800	6400
QH1.1	12800	12800	12800
Mixed1.1	12800	12800	12800
FJ1.5	12800	12800	12800

10

Ejemplo 2: Experimento de viabilidad de la terapia antiviral de anticuerpos monoclonales

[0198] El tratamiento de enfermedades infecciosas usando anticuerpos mediante inmunización pasiva es un enfoque terapéutico anti-viral potencialmente eficaz. El ensayo de micro-neutralización in vitro ha demostrado que los anticuerpos en esta descripción tenían una actividad de neutralización muy potente para diferentes sublinajes de mutación del virus H5N1, y las características de los anticuerpos monoclonales fueron que tenían un amplio espectro de neutralización y un elevado valor cuantitativo de neutralización. Con el fin de demostrar adicionalmente el efecto anti-viral de los anticuerpos monoclonales in vivo, la presente descripción se basaba en la infección por virus H5N1 del modelo animal en ratones Balb/C, y un experimento de verificación in vivo en el que se usó un anticuerpo monoclonal para el tratamiento anti-viral de una cepa del virus de la gripe aviar H5N1 se llevó a cabo en un laboratorio de nivel 3 de bioseguridad animal. Los detalles son los siguientes:

1. Materiales y procedimientos

25 **[0199]**

- (1) Animal: ratones Balb/C, SPF, 6-8 semanas, hembra, peso aproximadamente 20 g.
- (2) Anticuerpo monoclonal: MAb 13D4 anti-H5, MAb 8G9 anti-H5, MAb anti-HIV p24 18H12
- (3) virus H5N1: Bar-Head Gs/QH/15C/2005 (H5N1)
- 30 (4) Anestésico: Isoflorano
- (5) Agrupamiento de animales: los ratones fueron enviados a laboratorios ABSL-3 con un día de antelación y se dividieron en 6 grupos con 6 ratones en cada jaula, se marcaron como G1, G2, G3 G6. Se registró el peso de cada ratón. Véase la tabla 3 para detalles.
- (6) Infección por virus: el virus se pre-diluyó a 10^3 TCID₅₀/μl. La cantidad de virus inoculada para cada ratón fue de 25 μl. Los ratones se anestesiaron en primer lugar con isoflorano antes de la inoculación y a continuación se infectaron con el virus mediante inoculación nasal.
- (7) Interferencia con anticuerpo monoclonal: 24 h (dpi. 1) del de la infección por el virus, a ratones del grupo de

tratamiento con anticuerpo se les inyectaron anticuerpos diferentes respectivamente a 20 mg/kg de peso corporal con un volumen de inyección de 100 µl/ratón.

(8) Registro de observaciones: la situación de supervivencia y caracteres de comportamiento correspondientes de los ratones se registraron diariamente desde el día 1 hasta el día 14 después de la infección por el virus.

5

Tabla 3. Esquema del experimento de viabilidad de la terapia antiviral H5N1 de anticuerpos monoclonales 8G9 y 13D4

Grupo	MAb	Punto temporal para la intervención del MAb
G1	Control negativo	-
G2	Control viral	-
G3	Control de MAb	MAb irrelevante (anti-HIV p24 18H12)
G4	Mab-8G9 para H5	1 dpi. (24 horas)
G5	Mab-13D4 para H5	1 dpi. (24 horas)
G6	8G9+13D4*	1 dpi. (24 horas)

* mezcla 1:1 de 8G9 y 13D4 con una concentración final de 20 mg/ml

2. Resultados y análisis

10

[0200] Observando la situación de supervivencia de los ratones del día 1 al día 14 después de la infección por el virus (tabla 4), se descubrió que, como con los del grupo de control negativo, los ratones del grupo de tratamiento con anticuerpo sobrevivieron normalmente hasta el día 14, y el efecto del tratamiento fue del 100%. Aunque los ratones del grupo de control del virus y el grupo de control de anticuerpo monoclonal irrelevante comenzaron a morir a partir del día 7 después de la infección por el virus y todos estaban muertos el Día 10 con una tasa de mortalidad del 100%. Estos resultados indicaron que los anticuerpos monoclonales anti-H5 8G9 y 13D4 podían tratar eficazmente la infección por virus de la gripe aviar H5N1 Bar-Head Gs/QH/15C/2005 de ratones in vivo.

15

Tabla 4. Situación de supervivencia de ratones 1-14 días después de la infección por el virus

Grupo	No. Total	Día post-inoculación													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1-control neg.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
G2-Control viral-dpi.1	6	6	6	6	6	6	6	4	1	1	0	0	0	0	0
G3-control de Mab-dpi.1	6	6	6	6	6	6	6	3	1	1	0	0	0	0	0
G4-Mab para H5-8G9-dpi.1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
G5-Mab para H5-13D4-dpi.1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
G6-8G9+13D4-dpi.1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

20

Ejemplo 3: experimento en animales de terapia antiviral de amplio espectro de anticuerpo monoclonal

[0201] Los experimentos anteriores han demostrado que los anticuerpos monoclonales 13D4 y 8G9 pueden tratar con éxito la infección por el virus de la gripe aviar H5N1 de los ratones. Debido a la alta variabilidad de los virus de la gripe aviar H5N1, las antigenicidades de diferentes subtipos variantes de cepas del virus de la gripe aviar H5N1 son claramente diferentes, por lo que era necesario ensayar aún más el efecto antiviral de amplio espectro de anticuerpos monoclonales contra las cepas del virus de la gripe aviar H5N1 que son significativamente distintos en propiedades genéticas.

25

30 1. Materiales y procedimientos

[0202]

(1) Animal: ratones Balb/C, SPF, 6-8 semanas, hembra, peso de aproximadamente 20 g.

35

(2) Anticuerpo monoclonal: MAb 13D4 anti-H5, MAb 1E4 anti-HIV p24

(3) Virus H5N1: Indonesia/542/2006, Bar-Head Gs/QH/15C/2005, Vietnam/1194/2004, Shenzhen/406H/2006

(4) Anestésico: Isoflorano

(5) Agrupamiento de animales: los ratones fueron enviados a laboratorios ABSL-3 con un día de antelación y se dividieron en 21 grupos con 6 ratones en cada jaula, se marcaron como G1, G2, G3.....G21. Se registró el peso de cada ratón. Véase la tabla 3 para detalles.

5 (6) Infección por el virus: El virus se pre-diluyó a 10^3 TCID₅₀/μl. La cantidad de virus inoculada para cada ratón fue de 25 μl. Los ratones se anestesiaron en primer lugar con isoflorano antes de la inoculación y a continuación se infectaron con el virus mediante inoculación nasal.

(7) Después de 24 h, 48 h y 72 h desde la infección por el virus, a los ratones del grupo de tratamiento con anticuerpo se les inyectaron anticuerpos diferentes respectivamente a 20 mg/kg de peso corporal con un volumen de
10 inyección de 100 μl/ratón.

(8) Registro de observaciones: La situación de supervivencia y caracteres de comportamiento correspondientes de los ratones se registraron diariamente desde el día 1 hasta el día 14 después de la infección por el virus.

15 Tabla 5 Esquema experimental para verificar la capacidad de tratamiento antiviral H5N1 de amplio espectro de anticuerpos monoclonales

Cepa del virus H5N1	Sublinaje	No. de grupo	Grupo	No. de ratón
Indonesia/542/2006	Indonesia	G1	Control viral	6
		G2	Control de MAb	6
		G3	Dpi.1 - 24 h	6
		G4	Dpi.2 - 48 h	6
		G5	Dpi.3 - 72 h	6
BHGs/QH/15C/2005	Europa	G6	Control viral	6
		G7	Control de MAb	6
		G8	Dpi.1 - 24 h	6
		G9	Dpi.2 - 48 h	6
		G10	Dpi.3 - 72 h	6
Vietnam/1194/2004	Vietnam	G11	Control viral	6
		G12	Control de MAb	6
		G13	Dpi.1-24 h	6
		G14	Dpi.2 - 48 h	6
		G15	Dpi.3 - 72 h	6
Shenzhen/406H/2006	China	G16	Control viral	6
		G17	Control de MAb	6
		G18	Dpi.1 - 24 h	6
		G19	Dpi.2 - 48 h	6
		G20	Dpi.3 - 72 h	6
Control negativo	NC	G21	Control negativo	6

2. Resultados y análisis

[0203] Se observó la situación de supervivencia de los ratones desde el día 1 al día 14 después de la
20 infección por el virus. De acuerdo con la diferencia en el momento de la muerte de los ratones en cada grupo, se podía saber que la virulencia de las diferentes cepas del virus H5N1 para los ratones era claramente diferente. El virus más virulento fue SZ/406H. Los ratones del grupo de control de virus empezaron a morir 3 días después de la infección y todos estaban muertos el día 4 después de la infección. Los ratones del grupo de anticuerpo irrelevante correspondiente empezaron a morir 4 días después de la infección, y todos estaban muertos el día 5 después de la
25 infección. El virus menos virulento fue IDN/542, excepto para un ratón del grupo de control de anticuerpo que murió el día 8 después de la infección y uno del grupo de control de virus que murió el día 11 después de la infección, todos los demás sobrevivieron. La virulencia de QH/15C y VNM/1194 era comparable. Los ratones de ambos grupos, el grupo de control del virus y control de anticuerpos del primero empezaron a morir 6 días después de la infección y todos estaban muertos 7 días después de la infección. Para el último, los ratones del grupo de control de
30 virus estaban muertos 7 días después de la infección, mientras que los ratones del grupo de control de anticuerpo comenzaron a morir 7 días después de la infección y todos estaban muertos el día 8 después de la infección.

[0204] Para grupos de tratamiento de intervención de anticuerpo de diferentes puntos temporales, el efecto terapéutico para las tres clases de virus IDN/542, QH/15C y VNM/1194 fueron del 100% con la intervención de
35 anticuerpo de 24 h, 48 h y 72 h. Como los del grupo de control negativo, todos los ratones sobrevivieron normalmente durante 14 días. Aunque para el tratamiento con anticuerpos del virus SZ/406H, la situación era

relativamente complicada: la tasa de cura del grupo de intervención a 24 h era del 100%; la tasa de cura del grupo de intervención de 48 h era del 83,3%; el grupo de intervención de 72 h no fue capaz de tratar con éxito la infección por el virus de los ratones y los 6 ratones finalmente murieron. En comparación con el grupo de control de virus, el momento en el que los ratones empezaron a morir y aquel cuando todos ellos finalmente murieron fue pospuesto 1 día y 2 días respectivamente. Esto puede estar relacionado con la demasiado alta virulencia del virus, la replicación in vivo demasiado rápida y la intervención del anticuerpo demasiado tardía.

[0205] Los resultados anteriores indican que el anticuerpo monoclonal 13D4 anti-H5 tiene un buen efecto terapéutico anti-viral de amplio espectro para los animales infectados con los virus H5N1.

10

Tabla 6 Situación de supervivencia de ratones 1-14 días después de la infección por el virus

Virus	Grupo	no. total	Día post-inoculación (dpi.)													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
IDN/542	G1-Cont. viral	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5
	G2-Cont. de Mab	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	5	5
	G3-dpi.1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	G4-dpi.2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	G5-dpi.3	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
QH/15C	G6-Cont. viral	6	6	6	6	6	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	G7-Cont. de Mab	6	6	6	6	6	6	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	G8-dpi.1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	G9-dpi.2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	G10-dpi.3	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
VNM/1194	G11-Cont. viral	6	6	6	6	6	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	G12-Cont. de Mab	6	6	6	6	6	6	6	3	0	0	0	0	0	0	0
	G13-dpi.1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	G14-dpi.2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	G15-dpi.3	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
SZ/406H	G16-Cont. viral	6	6	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G17-Cont. de Mab	6	6	6	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G18-dpi.1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	G19-dpi.2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	5
	G20-dpi.3	6	6	6	6	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NC	G21-cont. negativo	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Ejemplo 2: montaje del kit de detección (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ELISA) para antígeno HA del virus de la gripe del subtipo H5

15

[0206] Ensayo sándwich de anticuerpo doble se usó en el kit para detectar el antígeno HA de virus de la gripe del subtipo H5. En primer lugar, los anticuerpos monoclonales contra el gen HA del virus de la gripe del subtipo H5 fueron fijados previamente a la superficie de la placa de micropocillos de polietileno en el kit. Después de que el antígeno HA del virus de la gripe de tipo H5 lítico se añadiera a la microplaca, los anticuerpos monoclonales extendidos previamente pueden capturarlo, y los anticuerpos monoclonales marcados con enzimas añadidos después también podían unirse a ellos. El resultado se determinó a continuación a través del nivel de cromógeno catalizado por enzimas, del sustrato. Cuando el espécimen no contiene antígenos del virus de la gripe o no es el virus de la gripe H5, el sustrato no cambiará de color. Los especímenes que se pueden ensayar incluyen excrementos, secreciones de la boca y las cavidades nasales, virus intactos o líticos del cultivo de embriones de pollo, etc.

20

25

Preparación de la placa de ELISA

- [0207]** Anticuerpos monoclonales contra el gen de HA del virus de la gripe anti-tipo H5 fueron fijados previamente a la superficie de la placa de micropocillos de polietileno en el kit. Los anticuerpos monoclonales se fijaron mediante incubación en tampón de fosfato 10 mM (PB, pH = 7,4) durante una noche a 37°C. Dicha placa se lavó a continuación una vez con PBST (PBS 10 mM + Tween 20 al 0,05%), se secó, y se bloquearon con la solución de bloqueo (PBS 10 mM + gelatina al 2%) durante 2 horas a 37°C. Después de secar de nuevo, se envasa al vacío como placa de ELISA terminada (8 x 12 pocillos) del kit.
- 10 Preparación de otros componentes del kit
- [0208]** Componentes del lisado de virus:
- Lisado A (LB-A): CHAPS al 6% + Tween-20 al 2% + Tween-80 al 1%.
- 15 Lisado B (LB-B): PMSF 100 mM, disuelto con alcohol isopropílico y la concentración final de trabajo era 2 mM.
Lisado C (LB-C): PBS 10 mM, pH 7,4
- [0209]** Reactivo marcado con enzimas: anticuerpos monoclonales contra el gen del virus de la gripe anti-tipo H5 se marcaron con HRP y se consiguió reactivo marcado con enzimas con una dilución apropiada.
- 20 Control positivo: se usó virus inactivado de la cepa H5-N1-Yu22 con un valor cuantitativo apropiado como control positivo.
Control negativo: se usó lisado A como control negativo.
Reactivo de desarrollo de color A: 13,4 g/l de Na₂HPO₄·12H₂O + 4,2 g/l de ácido cítrico. H₂O + 0,3 g/l de peróxido de carbamida.
- 25 Reactivo de desarrollo de color B: 0,2 mM/l de TMB (3,3',5,5'-Tetrametil bencidina) + 20 mM/l de DMF(N,N-dimetilformamida).
Tampón de detención: ácido sulfúrico concentrado 2 M.
Tampón de lavado concentrado: 20 x PBST
- 30 Película de sellado de microplacas: dos láminas
Bolsa Ziplock: una
Instrucciones: una.
Procedimiento de detección
Preparación de la solución: 50 ml de tampón concentrado (20x) se diluyeron con agua destilada o agua desionizada
- 35 a 1000 ml para uso.
Numeración: las muestras se numeraron de acuerdo con secuencia de la microplaca. 3 pocillos de control negativo, 2 pocillos de control positivo y 1 pocillo de control blanco deben establecerse en cada placa (la muestra y el reactivo marcado con enzimas no se añadirían al pocillo de control blanco, las otras etapas siguieron siendo las mismas).
- 40 Tratamiento y aplicación de la muestra:
- [0210]** Cuando la muestra era líquida (incluyendo las muestras originales, muestras de cultivo de embrión de pollo, muestras de cultivo celular): una cantidad apropiada de la mezcla de LB-A y LB-B se preparó según se requirió por cada placa con 4 µl de LB-B por cada 100 µl de LB-A, se agitó y se mezcló bien. A continuación, la reacción se llevó a cabo añadiendo en primer lugar 100 µl de muestra a cada pocillo en la placa de micropocillos, y a continuación añadiendo 100 µl del lisado preparado descrito anteriormente.
- [0211]** Cuando la muestra era muestra original de frotis seca: 1 ml de LB-A, 40 µl de LB-B y 1 ml de PBS se mezclaron y se añadieron a un tubo de muestra. El tubo se agitó bien para disolver la muestra. La mezcla se agitó de nuevo para suspensión después de incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó durante 5 minutos a 6000 rpm, y el sobrenadante se tomó para el análisis mediante la adición de 100 µl a cada pocillo para permitir la reacción.
- [0212]** Cuando la muestra era muestra original de excrementos seca: 1 ml de LB-A, 40 µl de LB-B y 1 ml de PBS se mezclaron y se añadieron a un tubo de muestra. Los excrementos secos se suspendieron para producir una muestra de suspensión de excrementos al 10% (p/v). La muestra se disolvió después de la agitación y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se agitó de nuevo para suspensión y se centrifugó durante 5 minutos a 6000 rpm. A continuación, se tomó el sobrenadante, 100 µl del cual se añadieron a cada pocillo para permitir la reacción.

[0213] Deben incluir pocillos de control negativo y positivo para cada experimento de detección. Deben añadirse 100 µl de solución de control a cada pocillo.

5 **[0214]** Incubación: después de sellarlo con película de sellado de microplacas, la placa se agitó sobre un agitador de placas a velocidad moderada durante 60 minutos a temperatura ambiente (25~28°C).

[0215] Lavado: la película de sellado se retiró cuidadosamente y la placa se lavó 5 veces con la máquina de lavado de placas y se secó después del último lavado.

10

[0216] Adición de enzimas: Se añadieron 100 µl de reactivo marcado con enzimas a cada pocillo correspondiente, respectivamente.

15 **[0217]** Incubación: después de sellarla con la película de sellado, la placa se incubó durante 30 minutos a 37°C.

Etapa repetida 6.

20 **[0218]** Reacción de color: 50 µl de cada uno de los tapones de desarrollo de color A y B se añadieron a cada pocillo. La placa se agitó suavemente para mezclarlos bien y la mezcla se mantuvo alejada de la luz para reacción de color durante 30 minutos a 37°C.

25 **[0219]** Detección: Se añadió una gota de tampón de detección (50 µl) a cada pocillo y se agitó suavemente para mezclar bien. Los valores de DO de cada pocillo se determinaron con lector de microplacas a una única longitud de onda de 450 nm (se necesitó control de blanco) o longitud de onda doble de 450 nm/630 nm.

Evaluación de los resultados

30 **[0220]**

a) Intervalo normal de control negativo: en condiciones normales, el valor de DO del pocillo negativo no debe ser mayor a 0,1 (si el valor de DO del pocillo de control negativo fue más de 0,1, debe desecharse, si los valores de DO de todos los pocillos de control negativo eran más de 0,1, el experimento debe repetirse. Si los valores de DO de los pocillos de control negativo eran menores de 0,03, entonces el valor de DO debe ser considerado 0,03).

35 b) Intervalo normal del control positivo: en condiciones normales, el valor de DO del control positivo no debe ser menor de 0,5.

c) Cálculo del valor de corte: 0,15 más el valor de DO promedio de los pocillos de control negativo.

d) Determinación de la reacción positiva: cuando el valor de DO no era menor que el valor de corte, ésta era una reacción positiva para el antígeno HA del virus de la gripe aviar de tipo H5.

40 e) Determinación de la reacción negativa: cuando el valor de DO era menor que el valor de corte, ésta era una reacción negativa para el antígeno HA del virus de la gripe aviar de tipo H5.

Ejemplo 3: Aislamiento de genes de las regiones variables de cadena ligera y de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales

45

[0221] Se cultivaron 10^7 células de hibridoma en un matraz de cultivo semi-adherente. Las células que se adherían a las paredes del matraz fueron desprendidas por soplado de las paredes para suspensión. Las células se transfirieron a un nuevo tubo de centrifuga de 4 ml, y se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos. Se recogieron las células precipitadas y se suspendieron de nuevo en 100 µl de PBS esterilizado (pH 7,45), y a continuación se transfirieron a otro tubo de centrifuga de 1,5 ml. Se añadieron 800 µl de Trizol (Roche, Alemania) al tubo, se mezclaron suavemente y se incubaron durante 10 minutos. Se añadieron 200 µl de cloroformo y se agitaron bien durante 15 s, se incubaron durante 10 minutos, se centrifugaron a 12.000 rpm a 4°C durante 15 minutos. El líquido de la capa superior se transfirió a un nuevo tubo de centrifuga de 1,5 ml. Se añadió un volumen igual de isopropanol al tubo, se mezcló y se incubó durante 10 minutos. La mezcla se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 10 minutos.

50 Se desechó el sobrenadante y se añadieron 600 µl de etanol al 75% para el lavado. La mezcla se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Después de desechar el sobrenadante, la mezcla se precipitó a 60°C y se secó al vacío durante 5 minutos. El precipitado transparente se disolvió en 70 µl de pirocarbonato de dietilo (DEPC) H₂O. La solución se dividió en dos tubos, con 1 µl de cebador de transcripción inversa añadido en cada tubo. El cebador

de transcripción inversa añadido a un tubo era MVJkR (5'-CCg TTT(T/g) AT (T/C) TC CAg CTT ggT (g/C) CC-3 '). Se usó para amplificar los genes de la región variable de cadena ligera. El cebador de transcripción inversa en otro tubo era MVDJhR (5'-C ggT gAC Cg (T/A)ggT (C/g/T) CC TTg (g/A) CC CCA-3 '), que se usó para amplificar los genes en la región variable de cadena pesada. 1 µl de dNTP (Shanghai Shenggong) se añadió además a cada tubo. El tubo se colocó en un baño de agua a 72°C durante 10 minutos, y a continuación se colocó inmediatamente en un baño con hielo durante 5 minutos. 5 x 10 µl de tampón de transcripción inversa, 1 µl de AMV (10 u/µl, Promega) y 1 µl Rnasin (40 u/µl, Promega) se añadieron al tubo, se mezclaron bien y el ARN transcribió de forma inversa a ADNc a 42°C.

10 **[0222]** Para el aislamiento de las regiones variables del gen de anticuerpo, procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se usaron un conjunto de cebadores sintetizados de acuerdo con los kits de Ig-Prime de la compañía Novagen, y otros dos cebadores cadena abajo, MVJkR y MVDJhR, que fueron sintetizados por separado por Shanghai BioAsia. MVJkR era el cebador cadena abajo para amplificar el gen de la región variable de la cadena ligera y MVDJhR era el cebador cadena abajo para amplificar el gen de la región variable de cadena pesada. Las dos moléculas de ADNc sintetizadas anteriormente se usaron como plantillas. Las condiciones para las reacciones de PCR fueron: 94°C durante 5 minutos, 94°C durante 40 segundos, 53°C durante 1 minuto, 72°C durante 50 segundos, 35 ciclos, 72°C durante 15 minutos. El fragmento deseado se recuperó, se clonó en el vector pMD 18-T y fue secuenciado por Shanghai BioAsia. La secuencia de la región variable del anticuerpo se determinó después del alineamiento de secuencias BLAST y se dedujeron las secuencias de aminoácidos correspondientes.

20 **[0223]** Los genes de las regiones variables del anticuerpo se clonaron, de acuerdo con el procedimiento anterior, a partir de las líneas celulares de hibridoma de anticuerpo monoclonal para gripe aviar 8G9, 13D4, 20A11, y se dedujo la secuencia de aminoácidos correspondiente. La figura 7 muestra las secuencias de los cebadores cadena arriba. La figura 8 muestra los números de secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de las regiones variables de los tres anticuerpos monoclonales. La región determinante de la complementariedad (CDR) en la figura 9 se determinó mediante el método de Kabat (Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Coeller K. Sequences of proteins of immunological interest, U.S Department of Health and Human Services). Entre éstas, la región de CDR de 13D4 es la misma que la de 20A11, de modo que se especuló que procedieran del mismo anticuerpo monoclonal.

30 Tabla 7 secuencias de cebador cadena arriba para amplificar genes de las regiones variables de anticuerpo monoclonal para gripe aviar

Gen de la región variable del anticuerpo monoclonal	Nombre del cebador cadena arriba	Secuencia del cebador cadena arriba
8G9 Vh	MulgVh5'-E2	5'-AT gg(A/g) ATg gA(C/g) C(g/T)(g/T) I(A/g)T CTT T(A/C)T CT-3'
8G9 Vk	MulgkV15'-D1	5'-AT ggA TTT (A/T)CA (A/g)gT gCA gAT T(A/T)T CAg CTT-3'
13D4 Vh	MulgVh5'-B1	5'-ATg (A/g)AA Tg(C/g) A(C/g)C Tgg gT(C/T) (A/T)T (C/T) CTC TT-3'
13D4 Vk	MulgkV15'-D2	5'-AT ggg C(A/T)T CAA gAT g(A/g)A gTC ACA (g/T)(A/T) (C/T) (C/T)C(A/T) gg-3'
20A11 Vh	MulgVh5'-B1	5'-ATg (A/g)AA Tg(C/g) A(C/g)C Tgg gT(C/T) (A/T)T (C/T) CTC TT-3'
20A11 Vk	MulgkV15'-D2	5'-AT ggg C(A/T)T CAA gAT g(A/g)A gTC ACA (g/T)(A/T) (C/T) (C/T)C(A/T) gg-3'

Tabla 8 Números de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables de tres anticuerpos monoclonales

Nombre del anticuerpo monoclonal	Secuencia de nucleótidos Vh	de Secuencia de aminoácidos Vh	de Secuencia de nucleótidos Vk	de Secuencia de aminoácidos Vk
8G9	SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 2 SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
13D4	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 43 SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 6 SEQ ID NO: 44 SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
20A11	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12

		Secuencia de aminoácidos de la CDR de cadena ligera de anticuerpo						
CDR1		CDR2		CDR3		CDR1	CDR2	CDR3
8G9	FWMN (SEQ ID NO: 13)	RIDPYDSETH (SEQ ID NO: 14)	GIATLMVLPDY (SEQ ID NO: 15)	HASQDISSNMG (SEQ ID NO: 16)	HGTNLED (SEQ ID NO: 17)	VQYIQFPWT (SEQ ID NO: 18)		
13D4	GHWIE (SEQ ID NO: 19)	EILPGSGNIH (SEQ ID NO: 20)	LGTTAVERDWWYFDV (SEQ ID NO: 21)	KASQNVGTHLA (SEQ ID NO: 22)	SASYRYS (SEQ ID NO: 23)	QQYNNFPLT (SEQ ID NO: 24)		
20A11	GHWIE (SEQ ID NO: 25)	EILPGSGNIH (SEQ ID NO: 26)	LGTTAVERDWWYFDV (SEQ ID NO: 27)	KASQNVGTHLA (SEQ ID NO: 28)	SASYRYS (SEQ ID NO: 29)	QQYNNFPLT (SEQ ID NO: 30)		

Ejemplo 4. Expresión de anticuerpo de cadena sencilla y detección de sus actividades.

[0224] Las regiones variables de cadena pesada y ligera del gen del anticuerpo se enlazaron con un péptido corto (GGGS)₃ para formar un fragmento de ADN que codificaba un anticuerpo de cadena sencilla. Se usaron 8G9 VHF/8G9 VHR como el par de cebadores para amplificar el fragmento de región variable de cadena pesada 8G9. Se usaron 8G9 VKF/8G9 VKR como el par de cebadores para amplificar el fragmento de región variable de cadena ligera 8G9. Se usaron 13D4 VHF/13D4 VHR como el par de cebadores para amplificar el fragmento de región variable de cadena pesada 13D4. Se usaron 13D4 VKF/13D4 VKR como el par de cebadores para amplificar el fragmento de región variable de cadena ligera 13D4. Las secuencias de estos cebadores se mostraron en la tabla 10. Los cuatro fragmentos se recuperaron respectivamente, y los fragmentos de región variable de cadena pesada y cadena ligera se usaron a continuación como cebadores y plantillas uno para el otro para realizar extensión solapante en un nuevo sistema de PCR. Una pequeña cantidad de fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla de longitud completa se obtuvieron. A continuación, los fragmentos de longitud completa se usaron como plantillas y 8G9 VHF/8G9 VKR se usaron como cebadores para amplificar en masa el fragmento anticuerpo de cadena sencilla 8G9 solapado. 13D4 VHF/13D4 VKR se usaron como cebadores para amplificar en masa el fragmento de anticuerpo de cadena sencilla 13D4 solapado. Los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla se recuperaron digiriéndolos con NdeI and EcoR I, y clonándolos en el vector de expresión procariota pT0-T7 digerido con las mismas enzimas. Usando *E. coli* ER2566 como cepa de expresión, las proteínas expresadas mediante procedimientos estándar estaban presentes en forma de cuerpos de inclusión insolubles. Los cuerpos de inclusión se lavaron y purificaron con procedimientos convencionales, y los anticuerpos de cadena sencilla resultantes se disolvieron principalmente en urea 8 M. La proteína de anticuerpo de cadena sencilla disuelta en urea 8 M se dializó gradualmente en 1 x PBS para permitir que la proteína se renaturalizara. La solución dializada se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos y el precipitado se retiró. Realizar análisis de actividad para la solución de anticuerpo de cadena sencilla purificado de forma preliminar obtenida finalmente.

25

Tabla 10. Cebadores usados para clonación de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpo quimérico

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
8G9VHF	5'-TTACATATGCAGGTCCTCAACTGCTGC-3'
8G9VHR	5'-gCTACCACCCCTCCA gATCCgCCACCCTCCAGAGATTCGGTG ACCGTG-3'
8G9VKF	5'-ATCTggAgggggTggTA gCggTggAggCgggAgTGACATCCTG ATGACCCAA -3'
8G9VKR	5'-TTAGAAITCCTACCCGTTTGATCCTCCAGC -3'
13D4VHF	5'-TTACATATGCAGGTTGAGTGCAGC-3'
13D4VHR	5'-gCTACCACCCCTCCA gATCCgCCACCCTCCGAATTCGAG CT CGG-3'
13D4VKF	5'-ATCTggAgggggTggTA gCggTggAggCgggAgTGACATTCGTG ATGACC-3'
13D4VKR	5'-TTAGAAITCCTCAAGTTCCTCCAGTTCG-3'
8G98CHF1	5'- CCTGCTACTGATGTGCTCCCTGCATATGTCCTGTCCACAGGTCCAAC TGCAGCAGCCTGGGG -3'
8G98CHF2	5'-TTTGGATCCATGGGAAGGCTTACTTCTTCATTCCTGCTACTG ATTGTCCTCC-3'
8G9VHR1	5'-TTTCTCGAGGGGAGGATACGGTCAACGGAGGTGCCCTTGACCCC AG-3'
8G98CKF1	5'-GCTGCTGCTGTGGCTTACAGATGCAAGATGTGACATCCTGATGA CCCAATC-3'
8G98CKF2	5'-TTTGAATTCATGCTGTGTGCCA ACTCAGGTCCITGGGGTGTGCTGCT GCTGTGGCTTAC-3'
8G9VKR1	5'-TTTCTCGAGGCGGTTGATCCTCCAG-3'
13D4VHF1	5'-TCCTGCTACTGATGTGCTCCCTGCATATGTCCTGTCCACAGGTCA GCTGCAGCAG-3'

13D4VHF2	5'-TTTGGATCCATGGGAAGGCTTACTTCTTCATTCCTGCTACTGA TTGTCCCTG-3'
13D4VHR1	5'-TTTCTCGAGGGAGGACACGGTCAACGGAGGTTCCCTGGCCCC AGACATC-3'
13D4VHR2	5'-TTTCTCGAGGGAGGACACGGTCAACGGGTTCCCTGGCCCC AGACATC-3'
13D4Vf1	5'-GCTGCTGCTGGCTTACAGATGCAAGATGTGACATTGTGAT GACCCAGTC-3'
13D4Vf2	5'-TTTGAATTCATGTCGTGCCAACTCAGGTCCTGGGGTTGCTGC TGCTGGGCTTAC-3'
13D4Vkr2	5'-TTTCTCGAGCCGTTTTATTTCCAGCTTG-3'

[0225] Se aplicó el procedimiento ELISA competitivo para determinar la actividad del anticuerpo de cadena sencilla 8G9 purificado de forma preliminar. Anticuerpos policlonales para gripe aviar se extendieron en los pocillos de una placa de poliestireno y se bloquearon con BSA. 50 µl de la solución de anticuerpo de cadena sencilla mencionada anteriormente y 50 µl de virus de la gripe aviar H5 se añadieron al pocillo de ensayo. 50 µl de solución 1 x PBS y 50 µl de virus de la gripe aviar H5 se añadieron a los pocillos de control negativo, mientras que 50 µl de anticuerpo policlonal para gripe aviar y 50 µl de virus de la gripe aviar H5 se añadieron a los pocillos de control positivo. Cada reacción se repitió en tres pocillos. La solución en los pocillos se mezcló suavemente, se incubó a 37°C durante 1 h, y a continuación anticuerpos policlonales para gripe aviar marcados con HRP se añadieron como anticuerpos secundarios durante otra media hora de reacción. Se permitió que el color se desarrollara a 37°C durante 15 minutos después de la adición de los tampones de desarrollo del color A y B. Los resultados se leyeron con un lector de microplacas después de que la reacción finalizó. El valor promedio de los controles negativos era 1,871, el valor promedio de los controles positivos era 0,089, y el valor promedio de los pocillos de ensayo era 0,597, mostrando actividad relativamente alta de las proteínas del anticuerpo de cadena sencilla 8G9 purificado de forma preliminar.

[0226] Se seleccionaron 26 cepas de virus H5N1 para ensayar la reactividad de dicho anticuerpo de cadena sencilla 8G9 con el virus usando el ensayo de inhibición de hemaglutinación (HI). Se añadieron 25 µl de PBS a cada pocillo de una placa de hemaglutinación de 96 pocillos. Se añadieron 25 µl de solución de anticuerpo de cadena sencilla 8G9 (0,08 mg/ml) al primer pocillo y se mezclaron bien, 25 µl de los cuales se añadieron a continuación al segundo pocillo y así sucesivamente para diluir el anticuerpo de forma multiproporcional. Se añadieron 25 µl de virus al anticuerpo de cadena sencilla, después de incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadieron 50 µl de glóbulos rojos de pollo al 0,5%. Se observó aglutinación de glóbulos rojos después de incubar durante 30 minutos. El resultado mostraba que el anticuerpo de cadena sencilla 8G9 tenían actividad de HI para 19 de las cepas del virus (tabla 11).

Tabla 11 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) del anticuerpo de cadena sencilla 8G9 contra 26 cepas del virus H5N1

Cepas del virus H5N1	HI	Cepas del virus H5N1	HI
A1	>8	C3	7
A2	>8	D1	>8
A3	7	D2	7
A5	>8	E1	1
A6	7	E2	1
A7	7	F2	<1
A8	6	F3	<1
B1	7	G1	6
B2	3	H1	<1
B3	>8	H2	<1
B4	>8	B7	>8
B5	<1	B8	7
B6	7	C2	5

Nota: El valor cuantitativo de HI se diluye a la "n^{ésima}" potencia de 2. "n" es el número mostrado en la tabla.

[0227] El virus YU22 H5N1 se seleccionó para ensayar la reactividad entre dicho anticuerpo de cadena sencilla 13D4 y el virus usando el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI). Se añadieron 25 µl de PBS a cada pocillo de una placa de hemaglutinación de 96 pocillos. 25 µl de solución de anticuerpo de cadena sencilla 13D4 (0,18 mg/ml) se añadieron al primer pocillo y se mezclaron bien, 25 µl de los cuales se añadieron a continuación al segundo pocillo y así sucesivamente para diluir el anticuerpo de forma multiproporcional. 25 µl de virus se añadieron al anticuerpo de cadena sencilla, después de incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadieron 50 µl de glóbulos rojos de pollo al 0,5%. Se observó aglutinación de glóbulos rojos después de incubar durante 30 minutos. Los resultados mostraban que el anticuerpo de cadena sencilla 13D4 aún tenía actividad HI débil para virus YU22 cuando estaba diluido 8 veces.

Ejemplo 5 Expresión de anticuerpos mutados y quiméricos de las regiones variables del gen del anticuerpo y ensayo de las actividades del anticuerpo

[0228] Se descubrieron varias mutaciones de aminoácidos en la región FR4 de las secuencias de región variable de cadena pesada de 8G9 y 13D4 a través de análisis de alineamiento de secuencia Blast en el sitio web de

- NCBI, que se especulaba que fueron introducidas debido a la degeneración del cebador cadena abajo MVDJhR mientras se clonaba el gen. De este modo, se realizó mutagénesis de aminoácidos en la región FR4 de la secuencia de región variable de cadena pesada de 8G9 y 13D4. Entre éstas, la secuencia de nucleótidos de 8G9 VH se cambió de la SEQ ID NO: 1 a la expuesta en la SEQ ID NO: 41, su secuencia de aminoácidos se cambió desde la SEQ ID NO: 2 a la expuesta en la SEQ ID NO: 42. La secuencia de nucleótidos de 13D4 VH se cambió desde la SEQ ID NO: 5 a la expuesta en la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 45 respectivamente, su secuencia de aminoácidos se cambió desde la SEQ ID NO: 2 a las expuestas en la SEQ ID NO: 44 y la SEQ ID NO: 46 respectivamente.
- 10 **[0229]** En la región VK, la secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de 13D4 son idénticas a las de 20A11. Después de la mutación, la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 43 y la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 44 de 13D4 VH estaban de acuerdo con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 de 20A11. Por lo tanto, expresar el anticuerpo quimérico compuesto por la SEQ ID NO: 44 y la SEQ ID NO: 8 simultáneamente representa el anticuerpo quimérico de 13D4 y 20A11.
- 15 **[0230]** Se añadieron secuencias de péptido señal a los genes de región variable de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos monoclonales 8G9 y 13D4, que se clonaron a continuación en un plásmido de expresión eucariota que contenía la las secuencias de región constante de cadena pesada gamma1 y cadena ligera kappa humanas. Entre éstas, el plásmido pcDNA3.1-AH contenía la secuencia de región constante de cadena pesada gamma1 humana, y el plásmido pcDNA3.1-Ak contenía la secuencia de región constante de cadena ligera kappa.
- 20 **[0231]** Se usaron 8G98CHF1/8G9VHR1 como un par de cebadores para amplificar la secuencia del péptido señal de cadena pesada parcial y la secuencia de región variable de 8G9. Este producto de PCR se usó como plantilla y 8G98CHF2/8G9VHR1 se usaron como un par de cebadores para amplificar la secuencia de región variable de cadena pesada de 8G9 con el péptido señal completo. La secuencia amplificada se clonó en el plásmido pcDNA3.1-AH digerido doblemente con Bam HI/Xho I, para obtener el plásmido de expresión pcDNA3.1-AH8G9 que expresa una cadena pesada quimérica humana-de ratón. 8G98CKF1/8G9VKR1 se usaron como un par de cebadores para amplificar la secuencia del péptido señal de cadena ligera parcial y la secuencia de región variable de 8G9. El fragmento amplificado se usó como plantilla de PCR y 8G98CKF2/8G9VKR1 se usaron como un par de cebadores para amplificar el fragmento de región variable de cadena ligera de 8G9 con la secuencia del péptido señal completo. La secuencia amplificada se clonó en el plásmido pcDNA3.1-Ak digerido doblemente con EcoR I/Xho I para obtener el plásmido de expresión pcDNA3.1-Ak8G9 que expresa una cadena ligera quimérica humana-de ratón.
- 30 **[0232]** Como en el procedimiento anterior, 13D4VHF1/13D4VHR1 y 13D4VHF2/13D4VHR1 se usaron como pares de cebadores para amplificar la secuencia del péptido señal de cadena pesada y el fragmento de región variable de 13D4 (que incluye la SEQ ID NO: 43). La secuencia amplificada se clonó en el plásmido pcDNA3.1-AH digerido doblemente con Bam HI/Xho I para obtener el plásmido de expresión pcDNA3.1-AH13D4SV que expresa una cadena pesada quimérica humana-de ratón. 13D4VHF1/13D4VHR2 y 13D4VHF2/13D4VHR2 se usaron como pares de cebadores para amplificar la secuencia del péptido señal de cadena pesada y el fragmento de región variable de 13D4 (que incluye la SEQ ID NO: 45). La secuencia amplificada se clonó en el plásmido pcDNA3.1-AH digerido doblemente con Bam HI/Xho I para obtener el plásmido de expresión pcDNA3.1-AH13D4LV que expresa una cadena pesada quimérica humana-de ratón. 13D4VKF1/13D4VKR2 y 13D4VKF2 /13D4VKR2 se usaron como pares de cebadores para amplificar la secuencia del péptido señal de cadena ligera y el fragmento de región variable de 13D4. La secuencia amplificada se clonó en el plásmido pcDNA3.1-Ak digerido doblemente con EcoR I/Xho I para obtener el plásmido de expresión pcDNA3.1-Ak13D4 que expresa una cadena ligera quimérica humana-de ratón. Véase la figura 1 para el plásmido que expresa el anticuerpo quimérico.
- 45 **[0233]** Células 293 FT se co-transfectaron con los dos plásmidos que portan la cadena pesada quimérica y la cadena ligera quimérica usando el procedimiento de transfección con fosfato cálcico. El sobrenadante del cultivo celular se recogió para obtener los anticuerpos quiméricos expresados (cAb).
- 50 **[0234]** Dos clases de plásmidos de cadena pesada quimérica de 13D4 se combinaron con el plásmido de cadena ligera quimérica de 13D4 respectivamente para formar dos clases de anticuerpos quiméricos 13D4. Uno de ellos se llama anticuerpo quimérico 13D4 SV, y el otro se llama anticuerpo quimérico 13D4 LV. La concentración inicial del anticuerpo quimérico y el anticuerpo monoclonal de ratón se ajustó a 14,76 µg/ml. El ensayo de actividad de inhibición de hemaglutinina (HI) se realizó contra 25 cepas del virus H5N1 usando sobrenadante del cultivo celular de dos clases de anticuerpo quimérico. Tal como se muestra en el resultado de la tabla 12, las reacciones de HI de los dos anticuerpos quiméricos contra 25 cepas del virus H5N1 fueron básicamente idénticas a las del

anticuerpo monoclonal de ratón 13D4, mostrando que ambas de ellas mantenían la especificidad y la propiedad de amplio espectro del anticuerpo monoclonal de ratón. La secuencia del anticuerpo quimérico 13D4 SV estaba de acuerdo con la de 20A11, y demostrando por lo tanto que el anticuerpo quimérico de 20A11 también tenía excelente especificidad y propiedad de amplio espectro.

5

Tabla 12 Los resultados del ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI) del anticuerpo quimérico 13D4 contra 25 cepas del virus H5N1

(el valor cuantitativo de HI se diluyó a la "nésima" potencia de 2. "n" es los siguientes números)

Tipo de anticuerpo	13D4	13D4	13D4
Tipo de virus	Anticuerpo quimérico SV	Anticuerpo quimérico LVC	Anticuerpo monoclonal de ratón 14,6 µg/ml
A1	>8	>8	>8
A2	7	7	7
A3	5	6	6
A6	5,5	6,5	3
A7	3,5	4	4
A8	6	7	5
B1	>8	>8	>8
B3	2	2	3
B4	4	4	5
B6	<8	>8	>8
B7	6,5	6	7
B8	6	4	>8
C2	4	3	3
C3	4	4	4
C4	NO	NO	NO
D1	5	4	5
D2	5	4	5
D3	5,5	4	6
E1	6	5,5	7
E2	3	3	6
F2	5	5,5	5
F3	6,5	6	>8
F4	1	NO	1
G1	3	2	4
H2	4	3	3

10 **[0235]** El virus YU22 H5N1 se seleccionó para ensayar la reactividad entre el anticuerpo quimérico 8G9 en el sobrenadante de células y el virus usando el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI). Los resultados mostraron que el anticuerpo quimérico 8G9 aún tenía actividad HI para el virus YU22 cuando estaba diluido 16 veces.

15 **[0236]** Ejemplo 5. Cribado de péptidos cortos que simulan los epítomos reconocidos por el anticuerpo monoclonal 8G9 a partir de la biblioteca de péptidos de 12aa del bacteriófago

Cribado de péptidos del bacteriófago

20 **[0237]** La biblioteca de presentación en fago de péptidos de 12aa de la compañía New England Biolabs (ph.D. C7C peptide library) se usó para cribar péptidos de 12aa que unen al mAb 8G9. El cribado se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se describe brevemente a continuación:

[0238] 50 µl de medio de Proteína A - Agarosa (suspensión en agua al 50%) se dividió en alícuotas en un tubo de microcentrífuga, al que se añadieron 1 ml de TBS y una solución de Tween al 0,1% (TBST). El tubo se golpea o hace vibrar suavemente para resuspender el medio. Después de centrifugar a baja velocidad durante 30 segundos para precipitar el medio, el sobrenadante se retiró cuidadosamente. El medio se resuspendió en 1 ml de tampón de bloqueo y se incubó a 4°C durante 60 minutos con mezcla ocasional. Mientras tanto, 2 x 10¹¹ partículas de fago (equivalentes a 10 µl de la biblioteca de fagos original) y 300 ng de anticuerpo se diluyeron con tampón TBS a un volumen final de 200 µl con la concentración final del anticuerpo siendo 10 nM. La solución se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de la reacción de bloqueo, el medio se centrifugó a baja

velocidad, y a continuación se lavó con 1 ml de TBS tres veces, cada vez se necesita centrifugar el medio. La mezcla de fago-anticuerpo se añadió al medio de lavado, se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos con mezcla frecuente. El medio se centrifugó a baja velocidad, y se lavó con 1 ml de TBST 10 veces después de desechar el sobrenadante. A continuación, los medios se resuspendieron en 1 ml de glicina-HCl 0,2 M (pH 2,2) y 1 mg/ml de BSA, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para eluir las partículas de fago unido. La mezcla eluida se centrifugó durante 1 minuto y el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a otro nuevo tubo de microcentrífuga. La solución eluida se neutralizó inmediatamente con 150 µl de tampón Tris-HCl 1 M, pH 9,1. Se usó aproximadamente 1 µl de la solución neutralizada para determinar el valor cuantitativo del fago. La solución de fago restante se añadió a 20 ml de cultivo bacteriano de las células huésped ER2738 que estaban en fase de crecimiento logarítmico temprana. Después de cultivar con vibración a 37°C durante 4,5 horas, el cultivo bacteriano se transfirió a un tubo de centrífuga de 50 ml y se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos. Se recogió el 80% superior del sobrenadante y se añadió un sexto volumen de solución de PEG/NaCl (PEG-8000 al 20%, NaCl 2,5 M). La solución se mantuvo a 4°C durante una noche y se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó y el fago precipitado se disolvió con 1 ml de TBS. La solución se centrifugó a 4°C durante 5 minutos, el sobrenadante se recogió y se le añadió un sexto volumen de solución de PEG/NaCl. A continuación, la solución se mantuvo a 4°C durante 0,5 horas, se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó, y el fago precipitado se disolvió con 200 µl de TBS y se almacenó a 4°C. Los procedimientos mencionados anteriormente se repitieron para otra ronda de cribado.

20 **[0239]** Se diluyeron las células huésped ER2738 cultivadas durante una noche en medio LB a la proporción de 1:10 y se dividieron en alícuotas en tubos de cultivo (3 ml/tubo). Para cada anticuerpo monoclonal, se seleccionaron 10 placas de fagos de colonia única azul en placas de cultivo LB/IPTG/Xgal que se habían sometido a tres rondas de cribado y se inocularon en los tubos de cultivo mencionados anteriormente. Los cultivos celulares se incubaron con vibración a 37°C durante 4,5 h. Los cultivos celulares se transfirieron a tubos de centrífuga de 1,5 ml y se centrifugaron a 10.000 g. Se recogieron 200 µl del sobrenadante y se almacenaron, y el resto se utilizó para extraer ADNmc de acuerdo con las instrucciones del fabricante de pequeña cantidad del kit M13 Isolation and Purification Reagent Kit (Shanghai Huashun Bioengineering Co., Ltd.). Las secuencias del péptido de 12aa y el péptido de 11aa insertados se obtuvieron después de secuenciación por Shanghai Bioasia Biotechnology Co., Ltd., y se muestran en la tabla 13.

Tabla 13 Las secuencias de aminoácidos del péptido de 12aa y el péptido 11aa que se unen al anticuerpo monoclonal 8G9.

No. de péptido	Secuencia del péptido de 12aa	Secuencia ID No.
G1	LPYYDPRALLLR	SEQ ID No: 31
G2	HTPCDTRDCVLR	SEQ ID No: 32
G3	HPPCDTRDCVLR	SEQ ID No: 33
G4	APACDSRLCVLR	SEQ ID No: 34
G5	GDTRSFYYKLYF	SEQ ID No: 35
G6	LPHASPRALVMR	SEQ ID No: 36
G7	TTASNSKPPLHD	SEQ ID No: 37
G8	GPWENLRALFLR	SEQ ID No: 38
G9	DVIYVDRWHILR	SEQ ID No: 39
G10	SGYSSRMDFLR	SEQ ID No: 40

Detección de actividades de unión de péptido de fago

35 **[0240]** Después de la tercera ronda de cribado, aproximadamente 1 µl de fago eluido se recogió para la valoración cuantitativa. Se seleccionaron placas en blanco de fagos de colonia única y se inocularon en bacterias ER2738 en fase de crecimiento logarítmico. Después de incubar a 37°C durante 4,5~5 h, el cultivo bacteriano se centrifugó y se recogió el sobrenadante de fagos para el ensayo de ELISA, en el que el anticuerpo monoclonal de ratón 8G9 se aplicó a la concentración de 1 mg/ml. El sobrenadante del fago se utilizó como anticuerpo primario, se utilizó anticuerpo anti-M13/HRP diluido a 1:3.000 (Amersham Pharmacia Biotech, RU) como anticuerpo secundario. El anticuerpo 8H5mAb relacionado con la gripe aviar, y los anticuerpos no relacionados de proteína E2 anti-HEV 8C11mAb y 9B2 mAb se utilizaron como controles negativos para el anticuerpo monoclonal de ratón. La figura 2 muestra el resultado del ensayo de polipéptido-fago. Puede ser conocido a partir del resultado del ensayo que, contra el anticuerpo 8G9 diana, la mayoría de los péptidos de fagos tenían valores de DO tres veces mayores que el del control, lo que indica que los péptidos tenían relativamente buena especificidad.

Detección de la especificidad de unión de péptidos de fago

[0241] Se seleccionaron los clones de fagos positivos representativos de la secuencia G1-G5 obtenidos por cribado de 8G9 para amplificarlos de nuevo en ER2738 bacteriana durante 4 horas. El sobrenadante se recogió para ELISA para ensayar su especificidad. Un total de 10 cepas se seleccionaron a partir de anticuerpos monoclonales para AIV y HEV, respectivamente, como controles. Entre ellos, los anticuerpos monoclonales contra el virus de la gripe aviar fueron 3G4, 8H5, 10F7, 3C8, 2F2; y los anticuerpos monoclonales contra el VHE fueron 9B2, 8C11, 8H3, 12A10, 6F8. Las placas se revistieron con los anticuerpos a una concentración de 1 mg/ml, las condiciones detalladas para el análisis de ELISA fueron como anteriormente. Tal como se muestra en la figura 3, la actividad de reacción de estas cinco secuencias con el anticuerpo monoclonal diana 8G9 era muy alta, mientras que la actividad de unión con los 10 anticuerpos de control era muy baja, y de este modo mostraban una excelente especificidad.

Ejemplo 6. Expresión fusionada de G1, G2, G3, G5 con la proteína 239 y detección de sus actividades

[0242] Construcción de los vectores de expresión fusionados para 239-G1, G2, G3 y G5

[0243] Este laboratorio expresó un fragmento (a.a. 368-606) del ORF2 del HEV en *E. coli*, la proteína 239 recombinante obtenida 239 puede ensamblarse en partículas similares a un virus que tienen buena inmunogenicidad. Tomando la 239-G1 como ejemplo, se usó el procedimiento de PCR para construir el vector de expresión procariota pT0-T7-239-G1, en el que el extremo C de la secuencia de 239 se fusionó a la secuencia del péptido de 12 aminoácidos. En primer lugar, se diseñaron cebadores para la secuencia de 239 y la secuencia del péptido de 12 aminoácidos (tabla 14). La primera ronda de amplificación por PCR se llevó a cabo usando el gen de 239 como plantilla y 239F/239XR1 como cebadores. Los productos de PCR se recuperaron y se purificaron y a continuación se usaron como plantillas para la segunda ronda de amplificación por PCR, en la que se usaron los cebadores 239F/239G1R2. Estos productos de PCR se recuperaron y se purificaron y a continuación se usaron como plantillas para la tercera ronda de amplificación por PCR, en la que se usaron los cebadores 239F/239G1R1 para obtener el fragmento 239-G5, que se registró, se purificó, se digirió doblemente con las enzimas de restricción Nde I y Bgl II, y se ligó con el vector pT0-T7 digerido doblemente con Nde I y BamH I. El producto de ligamiento se transformó en *E. coli* ER2566. Después de haber sido expresado en pequeña cantidad, el plásmido se examinó mediante digestión enzimática, y el clon positivo contenía el vector de expresión procariota recombinante 239-G1. El plásmido de la proteína de fusión 239-G2, 239-G3 y 239-G5 se construyó usando el mismo procedimiento.

Tabla 14 Secuencia del cebador de clonación de 239-G1, 239-G2, 239-G3 y 239-G5

Nombre del cebador	Secuencias del cebador
239-123F	5'-TTT TTA CAT ATG ATA GCG CTT ACC CTG-3'
239-G1R1	5'-TTTAGATCTACGAAGAAGAAGAGCACGCGGATCATAAT-3'
239-G1R2	5'-AGCACGCGGATCATAATAAGGAAGgCTACCACCACCACCAgAACCC-3'
239-G2R1	5'-TTTAGATCTACGCAACACACAATCCCTAGTATCAC-3'
239-G2R2	5'-CAATCCCTAGTATCACACGGCGTATGgCTACCACCACCACCAgAACCC-3'
239-G3R1	5'-TTTAGATCTACGCAACACACAACCGCGAATCACACG-3'
239-G3R2	5'-ACAACCGCAATCACACGAGGCGGCTACCACCACCACCAgAACCC-3'
239-G5R1	5'-TTTAGATCTCCGCATCACACAGGGCTCGAGGGCTGG-3'
239-G5R2	5'-CAGGGCTCGAGGGCTGGCGTGGGGCAGgCTACCACCACCACCAgAACCC-3'
239-XR3	5'-gCTACCACCACCACCAgAACCCACCACCACCGGATCCgCgCggAggggggggCT-3'

[0244] Expresión y purificación de las proteínas de fusión 239-G1, G2, G3 y G5.

[0245] Colonias individuales de ER2566 que contenían los plásmidos 239-G1, G2, G3 y G5 se inocularon, cada una en 2 ml de medio LB resistente a Kn. Los cultivos bacterianos se incubaron con vibración a 37°C hasta que el valor de DO₆₀₀ alcanzó aproximadamente 0,8. A continuación los cultivos se transfirieron a la relación de 1:1000 a 500 ml de medio LB, y se incubaron hasta que el valor de DO₆₀₀ alcanzaba aproximadamente 1,0. A continuación, se añadieron 500 µl de IPTG a los cultivos bacterianos para inducir expresión de proteínas a 37°C durante 4 h. Las bacterias se recogieron por centrifugado a 8.000 rpm durante 6 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó, y el precipitado bacteriano se resuspendió con 20 ml/matraz de tampón de lisis, se incubó en agua enfriada con hielo, y se trató con un disruptor celular ultrasónico para romper las células. Las condiciones para el tratamiento ultrasónico fueron las siguientes: tiempo de trabajo: 5 minutos; pulso: tratamiento durante 2 s y reposo durante 5 s; potencia de salida: 70%. A continuación, la solución de bacterias se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se guardó, mientras que el precipitado se resuspendió con 20 ml de Triton al 2%, se le hizo vibrar durante 30 minutos, y a continuación se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se guardó, y

el precipitado se resuspendió con 20 ml de Tampón I y se le hizo vibrar durante 30 minutos. Después de repetir el tratamiento con Triton/Tampón I una vez, el cultivo se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se guardó, y el precipitado se resuspendió con 20 ml de Urea 2 M/Tampón I, se le hizo vibrar durante 30 minutos, y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se guardó, y el precipitado se resuspendió con 20 ml de Urea 4 M/Tampón I, se le hizo vibrar durante 30 minutos, y a continuación se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se guardó, y el precipitado se resuspendió con 20 ml de Urea 8 M/Tampón I, se le hizo vibrar durante 30 minutos, y a continuación se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se guardó, y las proteínas en las soluciones de Urea 8 M y 4 M se dializaron en PBS con diálisis por gradiente (Urea 8M-Urea 4M-Urea 2M-PBS).

10

Ensayo de las actividades de las proteínas de fusión 239-G1, G2, G3 y G5

Ensayo ELISA directo

15 **[0246]** Se revistieron placas de 96 pocillos con las proteínas de fusión purificadas de forma preliminar 239-G1, G2, G3 y G5 a la concentración de 10 µg/ml durante 2 h a 37°C. A continuación, las placas se lavaron una vez, se trataron con tampón de bloqueo Flu A a 37°C durante 2 h y a continuación a 4°C durante una noche para bloquear sitios de unión inespecíficos. Después de que el tampón de bloqueo se desechó, 100 µl de anticuerpos marcados con enzimas diferentes se añadieron a cada pocillo, incluyendo 8G9-HRP, 8H5-HRP y 8C11-HRP. Entre
20 estos, el 8C11-HRP era un anticuerpo específico contra la proteína 239, y el 8G9-HRP era el anticuerpo monoclonal usado para cribar el péptido de 12aa. Las placas se incubaron con anticuerpos a 37°C durante 30 minutos, y se lavaron con PBST 5 veces. El color se desarrolló durante 10 minutos con la adición de solución de desarrollo de color y la reacción se interrumpió con el tampón de detención. Los resultados mostrados en la figura 4 se leyeron con un lector de microplacas. Se podía saber, a partir de los resultados de la figura 4 que todas las proteínas de
25 fusión 239 reaccionaban con el anticuerpo 8C11-HRP, y los valores de reacción fueron superiores a 3,0, lo que indicaba que las proteínas de fusión al vector 239 se expresaban y se purificaban correctamente. 239-G3 y 239-G5 reaccionaban con 8G9-HRP débilmente. Fue posible que los fragmentos del péptido de 12aa G1, G2, G3 y G5 obtenidos a través de cribado de 8G9 no pudieron mostrar la actividad de los fragmentos peptídicos correspondientes en el fago.

30

Ejemplo 7. Expresión de las proteínas fusionadas por los péptidos 12aa G1, G2, G3, G5 y la proteína cAg de HBV

Construcción de vectores de expresión fusionados

35 **[0247]** Basándose en la propiedad del fragmento de los aminoácidos 1-149 de HBcAg a expresar en forma de partículas similares a virus en *E. coli*, el laboratorio de los inventores insertó estos 149 aminoácidos en el vector de expresión de *E. coli* pT0-T7. Los dos aminoácidos en las posiciones 79 y 80 del fragmento epitópico dominante del células B de HBcAg se sustituyeron por un enlazador para fabricar el plásmido de expresión de HBc mutante pC149-mut. HBcAg presentaba una inmunogenicidad de células T muy fuerte. La fusión del polipéptido extraño en la MIR
40 interna (región inmunodominante mayor, aminoácidos 78-83) de HBcAg no cambiaría la propiedad de polimerización de su partícula, y permitiría que epítotos extraños se mostraran en la superficie de la partícula.

[0248] 2 copias de péptidos de 12 aminoácidos G1, G2, G3 y G5 se insertaron en las posiciones de aminoácidos 79 y 80 de HBcAg para obtener las proteínas de fusión correspondientes, llamadas HBc-DG1, HBc-
45 DG2, HBc-DG3 y HBc-DG5, respectivamente. Tomando HBc-DG1 como ejemplo, en primer lugar, se diseñaron cebadores directos que comprenden la secuencia del péptido de 12 aminoácidos y el cebador inverso universal HBcR (tabla 15) basándose en las secuencias de los péptidos de 12 aminoácidos y la secuencia de vector pC149-mut respectivamente. pC149-mut se usó como plantilla y los cebadores HBc-G1F3/ HBcR se usaron para la primera ronda de amplificación por PCR. Los productos de PCR recuperados y purificados se usaron como plantilla, y los
50 cebadores HBc-G1F2/ HBcR se usaron para la segunda ronda de amplificación por PCR. Los productos de PCR recuperados y purificados se usaron como plantilla, y los cebadores HBc-G1F1/HBcR se usaron para la tercera ronda de amplificación por PCR para generar C149, aminoácidos 81-149, en el que se ligaron 2 copias de secuencias G1. El fragmento se obtuvo después de la digestión con Bgl II y EcoR I y purificación. Mientras tanto, el vector pC149-MUT se digirió doblemente con BamH I y EcoR I, se recuperó y se ligó con el fragmento. Los
55 productos ligados se transformaron en ER2566 de *E. coli* para análisis de expresión y digestión enzimática del plásmido. Los plásmidos correctos mostrados por el análisis tenían dos copias de las secuencias G1 insertadas, y se nombraron HBc-DG1. Se usó el mismo procedimiento para construir los plásmidos de las proteínas de fusión HBc-DG2, HBc-DG3 y HBc-DG5

Tabla 15. Secuencias de cebadores de clonación de HBc-DG1, HBc-DG2, HBc-DG3 y HBc-DG5

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
HBc-G1F1	5'-TTTAGATCTGGTGGGGAGGCTCACCTTCCTTATTATGATCCCCG
HBc-G1F2	TGCTCTTCTTCTTC-3'
HBc-G1F3	5'-CCGTGCTCTTCTTCTTCCTGAGGAGGTGGTTCCCTTCCA
HBc-G2F1	TATTACGACCCTCGTGC-3'
5HBc-G2F2	5'-TACGACCCCTCGTGCACCTCTGCCTTCGGCGGATCCGTCGACGG
HBc-G2F3	TGGTGGAGGTTACAGG-3'
HBc-G3F1	5'-TTTAGATCTGGTGGCGGAGGCTCCCATACACCGTGTGATACCTAGGGAT
HBc-G3F2	TGTGTGTTCGCG-3'
HBc-G3F3	5'-GGGATGTGTGTGTGGTGGAGGAGGTGGTTCTCATACGCCCTGCGGATA
HBc-G5F1	CTAGAGATTG-3'
HBc-G5F2	5'-CCTGCCGATAC TAGAGATTGCCGCTCTTGGGGGATCCGTCGACGGTGGT
HBc-G5F3	GGAGGTTTCAGG-3'
HBc-G5F4	5'-TTTAGATCTGGTGGAGGATCAGCACCTGCATGTGATTCGGGGTT
HBc-G5F5	GTGTGTGTTCGCG-3'
HBc-G5F6	5'-CCGTTGTGTGTGTGGTGGAGGAGGTGGTTCAGCCCCAGCCCTGTG
HBc-G5F7	ACTCCCGCTTG-3'
HBc-G5F8	5'-TGTGACTCCCGCTTGTGTCTCCGAGGATCCGTCGACGGTGGTG
HBc-G5F9	GAGGTTTCAGG-3'
HBc-G5F10	5'-TTTAGATCTGGTGGAGGAGGCTCACTGCCCCACGCCAGCCCTCGAGCC
HBc-G5F11	CTGGTGATG-3'
HBc-G5F12	5'-CTCGAGCCCTGGTGTGTCGGGGGAGGAGGTGGTTCCCTTGCCCCACGCCA
HBc-G5F13	GCCCTCGGG-3'

HBc-G5F3	5'-CACGCCAGCCCTCGGGCCCTGGTGATGCCGGGATCCCGGTGGTGG
HBcR	AGGTCAGG-3' 5'-TT GAA TTC TTA AAC AAC AGT AGT TT-3'

Expresión y purificación de las proteínas de fusión

- [0249]** Cepas bacterianas ER2566 que contenían plásmidos que expresaban HBc-DG1, HBc-DG2, HBc-DG3 y HBc-DG5 se inocularon en 2 ml de medio LB resistente a Kn. Los cultivos bacterianos se incubaron con vibración a 37°C hasta que el valor de DO₆₀₀ alcanzaba aproximadamente 0,8. A continuación, los cultivos se transfirieron a la relación de 1:1000 a 500 ml de medio LB (resistente a Kn), y se incubaron hasta que el valor de DO₆₀₀ alcanzaba aproximadamente 0,8. A continuación 500 µl de IPTG se añadieron a los cultivos bacterianos para inducir la expresión de proteínas a 18°C durante 20 h. Las bacterias se recogieron mediante centrifugado a 8.000 g durante 6 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó, y el precipitado bacteriano se resuspendió con 20 ml/matraz de tampón de lisis, se incubó en agua enfriada con hielo, y se trató con un disruptor celular ultrasónico para romper las células. Las condiciones para el tratamiento ultrasónico fueron las siguientes: tiempo de trabajo: 5 minutos; pulso: tratamiento durante 2 s y reposo durante 5 s; potencia de salida: 70%. A continuación, la solución de bacterias se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se guardó.
- [0250]** Dado que las proteínas expresadas en el sobrenadante eran relativamente impura, se necesitó purificación. Estas proteínas podían autoensamblarse para formar partículas en condiciones adecuadas, por lo tanto, las condiciones para que ellas se autoensamblaran para formar partículas se considerarán durante la purificación de proteínas. Se usaron los siguientes procedimientos para purificar las proteínas para promover las proteínas a autoensamblarse y formar partículas: se añadió sulfato de amino saturado en la cantidad del 33% del volumen total para precipitar la proteína. La mezcla se incubó a continuación en hielo durante 30 minutos, y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó, y el precipitado se resuspendió con tampón CB que contenía β-mercaptoetanol al 5%. La solución se hizo vibrar a 37°C durante 30 minutos, y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se dializó en el sistema tampón PB5.8 (que incluía NaCl 300 mM y EDTA 50 mM). El tampón se cambió cada 4 h. Después de que el tampón se cambió 3 veces, la solución dializada se recogió y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos. La pureza de la muestra de sobrenadante se examinó con SDS-PAGE.

Ensayo de las actividades de las proteínas de fusión HBc-DG1, HBc-DG2, HBc-DG3 y HBc-DG5

- [0251]** Se revistieron placas de 96 pocillos con las proteínas de fusión purificadas de forma preliminar HBc-DG1, HBc-DG2, HBc-DG3 y HBc-DG5 a la concentración de 10 µg/ml durante 2 h a 37°C. A continuación, las placas se lavaron una vez, se trataron con tampón de bloqueo Flu A a 37°C durante 2 h y a continuación a 4°C durante una noche para bloquear sitios de unión inespecíficos. Después de que el tampón de bloqueo se desechó, 100 µl de anticuerpos marcados con enzimas diferentes se añadieron a cada pocillo, incluyendo 8G9-HRP, 8H5-HRP y 8C11-HRP. Entre estos, el 8C11-HRP era un anticuerpo específico contra la proteína 239, y el 8G9-HRP era el anticuerpo monoclonal usado para cribar el péptido 12aa. Las placas se incubaron con anticuerpos a 37°C durante 30 minutos, y se lavaron con PBST 5 veces. El color se desarrolló durante 10 minutos con la adición de solución de desarrollo de color y la reacción se interrumpió con el tampón de detención. Los resultados mostrados en la figura 4 se leyeron con un lector de microplacas. Se podía saber, a partir de los resultados de la figura 4 que solamente HBc-DG3 reaccionaba con 8G9-HRP, pero el valor de reacción era relativamente bajo, lo que indicaba que en la proteína del vector HBc, los fragmentos del péptido de 12 aminoácidos G1, G2, G3 y G5 obtenidos a través de cribado de 8G9 no podían mostrar la actividad de los fragmentos peptídicos correspondientes en el fago.

Ejemplo 8. Ensayo ELISA competitivo de péptidos sintéticos G1, G2, G3, G5 con virus de la gripe aviar.

- [0252]** La placa se revistió con anticuerpo monoclonal de ratón 2F2 específico para virus de la gripe aviar a la concentración de 10 µg/ml. Se añadió la cepa del virus Ck/HK/Yu22/02 diluida a 1:40 a las placas que contenían pocillos y se incubaron a 37°C durante 1 h. Después de que el virus en los pocillos se desechó, se añadieron péptidos sintéticos G1, G2, G3 y G5 de diferente gradiente de concentración y se añadieron 8G9/HRP diluidos a 1:1.000 a los pocillos juntos y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Se usó péptido de 12 aminoácidos no relacionado como control negativo, y adicionalmente, se usó PBS como control negativo que no contenía péptido sintetizado. Las placas se lavaron con PBST 5 veces. El color se desarrolló durante 10 minutos con la adición de solución de desarrollo de color, y se añadió tampón de detención para interrumpir la reacción. El valor se leyó con un lector de microplacas. A medida que la tasa de competición alcanzaba el 50% y era dependiente de la concentración, el péptido podía competir con el virus de la gripe aviar para unirse al anticuerpo marcado con enzima 8G9, lo que indicaba además que el péptido de 12 aminoácidos podría simular parte de la estructura espacial del epítipo del antígeno de 8G9. Los resultados se mostraron en la figura 5, a partir de la cual podía saberse que el péptido sintético G2 tenía actividad de competición cuando su concentración era 50 µg.

Ejemplo 9 Uso del anticuerpo monoclonal para gripe aviar para cribar en busca de ligandos que se unen

específicamente a la proteína HA de la gripe aviar

[0253] La placa de 96 pocillos se revistió con anticuerpo monoclonal para gripe aviar de tipo HA para capturar adicionalmente el virus de la gripe aviar. A continuación, el virus se incubó con la cantidad apropiada de biblioteca de péptidos en fago. Los fagos no de unión y grandes cantidades de sustancias unidas inespecíficamente se retiraron. Los péptidos del fago que se unían específicamente a la proteína HA se eluyeron completamente con anticuerpo monoclonal neutralizante de amplio espectro o líquido ascítico. Los péptidos del fago se ensayaron a continuación con inhibición de hemaglutinina o ELISA competitiva para seleccionar péptidos de 12 aminoácidos que se unen a la proteína HA en competición con el anticuerpo monoclonal neutralizante de amplio espectro, lo que podría usarse para tratamiento terapéutico de la gripe aviar.

[0254] El efecto de captura del virus era bueno cuando la placa se revistió con anticuerpos monoclonales para gripe aviar 2F2 y 3G4 mezclados con la cantidad de 2 µg/ml. A la cantidad de 20 HA/pocillo, los virus de la gripe aviare subtipo HA yu22 y 6151 se unían completamente con el anticuerpo de revestimiento. 5 µl de la biblioteca de péptidos original del fago (2×10^{13} pfu) se diluyeron en 1 ml de TBST, que se añadió a partes iguales en 10 pocillos con 100 µl/pocillo, y se incubaron a 37 durante 1 h. Los pocillos se lavaron en la primera ronda con TBST (0,1%) 3 veces y a continuación con TBST (0,5%) 5-8 veces. Se usó la cantidad apropiada de la mezcla de anticuerpos para gripe aviar 8H5, 8G9 y 13D4 para elución competitiva. Los procedimientos mencionados anteriormente se repitieron hasta la tercera ronda de cribado, a continuación la sustancia seleccionada se valoró cuantitativamente y placas de fago de colonia individual se seleccionaron y se amplificaron para realizar inhibición de hemaglutinina o ensayo ELISA competitivo, en el que compitieron con 8H5, 8G9 y 13D4 por el sitio de unión al virus. Se seleccionaron los péptidos de 12 aminoácidos que se unen a la proteína HA en competición con el anticuerpo monoclonal neutralizante de amplio espectro.

25 Ejemplo 9 Ensayo de bloqueo de HI de los péptidos sintéticos G1, G2, G3 y G5

[0255] La concentración de virus Ck/HKYU22/02 se ajustó al nivel apropiado de acuerdo con el procedimiento de HI ordinario. 25 µg de péptido sintético se diluyeron proporcionalmente a $1/2^8$. Cada gradiente diluido se mezcló por duplicado con líquido ascítico de 8G9 diluido a 1:500. 50 µl de glóbulos rojos de pollo se añadieron después de que la mezcla se incubó en el pocillo con el virus Ck/HKYU22/02 durante 0,5 h a temperatura ambiente. El efecto de bloqueo de HI de los péptidos sintéticos se observó y el resultado se muestra en la figura 6. El polipéptido G2 podía bloquear claramente la actividad HI del anticuerpo para el virus, lo que indicaba que el péptido G2 podría imitar el sitio de unión del 8G9mAb en el virus, mientras que los otros polipéptidos no tenían ningún efecto de bloqueo de HI.

35 8G9 VH: Secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 1

[0256]

CAGGTCCA ACTGCTGCAGCCTGGGGTTGAGCTGGTGAGGCCGGGGGCTTCAGT
 GAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACGTTACCAGCTTCTGGATGAACTGGGT
 TAAACAGAGGCCTGACCAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTTACGATAG
 TGAAACTCACTACAATCAAAAATTCAAGGACAAGGCCATATTGACTGTAGACAAATC
 CTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTAT
 TACTGTGGAAGAGGCATTGCTACATTAATGGTTCTACCTGACTACTGGGGTCAAGGCA
 CCACGGTCACCGAATCTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAAATCGTAA

40 8G9 VH Secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 2

[0257]

QVQLLQPGVELVRPGASVKLSCKASGYTFTSFWMNWVKQRPDQGLEWIGRIDPY
 45 DSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCGRGIATLMVLPDYWGQG

TTVTESLEDPRVPSSNS

8G9VK: Secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 3

5 [0258]

GACATCCTGATGACCCAATCTCCATCCTCCATGTCTGTATCTCTGGGAGACACAG
TCAGCATCACTTGCCATGCAAGTCAGGACATTAGCAGTAATATGGGGTGGTTGCAGCA
GAAACCAGGGAAGTCATTGAAGGGCCTGATCTATCATGGAACCAACTTGGAAGATGG
AGTTCCTTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGACCAGATTATTCTCTCACCATCAGC
AGCCTGGAATCTGAAGATTTTGCAGACTATTACTGTGTACAGTATATTCAGTTTCCGTG
GACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCT

8G9VK Secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 4

10

[0259]

DILMTQSPSSMSVSLGDTVSI TCHASQDISSNMGWLQQKPGKSLKGLIYHGTNLED
GVPSRFSGSGSPDYSLTISSEDFADYYCVQYIQFPWTFGGGKLEIKRA

15 13D4VH: Secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5

[0260]

CAGG TTCAGCTGCAGCAGTCCGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGT
GAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCAGTGGGCACTGGATAGAGTGGGT
AAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGG
TAATAT TCACTATAATGAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACATTCGCTGCAGATACATCCT
CCAACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTA
CTGTGCAAGATTGGGTACTACGGCAGTAGAGAGGGACTGGTACTTCGATGTCTGGGG
CCAAGGGACCACGGTCACCGAATCTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTC

G

20

13D4VH Secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 6

[0261]

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSGHWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGS
GNIHYNEKFKGKATFAADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLGT TAVERDWFYFDVW
GQGTTVTESLEDPRVPSSNS

25

13D4VK: Secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7

[0262]

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCGCATCAGTAGGAGACAGG
GTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTCATTAGCCTGGTATCAAC
AGAAACCAGGTCAATCTCCGAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTG
GAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG
CAATGTGCAGTCTGGAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAGCAATATAACAACCTTCCG
CTCACGTTCCGGTGCTGGCACCAAGCTGGAAATAAAACGG

5 13D4VK Secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 8

[0263]

DIVMTQSQKFMSASVGDRVSVTCKASQNVGTHLAWYQQKPGQSPKALIYSASYR
10 YSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSGDLADYFCQQYNNFPLTFGAGTKLEIKR

20A11 VH Secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 9

[0264]

15 CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGT
GAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCAGTGGGCACTGGATAGAGTGGGT
AAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGG
TAATATTCACTATAATGAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACATTCGCTGCAGATACATCCT
CCAACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTA
CTGTGCAAGATTGGGTACTACGGCAGTAGAGAGGGACTGGTACTTCGATGTCTGGGG
CCAAGGAACCTCCGTGACCGTGTCTCC

20A11 VH Secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 10

20 [0265]

QVQLQQSGAELMKPGASVKISKATGYTFSGHWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGS
GNIHYNEKFKGKATFAADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLGTTAVERDWFYFDVW
GQGTSVTVSS

13D4VK: Secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 11

25

[0266]

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCGCATCAGTAGGAGACAGG
GTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTCATTAGCCTGGTATCAAC
AGAAACCAGGTCAATCTCCGAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTG
GAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG
CAATGTGCAGTCTGGAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAGCAATATAACAACCTTTCCG
CTCACGTTCCGGTGCTGGCACCAAGCTGGAAATAAAACGG

13D4VK Secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 12

5 [0267]

DIVMTQSQKFMSASVGDRVSVTCKASQNVGTHLAWYQQKPGQSPKALIYSASYR
YSGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSGDLADYFCQQYNNFPLTFGAGTKLEIKR

8G9 VH Secuencia de nucleótidos mutada SEQ ID NO: 41

10

[0268]

CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGTTGAGCTGGTGAGGCCGGGGGCTTCAGT
GAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACGTTACCAGCTTCTGGATGAACTGGGT
TAAACAGAGGCCTGACCAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTTACGATAG
TGAAACTCACTACAATCAAAAATTC AAGGACAAGGCCATATTGACTGTAGACAAATC
CTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTAT
TACTGTGGAAGAGGCATTGCTACATTAATGGTTCTACCTGACTACTGGGGTCAAGGCA
CCTCCGTGACCGTGTCCTCC

15 8G9 VH Secuencia de aminoácidos mutada SEQ ID NO: 42

[0269]

QVQLQQPGVELVRPGASVKLSCKASGYTFTSFWMNWVKQRPDQGLEWIGRIDPY
DSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCGRGIATLMVLPDYWGQG
TSVTVSS

20

13D4VH-SV Secuencia de nucleótidos mutada: SEQ ID NO: 43

[0270]

CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGT
GAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCAGTGGGCACTGGATAGAGTGGGT
AAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGG
TAATATTCACCTATAATGAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACATTCGCTGCAGATACATCCT
CCAACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTA
CTGTGCAAGATTGGGTACTACGGCAGTAGAGAGGGACTGGTACTTCGATGTCTGGGG
CCAAGGAACCTCCGTGACCGTGTCTCC

13D4VH-SV Secuencia de aminoácidos mutada: SEQ ID NO: 44

5 [0271]

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSGHWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGS
GNIHYNEKFKGKATFAADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLGTTAVERDWFYFDVW
GQGTSVTVSS

13D4VH-LV Secuencia de nucleótidos mutada: SEQ ID NO: 45

10

[0272]

CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGT
GAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCAGTGGGCACTGGATAGAGTGGGT
AAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGG
TAATATTCACCTATAATGAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACATTCGCTGCAGATACATCCT
CCAACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTA
CTGTGCAAGATTGGGTACTACGGCAGTAGAGAGGGACTGGTACTTCGATGTCTGGGG
CCAAGGAACCCTGGTGACCGTGTCTCC

15

13D4VH-LV Secuencia de aminoácidos mutada: SEQ ID NO: 46

[0273]

20

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSGHWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGS
GNIHYNEKFKGKATFAADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLGTTAVERDWFYFDVW
GQGTSLVTVSS

Lista de secuencias

25 [0274]

<110> Xiamen University etc.

<120> Anticuerpos monoclonales y fragmentos activados que se unen a hemaglutinina del virus de la gripe aviar subtipo H5 y usos de los mismos

ES 2 609 818 T3

<130> IEC080033PCT
 <160> 90
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 5 <211> 393
 <212> ADN
 <213> murino
 <400> 1

	caggccaac tgctgcagcc tggggttgag ctggtgaggc cgggggcttc agtgaagctg	60
	tcttgaagg cttctggcta cacgttcacc agcttctgga tgaactgggt taaacagagg	120
	cctgaccaag gccttgagtg gattggaagg attgatcctt acgatagtga aactcactac	180
	aatcaaaaat tcaaggacaa ggccatattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac	240
	atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgg aagaggcatt	300
	gtacattaa tggttctacc tgactactgg ggtcaaggca ccacggtcac cgaatcteta	360
10	gaggatcccc ggtaccgag ctggaattcg taa	393

<210> 2
 <211> 130
 <212> PRT
 15 <213> murina
 <400> 2

Gln	Val	Gln	Leu	Leu	Gln	Pro	Gly	Val	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala
1			5					10						15	
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Phe

ES 2 609 818 T3

20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Gly Ile Ala Thr Leu Met Val Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Glu Ser Leu Glu Asp Pro Arg Val Pro Ser Ser
 115 120 125
 Asn Ser
 130

<210> 3
 <211> 327
 5 <212> ADN
 <213> murina
 <400> 3

gacatcctga tgacceate tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga cacagtcage 60
 atcacttgcc atgcaagtea ggacattagc agtaatatgg ggtggttgca gcagaaacca 120
 gggaagtcac tgaaggcct gatctatcat ggaaccaact tggaagatgg agttccttca 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tggaccagat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 240
 gaagattttg cagactatta ctgtgtacag tatattcagt ttcctggac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggagatcaa acgggct 327

10 <210> 4
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> murina
 15 <400> 4

ES 2 609 818 T3

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

<210> 5
 <211> 399
 5 <212> ADN
 <213> murino
 <400> 5

caggttcagc tgcagcagtc cggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata 60
 tcttgaagg ctactggeta cacattcagt gggcactgga tagagtgggt aaagcagagg 120
 cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaagtggtaa tattcactat 180
 aatgagaagt ttaagggcaa ggccacattc getgcagata catcctccaa cacagcctac 240
 atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagattgggt 300
 actacggcag tagagagga ctggtacttc gatgtctggg gccaaaggac cacggteacc 360
 gaatctctag aggatccccg ggtaccgagc tcgaattcg 399

10
 <210> 6
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> murina
 15 <400> 6

ES 2 609 818 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Gly His
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Phe Ala Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Gly Thr Thr Ala Val Glu Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Glu Ser Leu Glu Asp Pro Arg Val
 115 120 125
 Pro Ser Ser Asn Ser
 130

<210> 7
 <211> 324
 5 <212> ADN
 <213> murino
 <400> 7

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccgcat cagtaggaga cagggtcagc 60
 gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actcatttag cctggtatca acagaaacca 120
 ggtaaatctc cgaaagcact gatttactcg gcatectacc ggtacagtgg agtcctgat 180
 cgettcacag gcagtggate tgggacagat ttactetca ccatcagcaa tgtgcagtet 240
 ggagacttgg cagactatth ctgtcagcaa tataacaact ttccgctcac gttcgggtgct 300
 ggcaccaagc tggaaataaa acgg 324

ES 2 609 818 T3

<210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 5 <213> murina
 <400> 8

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

10 <210> 9
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> murino
 <400> 9

15 caggttcagc tgcagecagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata 60
 tectgcaagg ctactggeta cacattcagt gggcactgga tagagtgggt aaagcagagg 120
 cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaagtggtaa tattcactat 180
 aatgagaagt ttaagggcaa ggccacattc gctgcagata catcctccaa cacagcctac 240
 atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcegtct attactgtgc aagattgggt 300
 actacggcag tagagaggga ctggtacttc gatgtctggg gccaaaggaac ctccgtgacc 360
 gtgtcctcc 369

ES 2 609 818 T3

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccgcat cagtaggaga cagggtcage 60
 gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actcatttag cctggtatca acagaaacca 120
 ggtcaatctc cgaaagcact gatttactcg gcatectacc ggtacagtgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtggate tgggacagat tteactetca ccatcagcaa tgtgcagtct 240
 ggagacttgg cagactatth ctgtcagcaa tataacaact ttccgctcac gttcgggtgct 300
 ggcaccaagc tggaaataaa acgg 324

<210> 12
 <211> 108
 5 <212> PRT
 <213> murina
 <400> 12

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

<210> 13
 <211> 4
 15 <212> PRT
 <213> murina
 <400> 13

ES 2 609 818 T3

Phe Trp Met Asn

1

<210> 14
<211> 10
5 <212> PRT
<213> murina
<400> 14

Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His

1 5 10

10 <210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> murina
15 <400> 15

Gly Ile Ala Thr Leu Met Val Leu Pro Asp Tyr

1 5 10

20 <210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> murina
<400> 16

His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Asn Met Gly

25 1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
30 <213> murina
<400> 17

His Gly Thr Asn Leu Glu Asp

1 5

35 <210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> murina
<400> 18

40 Val Gln Tyr Ile Gln Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 19
45 <211> 5

ES 2 609 818 T3

<212> PRT
<213> murina
<400> 19

Gly His Trp Ile Glu

5 1 5

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
10 <213> murina
<400> 20

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Ile His

1 5 10

15 <210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> murina
<400> 21

20 Leu Gly Thr Thr Ala Val Glu Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 22
<211> 11
25 <212> PRT
<213> murina
<400> 22

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr His Leu Ala

1 5 10

30 <210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> murina
35 <400> 23

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser

1 5

40 <210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> murina
45 <400> 24

Gln Gln Tyr Asn Asn Phe Pro Leu Thr

1 5

ES 2 609 818 T3

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
5 <213> murina
<400> 25

Gly His Trp Ile Glu
1 5

10 <210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> murina
<400> 26
15

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Ile His
1 5 10

<210> 27
<211> 14
20 <212> PRT
<213> murina
<400> 27

Leu Gly Thr Thr Ala Val Glu Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

25 <210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> murina
30 <400> 28

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr His Leu Ala
1 5 10

<210> 29
35 <211> 7
<212> PRT
<213> murina
<400> 29

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

40 <210> 30
<211> 9
<212> PRT
45 <213> murina
<400> 30

ES 2 609 818 T3

Gln Gln Tyr Asn Asn Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 31
<211> 12
5 <212> PRT
<213> Artificial
<400> 31

Leu Pro Tyr Tyr Asp Pro Arg Ala Leu Leu Leu Arg

1 5 10

10 <210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial
15 <400> 32

His Thr Pro Cys Asp Thr Arg Asp Cys Val Leu Arg

1 5 10

20 <210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 33

His Pro Pro Cys Asp Thr Arg Asp Cys Val Leu Arg

1 5 10

25 <210> 34
<211> 12
<212> PRT
30 <213> Artificial
<400> 34

Ala Pro Ala Cys Asp Ser Arg Leu Cys Val Leu Arg

1 5 10

35 <210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 35

40

Gly Asp Thr Arg Ser Phe Tyr Tyr Lys Leu Tyr Phe

1 5 10

<210> 36
<211> 12
45 <212> PRT

ES 2 609 818 T3

<213> Artificial
<400> 36

Leu Pro His Ala Ser Pro Arg Ala Leu Val Met Arg
1 5 10

5
<210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial
10 <400> 37

Thr Thr Ala Ser Asn Ser Lys Pro Pro Leu His Asp
1 5 10

<210> 38
15 <211> 12
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 38

20 Gly Pro Trp Glu Asn Leu Arg Ala Leu Phe Leu Arg
1 5 10

<210> 39
25 <211> 12
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 39

30 Asp Val Ile Tyr Val Asp Arg Trp His Ile Leu Arg
1 5 10

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
35 <213> Artificial
<400> 40

Ser Gly Tyr Ser Ser Arg Met Asp Phe Leu Arg
1 5 10

40 <210> 41
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial
45 <400> 41

ES 2 609 818 T3

caggtccaac tgcagcagcc tggggttgag ctggtgagge cgggggcttc agtgaagctg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cacgttcacc agcttctgga tgaactgggt taaacagagg 120
 cctgaccaag gccttgagtg gattggaagg attgatacctt acgatagtga aactcactac 180
 aatcaaaaat tcaaggacaa ggccatattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgg aagaggcatt 300
 gctacattaa tggttctacc tgactactgg ggtcaaggca cctccgtgac cgtgtcctcc 360

<210> 42
 <211> 120
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <400> 42

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Val Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Gly Ile Ala Thr Leu Met Val Leu Pro Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 43
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 609 818 T3

<400> 43

caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata 60
 tcctgcaagg ctactggcta cacattcagt gggcactgga tagagtgggt aaagcagagg 120
 cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaagtggtaa tattcactat 180
 aatgagaagt ttaagggcaa ggccacattc gctgcagata catcctcaa cacagcctac 240
 atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagattgggt 300
 actacggcag tagagagggga ctggtacttc gatgtctggg gccaaaggaac ctccgtgacc 360
 5 gtgtcctcc 369

<210> 44

<211> 123

<212> PRT

10 <213> Artificial

<400> 44

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Gly His
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Phe Ala Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Gly Thr Thr Ala Val Glu Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 609 818 T3

<210> 45
<211> 369
<212> ADN
<213> Artificial

5 <400> 45

caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata 60
tctgcaagg ctactggeta cacattcagt gggcactgga tagagtgggt aaagcagagg 120
cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaagtggtaa tattcactat 180
aatgagaagt ttaagggcaa ggccacattc gctgcagata catcctccaa cacagcctac 240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagattgggt 300
actacggcag tagagagga ctggtacttc gatgtctggg gccaaaggaac cctggtgacc 360
gtgtcctcc 369

<210> 46
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial
<400> 46

10

ES 2 609 818 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Gly His
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Phe Ala Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Gly Thr Thr Ala Val Glu Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 47
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <400> 47
 10 ttacatatgc aggtccaact gctgc 25
 <210> 48
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <400> 48
 gctaccaccc cctccagatc cgccacctcc agagattcgg tgaccgtg 48
 <210> 49
 <211> 52
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <400> 49
 atctggaggg ggtggtagcg gtggaggcgg gaggatc ctgatgaccc aa 52
 <210> 50
 <211> 29
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <400> 50

ES 2 609 818 T3

	ttagaattcc taccggttg atctccagc	29
	<210> 51	
	<211> 25	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<400> 51	
	ttacatatgc aggttcagct gcagc	25
	<210> 52	
	<211> 45	
10	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 52	
	gctaccaccc cctccagatc cgccacctcc cgaattcgag ctcg	45
	<210> 53	
15	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 53	
	atctggaggg ggtgtagcg gtggaggcgg gaggacatt gtgatgacc	49
20	<210> 54	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 54	
25	ttagaattcc cgttttattt ccagctgg	29
	<210> 55	
	<211> 59	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<400> 55	
	cctgctactg attgtccctg catatgtctt gtcccaggtc caactgcagc agcctgggg	59
	<210> 56	
	<211> 50	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<400> 56	
	ttggatcca tgggaaggct tacttctca ttctgctac tgattgtccc	50
	<210> 57	
	<211> 43	
40	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 57	
	tttctcgagg gaggatacgg tcacggaggt gccttgacct cag	43
	<210> 58	
45	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 58	
	gctgctgctg tgcttacag atgcaagatg tgacatcctg atgaccaat c	51
50	<210> 59	
	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 59	
55	tttgaattca tgctgtgcc aactcaggtc ctggggtgc tgctgctgtg gcttac	56
	<210> 60	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 609 818 T3

	<400> 60	
	tttctcgaga gcccgttga tctccag	27
	<210> 61	
	<211> 53	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 61	
	tctgtact gattgtccct gcatatgtcc tgtcccaggt tcagctgcag cag	53
	<210> 62	
10	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 62	
	ttggatcca tgggaaggct tacttctca ttcctgtac tgattgtccc tg	52
15	<210> 63	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 63	
20	tttctcgag ggaggacacg gtcacggagg ttcctggcc ccagacatc	49
	<210> 64	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<400> 64	
	tttctcgag ggaggacacg gtcaccaggg ttcctggcc ccagacatc	49
	<210> 65	
	<211> 51	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<400> 65	
	gctgctgctg tggcttacag atgcaagatg tgacattgtg atgaccagt c	51
	<210> 66	
	<211> 56	
35	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 66	
	ttgaattca tgtctgtgcc aactcaggtc ctggggtgc tgctgctgtg gcttac	56
40	<210> 67	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 67	
45	tttctcgagc cgttttattt ccagcttg	28
	<210> 68	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<400> 68	
	ttttacata tgatagcgtt tacctg	27
	<210> 69	
	<211> 38	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 69	
	tttagatcta cgaagaagaa gagcacgagg atcataat	38
	<210> 70	

ES 2 609 818 T3

	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 70	
5	agcacgcgga tcataataag gaaggctacc accaccacca gaacc	45
	<210> 71	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10	<400> 71	
	ttagatcta cgcaacacac aatccctagt atcac	35
	<210> 72	
	<211> 47	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<400> 72	
	caatccctag tatcacacgg cgtatggcta ccaccaccac cagaacc	47
	<210> 73	
	<211> 38	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 73	
	ttagatcta cgcaacacac acaaccgcga atcacacg	38
	<210> 74	
25	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 74	
	acaaccgcga atcacacgca ggcgcgctac caccaccacc agaacc	46
30	<210> 75	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 75	
35	ttagatctc cgcatcacca gggctcgagg gctgg	35
	<210> 76	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<400> 76	
	cagggctcga gggctgcgt ggggcaggct accaccacca ccagaacc	48
	<210> 77	
	<211> 52	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<400> 77	
	gctaccacca ccaccagaac caccaccacc ggatccgcgc ggaggggggg ct	52
	<210> 78	
	<211> 58	
50	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 78	
	ttagatctg gtggcggagg ctacttctc tattatgatc cccgtgctct tctcttc	58
	<210> 79	
55	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 79	
	ccgtgctctt ctctctcgtg gaggaggtgg ttccctcca tattacgacc ctctgtc	57

ES 2 609 818 T3

<210> 80
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <400> 80
 tacgaccctc gtgcacttct gcttcgcgga tccgtcgacg gtggtggagg ttcagg 56
 <210> 81
 <211> 59
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <400> 81
 tttagatctg ttggcggagg ctccataca ccgtgtgata ctagggattg tgtgttgcg 59
 <210> 82
 <211> 58
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <400> 82
 gggattgtgt gttgcgtgga ggaggtggt ctcatacgcc ctgcgatact agagattg 58
 <210> 83
 20 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <400> 83
 cctgcgatac tagagattgc gtcttgcggg gatccgctga cgggtgggga gggtcagg 58
 25 <210> 84
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <400> 84
 30 tttagatctg gtggaggagg atcagcacct gcatgtgatt cgcggtgtg tgtgttcg 58
 <210> 85
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <400> 85
 cggttgtgtg tgttgcgtgg aggaggtggt tcagccccag cctgtgactc ccgcttg 57
 <210> 86
 <211> 56
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <400> 86
 tgtgactccc gcttgtgtgt cctccgagga tccgtcgacg gtggtggagg ttcagg 56
 <210> 87
 <211> 57
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <400> 87
 tttagatctg gtggaggagg ctcaactgcc cacgccagcc ctcgagccct ggtgatg 57
 <210> 88
 50 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <400> 88
 ctcgagccct ggtgatgcgg ggaggaggtg gttccttgcc ccacgccagc cctcggg 57
 55 <210> 89
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <400> 89

ES 2 609 818 T3

cacgccagcc ctcgggcct ggtgatgagg ggatccggtg gtggaggttc agg 53
<210> 90
<211> 25
<212> ADN
5 <213> Artificial
<400> 90
ttgaattctt aaacaacagt agttt 25

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una hemaglutinina (HA) del virus de la gripe aviar (AIV) del subtipo H5, en el que dicho anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada variable que comprende las CDR1-CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos tal como se expone en las SEQ ID NO: 19-21;
- y comprende además una cadena ligera variable que comprende las CDR1-CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos tal como se expone en las SEQ ID NO: 22-24.
2. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha cadena pesada variable comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre un grupo que consiste en:
- la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 44 y la SEQ ID NO: 46, y/o
- en el que dicha cadena ligera variable comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre un grupo que consiste en:
- la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 12.
3. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho anticuerpo monoclonal está en forma de Fab, Fab', F(ab)₂ o Fv.
4. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo monoclonal comprende una región no CDR que es de una especie que no es murina, preferentemente en el que dicha región no CDR es de un anticuerpo humano, más preferentemente en el que dicha región no CDR humana tiene uno o más aminoácidos sustituidos procedentes de un anticuerpo murino.
5. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo monoclonal comprende un anticuerpo monoclonal seleccionada entre un grupo que consiste en:
- (i) un anticuerpo monoclonal generado por la estirpe celular de hibridoma 13D4 que se deposita con el número de entrada de CCTCC-C200721; y
- (ii) un anticuerpo monoclonal generado por la estirpe celular de hibridoma 20A11 que se deposita con el número de entrada de CCTCC-C200638.
6. Una estirpe celular de hibridoma seleccionada entre un grupo que consiste en:
- (i) la estirpe celular de hibridoma 13D4 que se deposita con el número de entrada de CCTCC-C200721; y
- (ii) la estirpe celular de hibridoma 20A11 que se deposita con el número de entrada de CCTCC-C200638.
7. Una molécula de ácido nucleico aislada, que comprende
- (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada de anticuerpo las CDR1-CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos tal como se expone en las SEQ ID NO: 19-21; comprendiendo preferentemente dicha región variable de cadena pesada una secuencia de aminoácidos seleccionada entre un grupo que consiste en:
- la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 44 y la SEQ ID NO: 46,
- más preferentemente en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre un grupo que consiste en:
- la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 45; y/o
- (ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo, comprendiendo dicha región variable de cadena ligera de anticuerpo CDR1-CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos tal como se expone en las SEQ ID NO: 22-24; comprendiendo preferentemente dicha región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos seleccionada entre un grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 12,
- más preferentemente en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico

seleccionada entre un grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 11.

- 5 8. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7.
9. Una célula huésped que comprende un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 8.
10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10 11. Una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos monoclonales seleccionados entre el grupo que consiste en:
- 15 (i) un anticuerpo monoclonal generado por la estirpe celular de hibridoma 13D4 que se deposita con el número de entrada de CCTCC-C200721; y
- (ii) un anticuerpo monoclonal generado por la estirpe celular de hibridoma 20A11 que se deposita con el número de entrada de CCTCC-C200638,
- o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 20 12. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso para prevenir y tratar una infección por virus de la gripe aviar.

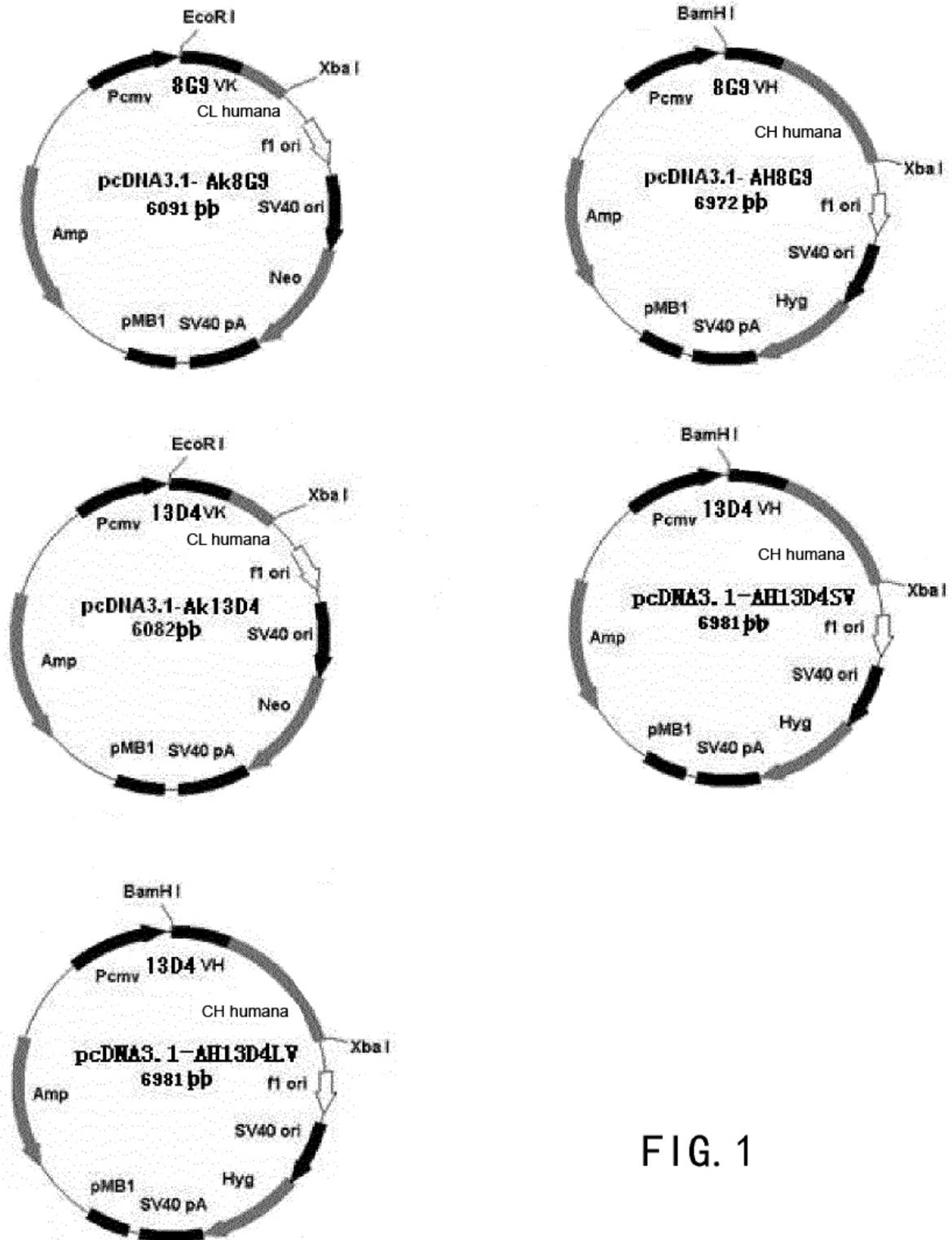


FIG. 1

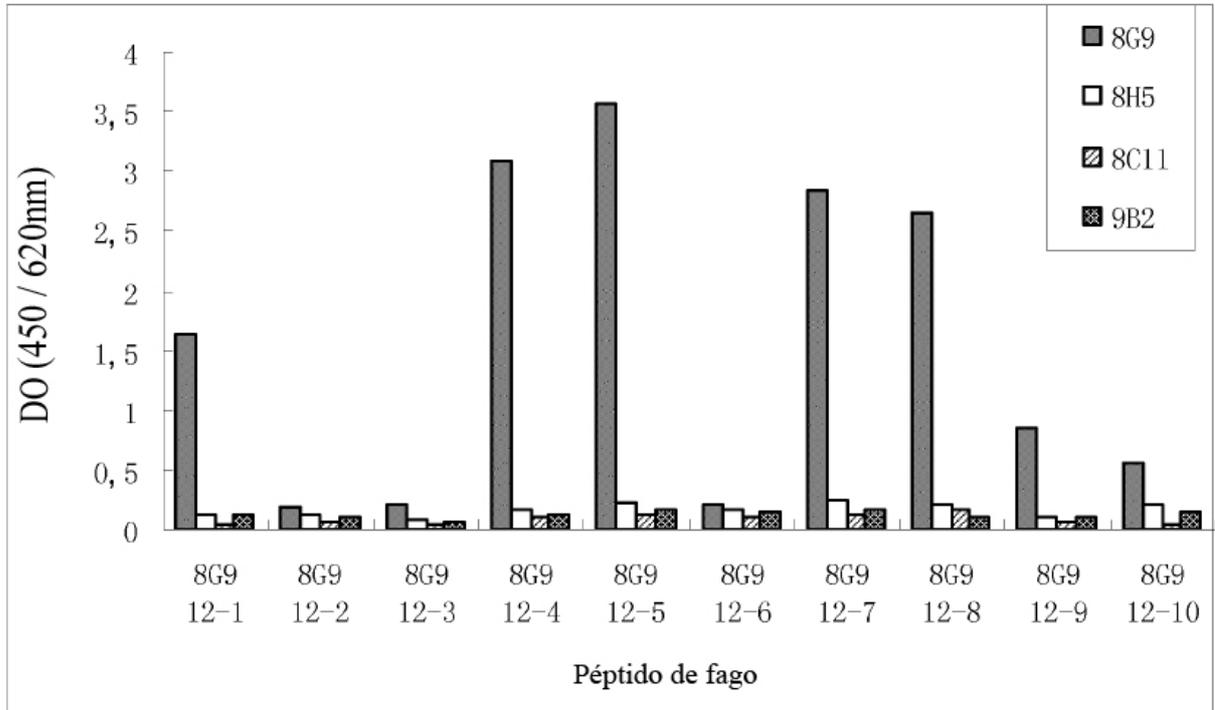


FIG. 2

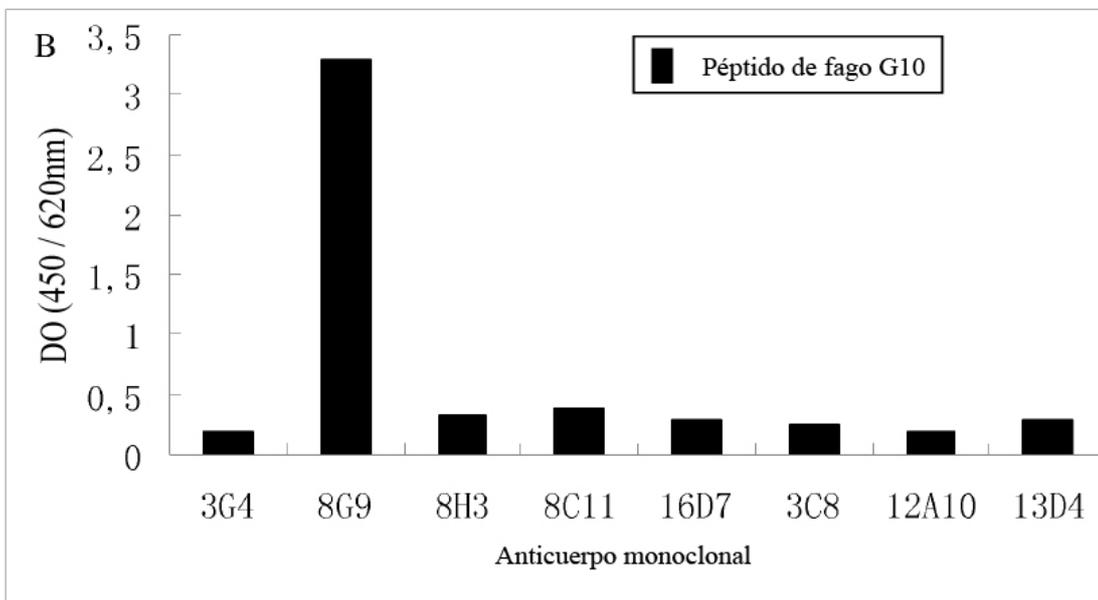
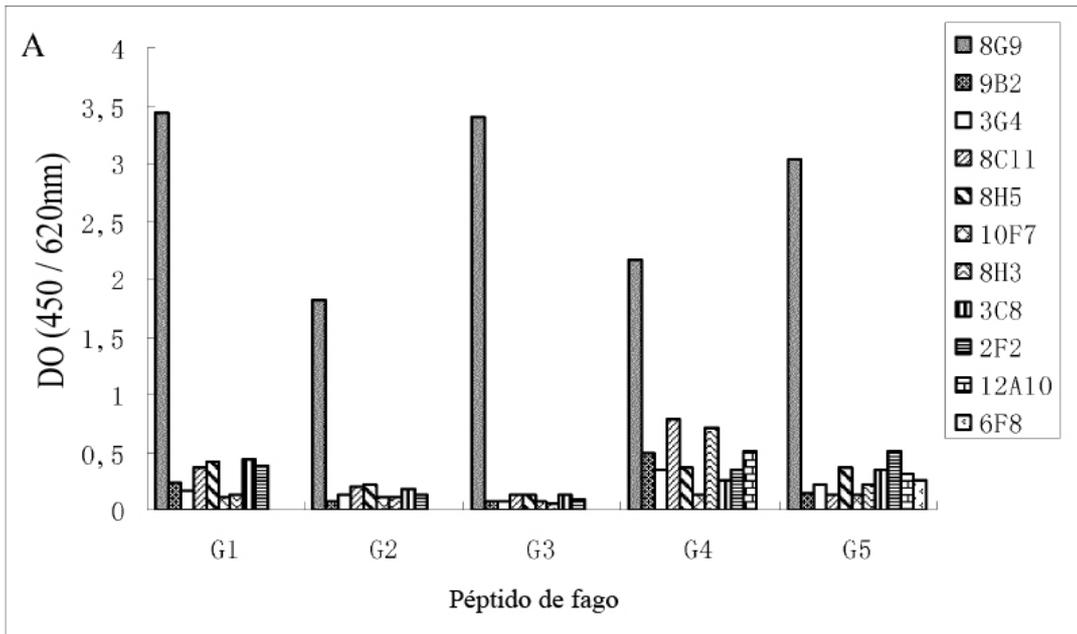


FIG. 3

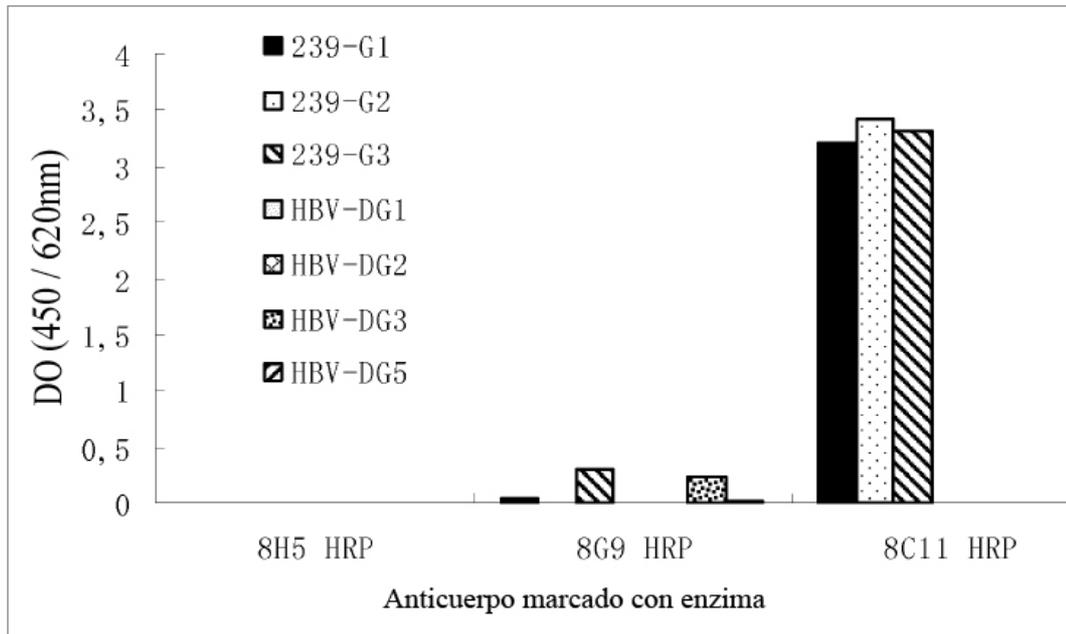


FIG. 4

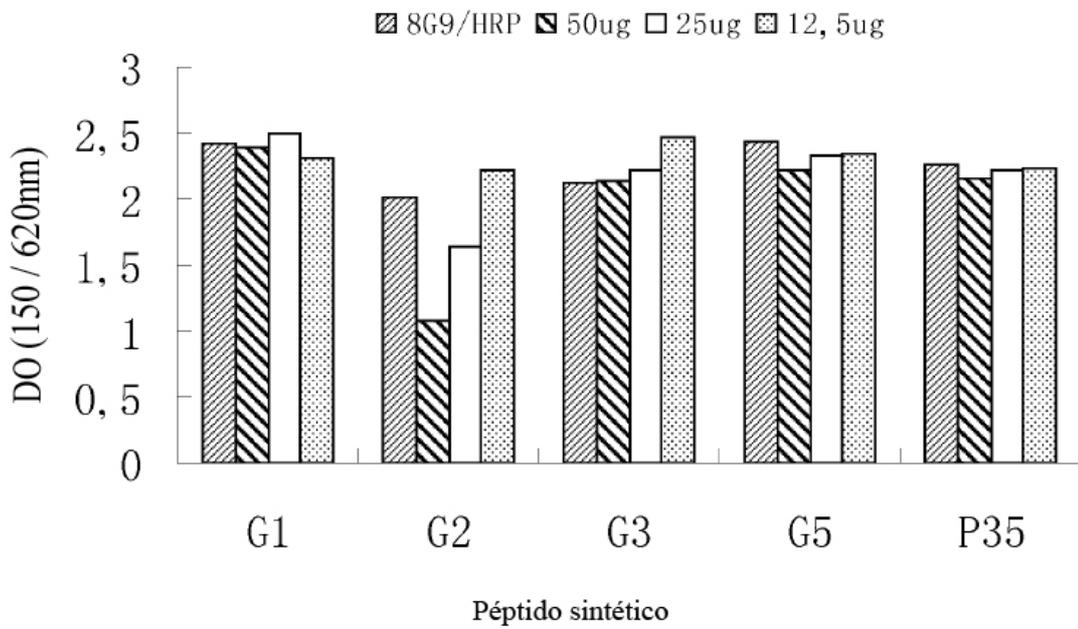


FIG. 5

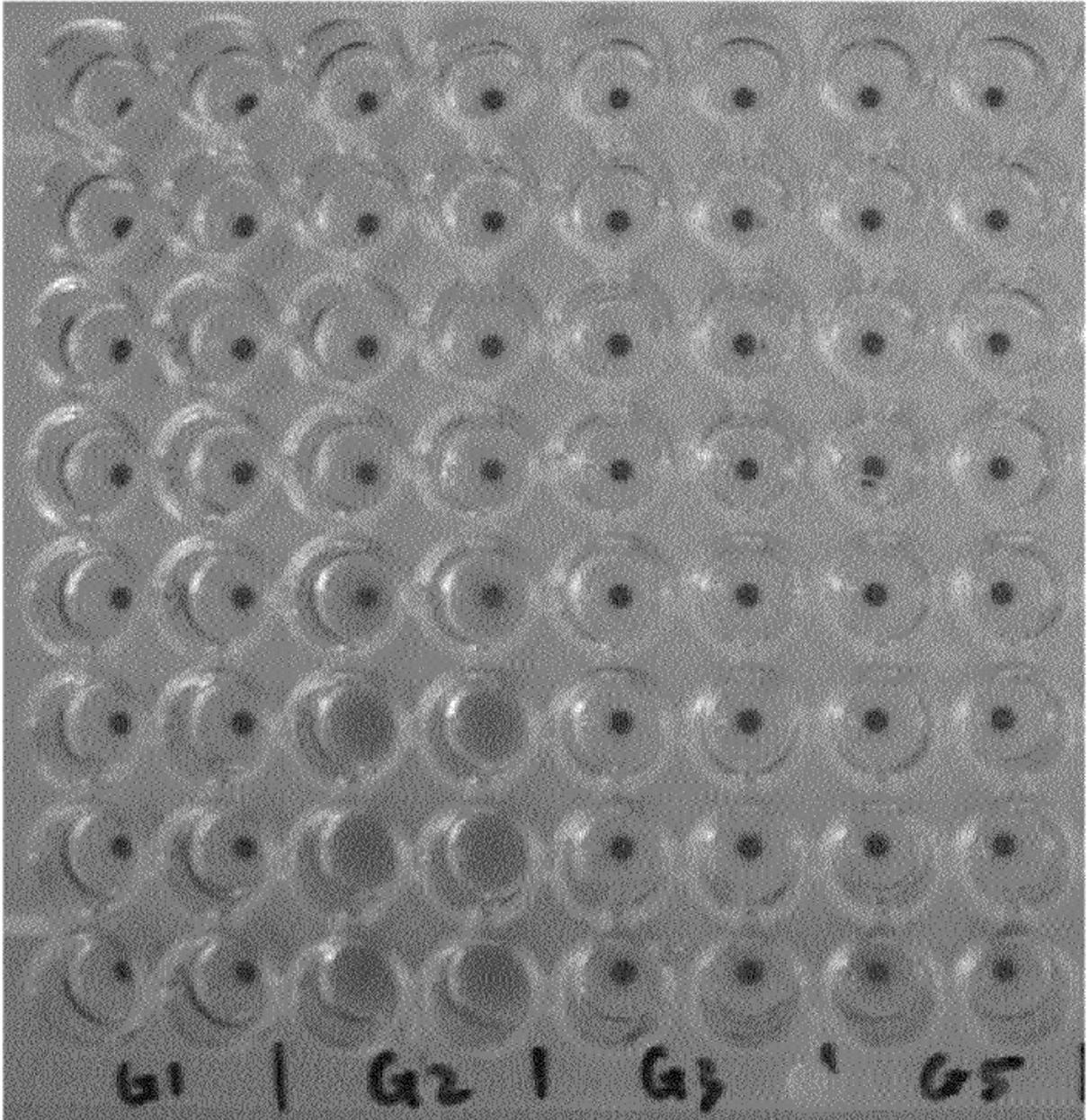


FIG. 6