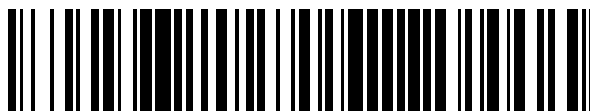


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 257**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2012 PCT/KR2012/007835**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13048153**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2012 E 12835569 (0)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2762491**

54 Título: **Molécula de unión que tiene actividad neutralizadora contra el virus de la influenza A producida a partir de células B humanas**

30 Prioridad:

30.09.2011 KR 20110099646

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

08.11.2017

73 Titular/es:

**CELLTRION, INC. (100.0%)
13-6 Songdo-dong Yeonsu-gu
Incheon 406-800, KR**

72 Inventor/es:

**CHANG, SHIN JAE;
KWON, KI SUNG;
YI, KYE SOOK;
LEE, HYUN JOO;
JEON, JAE WON;
JUN, HWANG KEUN y
CHANG, MIN SEOK**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 641 257 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

Molécula de unión que tiene actividad neutralizadora contra el virus de la influenza A producida a partir de células B humanas

5

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humano que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A, que se deriva de células B humanas seleccionadas de la sangre de pacientes que se recuperaron de la infección con el virus de la influenza A.

10

ANTECEDENTES

La influenza, una enfermedad causada por una infección respiratoria con virus de la influenza, ocurre a menudo en invierno. Se sabe que tiene una infectividad muy alta y afecta a todos los grupos de edad, particularmente a las personas mayores (Treanor J, 2004, N Engl J Med. 350 (3): 218-20). Los virus de la influenza son virus de ARN (ácido ribonucleico) envueltos pertenecientes a la familia *Orthomyxoviridae* y tienen un genoma compuesto por ocho segmentos de ARN (ácido ribonucleico) monocatenario de sentido negativo. Estos virus de influenza se clasifican en los tipos A, B y C. Los virus de la influenza A se dividen en subtipos con base en sus principales proteínas de superficie, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Hasta la fecha, se han identificado 16 HA y 9 NA (Cheung TK y Poon LL 2007, Ann N Y Acad Sci. 1102: 1-25). Los virus de la influenza pueden afectar a las aves, a los cerdos y a los seres humanos en función de sus tipos y tienen un genoma compuesto de segmentos de ARN, y por esta razón, sus genes pueden mutarse y recombinarse continuamente, dando lugar a nuevas variaciones genéticas (Treanor J, 2004. N Engl J Med 350 (3): 218-20). Debido a esta mutación continua, es difícil obtener inmunidad permanente contra los virus de la influenza y, por lo tanto, un método preventivo que actualmente se cree que es más eficaz es un método que consiste en la administración de una vacuna contra un determinado tipo de virus de influenza que se prevé que prevalecerá cada año para desarrollar inmunidad contra el virus de la influenza cada año.

15

20

25

Las vacunas contra los virus de la influenza se producen generalmente usando huevos, pero este método de producción es un método que consume mucho tiempo y es ineficiente. Por consiguiente, este método tiene el problema de que es difícil producir cantidades suficientes de vacunas cada año dentro de un marco de tiempo limitado. En un intento por resolver este problema, varias compañías farmacéuticas (GSK, Baxter, etc.) han llevado a cabo activamente estudios sobre los métodos de producción de vacunas por cultivo celular. Además, si se produce una infección pandémica por el virus de la influenza, es muy difícil desarrollar una vacuna contra la infección en poco tiempo. Además, los fármacos antivirales no son completamente confiables debido a un problema asociado con la aparición de virus mutantes resistentes a fármacos.

30

35

Para superar este problema, recientemente se han desarrollado activamente anticuerpos contra los virus de la influenza (Throsby et al, 2008, PloS One 3 (e3942), Sui et al., 2009, Nature structural & molecular biology, 16 (265-273), Simmons et al., 2007, PloS Medicine 4 (e178), Wrammert et al., 2011, J. Exp. Med. 208 (181-193), Corti et al., 2011, Science 333 (850-856)).

40

Los productos sanguíneos de pacientes recuperados se han usado para tratar pacientes infectados con diversos virus, así como para tratar infecciones pandémicas de gripe. Por ejemplo, cuando los pacientes infectados con el virus de la influenza española presentaban síntomas de neumonía, los productos sanguíneos recolectados de los pacientes que se recuperaron de la infección por el virus de la influenza se usaron para tratar el virus de la influenza (Luke et al., 2006, 599). Como tal, la globulina hiperinmune (Iglv) se purifica a partir de plasma humano y se usa para tratar pacientes infectados con diversos virus, pero el producto obtenido tal como se ha descrito anteriormente puede no estar a salvo de agentes infecciosos potenciales en sangre y es ineficiente para la producción en masa.

45

50

Las células B humanas se usan para el cribado de anticuerpos monoclonales humanos específicos. Sin embargo, la inmortalización de las células B humanas por el virus de Epstein-Barr (EBV) es menos eficiente y lleva mucho tiempo. Para superar esta deficiencia, se han desarrollado y utilizado nuevas técnicas. Una de estas técnicas es el uso de un método de RT-PCR para obtener información genética para un anticuerpo directamente de células B. Por ejemplo, hay un método que comprende la tinción de células B que expresan un anticuerpo para un antígeno específico, el aislamiento de las células B utilizando un clasificador FACS, la obtención de información genética para el anticuerpo de las células B individuales mediante un método de RT-PCR, inserción de la información genética en un vector de expresión, y transfectar el vector de expresión en células animales para producir una gran cantidad del anticuerpo. Para realizar este método de producción de una manera más fácil y más rápida, se puede usar la siguiente técnica. La nueva técnica "ensayo de matriz de inmunosiembr en un chip" (ISAAC) permite obtener un gen de anticuerpo mediante el cribado de células B individuales, que segregan un anticuerpo monoclonal específico, dentro de varias semanas (Jin et al., 2009 Nat Med 15, 1088-1092). El anticuerpo así obtenido es un anticuerpo humano natural que puede ser más eficaz en términos de asuntos inmunogénicos.

55

60

El documento WO 2011/111966 A2 divulga un anticuerpo monoclonal anti-virus de la influenza A que tiene actividad neutralizante contra al menos uno seleccionado del grupo que consiste en los subtipos del virus de la influenza A H1, H2 y H5.

5 El documento WO 2009/036157 A1 divulga una biblioteca de anticuerpos específicos del donante que comprende miembros de la biblioteca que expresan una colección de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo para un antígeno objetivo, en donde dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se derivan de un donante humano que ha sufrido o que sufre de una enfermedad que evoca la producción de anticuerpos para dicho antígeno objetivo, en donde dicha biblioteca de anticuerpos se identifica con al menos un código de barras único. El antígeno objetivo puede ser
10 un aislado de los subtipos de virus de influenza A H1, H2, H3, H5, H7 o H9.

El documento WO 2009/121004 A2 divulga una molécula que es un anticuerpo o molécula similar a un anticuerpo, en donde dicha molécula (i) neutraliza más de un subtipo y/o más de un aislado de un virus de influenza A, (ii) se une a un antígeno de hemaglutinina (HA) del virus, y (iii) no inhibe la hemaglutinación. La molécula es reactiva en forma cruzada con al menos dos antígenos de HA seleccionados del grupo que consiste en H1, H2, H3, H5, H6, H7, H8 y H9.
15

Kubota-Koketsu et al., 2009, Biochem. Biophys. Res. Commun. 387 (1) (180-185) divulgan anticuerpos anti-virus de influenza monoclonales humanos para la influenza A H1N1, para la influenza A H3N2 y para la influenza B.
20

Kashyap et al., 2008, Proc Natl. Acad. Sci. 105 (16) (5986-91) divulgan anticuerpos neutralizantes ampliamente reactivos que podrían usarse para la inmunización pasiva contra el virus H5N1 o como guías para el diseño de la vacuna.
25

El documento WO 2010/010467 A2 divulga un anticuerpo humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que neutraliza la infección de al menos dos subtipos diferentes del grupo 1 o al menos dos subtipos diferentes del grupo 2 del virus de la influenza A, en donde los subtipos del virus de la influenza A se seleccionan del grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16.
30

El documento WO 2007/134327 A2 divulga un anticuerpo neutralizante que neutraliza más de un aislado de un subtipo de virus de influenza A y/o más de un subtipo del virus de influenza A, en donde el subtipo puede ser H1, H2, H3, H5, H7 o H9.
35

PROBLEMA TÉCNICO

Un objeto de la presente invención es proporcionar una molécula de unión que tenga actividad neutralizante contra el virus de la influenza A.
40

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una molécula aislada de ácido nucleico que codifica la molécula de unión.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un vector de expresión que tenga la molécula aislada de ácido nucleico insertada en el mismo.

45 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una línea celular productora de moléculas de unión transfectada con el vector de expresión.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición que comprenda la molécula de unión.

50 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un kit para el diagnóstico del virus de la influenza A, que comprenda la molécula de unión.

SOLUCIÓN TÉCNICA

55 Con el fin de lograr los objetivos anteriores, la presente invención proporciona un anticuerpo que tiene actividad neutralizante frente al virus de la influenza A.

La presente invención también proporciona una molécula aislada de ácido nucleico que codifica el anticuerpo.

60 La presente invención también proporciona un vector de expresión que tiene la molécula aislada de ácido nucleico insertada en el mismo.

La presente invención también proporciona una línea celular productora de anticuerpos transfectada con el vector de expresión.
65

La presente invención también proporciona una composición que comprende el anticuerpo.

La presente invención también proporciona una composición para uso en la prevención y tratamiento de una enfermedad causada por un virus de la influenza A, que comprende el anticuerpo.

5 La presente invención también proporciona una composición para uso en el diagnóstico del virus de la influenza A, que comprende el anticuerpo.

La presente invención también proporciona un kit para el diagnóstico del virus de la influenza A, que comprende el anticuerpo.

10 EFECTOS BENEFICIOSOS

El anticuerpo de la presente invención tiene afinidad de unión y actividad neutralizante contra el virus de la influenza A y, por tanto, es útil para la prevención y el tratamiento de una enfermedad causada por el virus de la influenza A y también es útil para el diagnóstico de la infección por el virus de la influenza A.

15 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La Figura 1 es un conjunto de gráficos que muestran los resultados del ELISA realizado para verificar las afinidades de unión de las moléculas de unión principalmente seleccionadas para la hemaglutinina H3 (en lo sucesivo denominada "HA").

La Figura 2 muestra mapas de los vectores pCT145 (A) y pCT147 (B).

25 A: vector pCT145;
B: vector pCT147;
pac: un gen que codifica una N-acetil-transferasa de puromicina (PAC); y

DS: secuencia de simetría de la díada (EBNA1 se une al elemento de simetría de la díada (DS) en oriP).

30 La Figura 3 es un mapa de un vector de expresión que expresa el anticuerpo de la presente invención.
La Figura 4 muestra los resultados de experimentos con animales (ratón) realizados usando el anticuerpo de la presente invención.
La Figura 5 muestra los resultados de la medición del cambio de título del virus en el lavado nasal y el tejido pulmonar después de la infección con el virus de la influenza H3N2 (A/Hong-Kong/68) durante experimentos con animales (hurones) realizados usando el anticuerpo de la presente invención.
35 La Figura 6 muestra los resultados de la medición del cambio de título del virus en el lavado nasal y tejido pulmonar después de la infección con el virus de la influenza H5N1 (A/Vietnam/1203/04) durante experimentos con animales (hurones) realizados usando el anticuerpo de la presente invención.

40 MEJOR MODO

En lo sucesivo, los términos utilizados en la presente memoria se definirán como sigue.

45 El término "virus de la influenza A", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a virus envueltos pertenecientes a la familia *Orthomyxoviridae* y que tienen un genoma compuesto por ocho segmentos de ARN (ácido ribonucleico) de cadena sencilla de sentido negativo. Estos virus de la influenza se clasifican en tipos A, B y C, y los virus de la influenza A se dividen además en subtipos con base en sus principales proteínas de superficie HA (hemaglutinina) y NA (neuraminidasa). Hasta la fecha se han notificado 16 HA y 9 NA.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "virus del subtipo H3" se refiere a virus que tienen HA del subtipo H3, y por lo tanto se pretende que comprenda los virus H3N1, H3N2, H3N3, H3N4, H3N5, H3N6, H3N7, H3N8 y H3N9.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "hemaglutinina" (denominado en lo sucesivo "HA") indica la glicoproteína de la envoltura del virus de la influenza. HA media la adsorción y penetración del virus de la influenza en una célula huésped. Hasta la fecha se han notificado 16 subtipos de HA.

60 El término "pacientes recuperados o completamente recuperados" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a pacientes que eran positivos para el virus de la influenza A debido a la infección por el virus de la influenza A, pero son negativos para el virus de la influenza A en la sangre después de un período de tiempo dado.

65 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "molécula de unión" se refiere a una inmunoglobulina intacta que comprende anticuerpos monoclonales, tales como, anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados o humanos, o a un fragmento que se une al antígeno o que comprende un dominio variable de una inmunoglobulina que compete con la inmunoglobulina intacta por la unión específica con el compañero de unión de la inmunoglobulina, por ejemplo, la HA monomérica o la HA trimérica del virus de la influenza A. Independientemente

de la estructura, el fragmento de unión al antígeno se une con el mismo antígeno que es reconocido por la inmunoglobulina intacta. Un fragmento de unión al antígeno puede comprender un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 2, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200 o 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de la molécula de unión. Los fragmentos de unión al antígeno comprenden, entre otros, fragmentos Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, dAb, Fd, fragmentos de la región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios bivalentes, anticuerpos de fago de cadena única, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, polipéptidos que contienen al menos un fragmento de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión específica del antígeno al polipéptido, etc. Los fragmentos anteriores pueden ser producidos sintéticamente o por escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas o pueden ser modificados genéticamente por técnicas de ADN recombinante. Los métodos de producción son bien conocidos en la técnica.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sustancia inerte que se combina con una molécula activa tal como un fármaco, agente o molécula de unión para preparar una forma de dosificación agradable o conveniente. El excipiente farmacéuticamente aceptable es un excipiente que no es tóxico para los receptores en las dosificaciones y concentraciones usadas, y es compatible con otros ingredientes de la formulación que comprende el fármaco, agente o molécula de unión.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de la molécula de unión que es eficaz para prevenir o tratar una afección resultante de la infección con el virus de la influenza A.

A continuación, se describirá en detalle la presente invención.

Los presentes inventores aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre recolectada de pacientes que se recuperaron de la infección con el virus de la influenza A. Las células B que producen anticuerpos monoclonales contra el subtipo H1 de HA se seleccionaron a partir de las PBMC aisladas usando el método ISAAC. La información genética para producir anticuerpos monoclonales contra HA en las células B seleccionadas se obtuvo mediante un procedimiento de RT-PCR y se insertó en vectores pcADN. Los vectores se transfectaron en una línea celular CHO, y después se seleccionaron principalmente 82 anticuerpos. Para medir con mayor precisión la afinidad de unión a HA, todos los anticuerpos insertados en el vector pcADN se transfectaron en células F2N humanas, y los anticuerpos generados a partir de las células transfectadas se analizaron comparativamente mediante HA-ELISA utilizando la HA monomérica y la HA trimérica del subtipo H3 como antígenos, seleccionando así secundariamente 6 anticuerpos (anticuerpos CT129, CT135, CT147, CT149, CT163 y CT166) que reaccionan con la HA trimérica en un grado mayor que con la HA monomérica. Con el fin de examinar las actividades neutralizantes de los anticuerpos seleccionados contra diversos virus de la influenza, se realizó un ensayo de microneutralización (denominado en lo sucesivo "ensayo MN") y un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (denominado en lo sucesivo "ensayo HI"). Varios de los anticuerpos presentaron actividades neutralizantes altas o bajas contra diversos virus de influenza, pero todos los anticuerpos mostraron una reacción negativa en el ensayo HI. A través del ensayo MN, se seleccionó el anticuerpo CT149 que mostraba actividad neutralizante contra diversos virus. El gen del anticuerpo seleccionado se insertó en el vector de expresión MarEx que tenía una alta eficacia de expresión de anticuerpos y, a continuación, se transfectó el vector en células F2N. El anticuerpo derivado de las células transfectadas se sometió al ensayo MN para virus de influenza más diversos. Como resultado, se demostró que el anticuerpo CT149 tenía actividad neutralizante, no solo los virus de los subtipos H1 y H3, sino también los virus de los subtipos H5, H7 y H9 (véase la Tabla 4). Además, en experimentos con animales llevados a cabo utilizando el virus de la influenza de subtipo H3, el anticuerpo CT149 exhibió excelentes efectos preventivos y terapéuticos contra la infección por H3N2 (véase la Figura 4). Con base en los resultados anteriormente descritos, los presentes inventores han completado una invención relativa a un anticuerpo monoclonal anti-virus de la influenza A que protege contra la infección por el virus de la influenza A.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A.

En la presente invención, el anticuerpo se une a HA en la superficie del virus de la influenza A. Además, el anticuerpo se deriva preferiblemente de células B presentes en la sangre de pacientes que se recuperaron de una infección con el subtipo H1N1 del virus de la influenza A.

Particularmente, el anticuerpo CT149 tiene actividad neutralizante no sólo contra los virus de influenza del grupo 1 (H1, H5 y H9), sino también contra los virus de influenza del grupo 2 (H3 y H7).

En la presente invención, el virus de la influenza A puede ser del subtipo H1N1, y el subtipo H1N1 del virus de la influenza A puede ser A/Ohio/07/2009. Además, el virus de la influenza A puede ser del subtipo H5N1 y el subtipo H5N1 del virus de la influenza A puede ser A/Vietnam/1203/04 x PR8. Además, el virus de la influenza A puede ser del subtipo H7N2 y el subtipo H7N2 del virus de la influenza A puede ser A/pavo/Virginia/02 x PR8. Además, el virus de la influenza A puede ser del subtipo H9N2, y el subtipo H9N2 del virus de la influenza A puede ser uno cualquiera o más seleccionados del grupo que consiste en A/trullo de alas verdes/209/TX/2009 y A/ck/HK/G9/97 x PR8.

Además, en la presente invención, el virus de la influenza A puede ser del subtipo H3N2, y el subtipo H3N2 del virus de la influenza A puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en A/Brisbane/10/07, A/Wisconsin/67/05, A/Wyoming/3/03.rg, A/Beijing/353/89-X109, A/Beijing/32/92-R-H3, A/Johannesburgo/33/94 R-H3, A/Nanchang/933/95, A/Sydney/5/97 y A/Panamá/2007/99.

En la presente invención, las regiones determinantes de complementariedad (CRD) de dominios variables se determinaron usando un método convencional de acuerdo con el sistema diseñado por Kabat et al. (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (5^a), National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). La numeración de CDR utilizada en la presente invención se realizó de acuerdo con el método de Kabat, pero la presente invención también abarca moléculas de unión que comprenden CDR determinadas por otros métodos, que comprenden el método de IMG, el método de Chothia y el método de AbM.

La presente invención proporciona un anticuerpo que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A, que comprende cualquier secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias polipeptídicas: una molécula de unión compuesta de una cadena ligera que comprende, como se determina de acuerdo con Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 1, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 2, y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 3, y una cadena pesada que comprende, como se determina de acuerdo con Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 4, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 5, y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 6; una molécula de unión compuesta de una cadena ligera que comprende, como se determina de acuerdo con el método de Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 7, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 8 y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 9, y una cadena pesada que comprende, como se determina de acuerdo con el método de Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 10, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 11 y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 12; una molécula de unión compuesta de una cadena ligera que comprende, como se determina de acuerdo con el método de Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 13, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 8 y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 9, y una cadena pesada que comprende, como se determina de acuerdo con el método de Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 10, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 14 y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 6; y una molécula de unión compuesta de una cadena ligera que comprende, como se determina de acuerdo con el método de Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 15, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 16 y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada que comprende, como se determina de acuerdo con el método de Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 10, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 17 y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 12.

En la presente invención, el anticuerpo está compuesto preferiblemente de una cadena ligera que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 37, y una cadena pesada que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 38.

En la presente invención, el anticuerpo está compuesto preferiblemente de una cadena ligera que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 39, y una cadena pesada que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 40.

En la presente invención, el anticuerpo está compuesto preferiblemente de una cadena ligera que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 41, y una cadena pesada que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 42.

Además, el anticuerpo está compuesto preferiblemente de una cadena ligera que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 43, y una cadena pesada que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 44.

El anticuerpo tiene preferiblemente actividad neutralizante frente a cualquier otro seleccionado del grupo que consiste en los subtipos del virus de la influenza A H1, H3, H5, H7 y H9. Además, el subtipo H3 del virus de la influenza A es preferiblemente H3N2, pero no se limita a este.

El anticuerpo es preferiblemente un fragmento Fab, fragmentos Fv, un diacuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. Además, la presente invención abarca todos los fragmentos de anticuerpos que tienen la capacidad de unirse a la HA del virus de la influenza A y que se unen a la HA competitivamente con el anticuerpo de la presente invención. Además, la presente invención también abarca variantes funcionales del anticuerpo. Si las variantes del anticuerpo pueden completarse con el anticuerpo de la presente invención para unirse específicamente al subtipo H3 del virus de la influenza A, o fragmentos de los mismos, se consideran como variantes funcionales del anticuerpo de la presente invención. Específicamente, si las variantes funcionales pueden unirse al virus de la influenza A subtipo HA o sus fragmentos y tienen actividad neutralizadora contra tal HA o fragmentos, se consideran como las variantes funcionales de la presente invención.

Las variantes funcionales comprenden, pero no se limitan a, derivados que son sustancialmente similares en la secuencia estructural primaria, que contienen, por ejemplo, modificaciones *in vitro* o *in vivo*, químicas y/o

bioquímicas, que no se encuentran en el anticuerpo progenitor de la presente invención. Tales modificaciones comprenden, por ejemplo, acetilación, acilación, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, entrecruzamiento, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, hidroxilación, metilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, y similares.

Alternativamente, las variantes funcionales pueden ser moléculas de unión que comprenden una secuencia de aminoácidos que contiene sustituciones, inserciones, supresiones o combinaciones de las mismas de uno o más aminoácidos comparado con las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos progenitores. Además, las variantes funcionales pueden comprender truncamientos de la secuencia de aminoácidos en uno o ambos terminales amino o carboxilo. Las variantes funcionales de acuerdo con la presente invención pueden tener las mismas o diferentes afinidades de unión, mayores o menores, en comparación con el anticuerpo monoclonal progenitor, pero son todavía capaces de unirse al virus HA de la influenza A o fragmentos de las mismas. Por ejemplo, las variantes funcionales de acuerdo con la invención pueden tener afinidades de unión aumentadas o disminuidas para el virus HA de la influenza A, o fragmentos de las mismas, en comparación con los anticuerpos progenitores de la presente invención.

Preferiblemente, se modifican las secuencias de aminoácidos de las regiones variables, que comprenden, pero sin limitarse a, regiones marco, regiones hipervariables, en particular las regiones CDR3. Generalmente, las regiones de cadena ligera o de cadena pesada comprenden tres regiones hipervariables, que comprenden tres CDR, y regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Las regiones hipervariables comprenden residuos de aminoácidos de CDR y residuos de aminoácidos de bucles hipervariables. Las variantes funcionales destinadas a caer dentro del alcance de la presente invención tienen al menos aproximadamente 50-99%, preferiblemente al menos aproximadamente 60-99%, más preferiblemente al menos aproximadamente 80-99%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 90-99%, en particular al menos aproximadamente 95-99%, y en particular al menos aproximadamente 97-99% de homología de secuencia de aminoácidos con el anticuerpo monoclonal progenitor como se define en la presente memoria. Los algoritmos informáticos tales como Gap o Mejor ajuste conocidos por un experto en la técnica pueden usarse para alinear óptimamente las secuencias de aminoácidos a comparar y para definir residuos de aminoácidos similares o idénticos. Pueden obtenerse variantes funcionales alterando los anticuerpos monoclonales progenitores o partes de los mismos por métodos de biología molecular general conocidos en la técnica que comprenden PCR, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos y mutagénesis dirigida al sitio, o mediante métodos de síntesis orgánica, pero no se limitan a ellos.

La presente invención también proporciona una molécula aislada de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la presente invención.

La molécula de ácido nucleico de la presente invención abarca todas las moléculas de ácido nucleico obtenidas traduciendo las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos de la presente invención en secuencias de polinucleótidos de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por consiguiente, pueden prepararse diversas secuencias de polinucleótidos con marcos de lectura abiertos (ORF) y también están comprendidas dentro del alcance de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención.

La presente invención también proporciona un vector de expresión que tiene la molécula aislada de ácido nucleico insertada en el mismo. El vector de expresión se puede derivar preferiblemente de cualquiera seleccionado del grupo que consiste en, pero no limitado a, un vector de expresión MarEx producido por Celltrion Inc. (Corea), un vector de pcADN comercialmente ampliamente disponible, vectores F, R1, RP1, Col, pBR322, ToL, Ti; cósmidos; fagos tales como lambda, lambdaoide, M13, Mu, P1, P22, Q μ , T-par, T2, T4, T7, etc.; y virus de plantas. Se puede usar cualquier vector de expresión conocido por los expertos en la técnica en la presente invención, y la elección del vector de expresión depende de la naturaleza de la célula huésped de elección. La introducción del vector en células huésped puede efectuarse mediante, pero sin limitarse a, transfección con fosfato cálcico, infección por virus, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección con lipofectamina o electroporación y cualquier experto en la técnica puede seleccionar y utilizar un método de introducción adecuado para el vector de expresión y la célula huésped utilizados. Preferiblemente, el vector contiene uno o más marcadores seleccionables, pero no está limitado a los mismos, y puede usarse también un vector que no contiene un marcador seleccionable. La elección de los marcadores seleccionables puede depender de las células huésped de elección, aunque esto no es crítico para la presente invención como es bien conocido por los expertos en la técnica.

Para facilitar la purificación de la molécula de ácido nucleico de la presente invención, se puede insertar una secuencia de una etiqueta en el vector de expresión. Ejemplos de la etiqueta comprenden, pero no se limitan a, una etiqueta de hexa-histidina, una etiqueta de hemaglutinina, una etiqueta myc o una etiqueta FLAG. Cualquier etiqueta que facilite la purificación, conocida por los expertos en la técnica, se puede usar en la presente invención.

La presente invención también proporciona una línea celular que produce un anticuerpo que tiene actividad neutralizante frente al virus de la influenza A, teniendo la línea celular el vector de expresión descrito anteriormente transfectado en la misma.

En la presente invención, la línea celular puede comprender células de mamífero, de plantas, célula de insecto, de origen fúngico o bacteriano, pero no se limita a ellas. Como célula de mamífero, se usa preferiblemente como célula

huésped cualquiera seleccionada del grupo que consiste en, pero sin limitarse a, células CHO, células F2N, células COS, células BHK, células de melanoma de Bowes, células HeLa, células 911, células HT1080, células A549, células HEK 293 y células HEK293T. Cualquier célula utilizable como célula huésped de mamífero, conocida por los expertos en la técnica, se puede usar en la presente invención.

5 La presente invención también proporciona una composición que comprende el anticuerpo anteriormente descrito.

La composición de la presente invención puede comprender, además del anticuerpo que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A, un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica.

10 La presente invención también proporciona una composición para uso en la prevención y tratamiento de una enfermedad causada por el virus de la influenza A, comprendiendo la composición el anticuerpo anteriormente descrito.

15 La composición preventiva y terapéutica de la presente invención puede comprender, además del anticuerpo que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A, un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica.

20 Además, la composición preventiva y terapéutica de la presente invención puede comprender al menos otros cinco agentes terapéuticos. La composición preventiva y terapéutica de la presente invención puede comprender diversos anticuerpos monoclonales que se unen al virus HA de la influenza A o fragmentos de los mismos y, por tanto, pueden presentar un efecto sinérgico sobre la actividad neutralizante.

25 Además, la composición preventiva y terapéutica de la presente invención puede comprender además uno o más agentes terapéuticos o agentes de diagnóstico. Los agentes terapéuticos comprenden, pero no se limitan a, fármacos antivirales. Ejemplos de tales fármacos comprenden anticuerpos, moléculas pequeñas, compuestos orgánicos o inorgánicos, enzimas, secuencias de polinucleótidos, péptidos antivirales, etc.

30 La composición preventiva y terapéutica de la presente invención debe ser estéril y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Además, puede estar en forma de polvo para reconstituirse en un excipiente farmacéuticamente aceptable apropiado antes o en el momento del suministro. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secados al vacío y liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo y cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del polvo previamente esterilizada. Alternativamente, la composición de la presente invención puede estar en solución y un excipiente farmacéuticamente aceptable apropiado puede ser añadido y/o mezclado antes o en el momento del suministro para proporcionar una forma inyectable de dosificación unitaria. Preferiblemente, el excipiente farmacéuticamente aceptable que se usa en la presente invención es adecuado para una alta concentración de fármaco, puede mantener una fluidez adecuada y, si es necesario, puede retrasar la absorción.

40 La elección de la vía óptima de administración de la composición preventiva y terapéutica de la presente invención estará influenciada por varios factores que comprenden las propiedades fisicoquímicas de las moléculas activas dentro de la composición, la urgencia de la situación clínica y la relación de las concentraciones en plasma de las moléculas activas con respecto al efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, el anticuerpo de la presente invención se puede preparar con vehículos que los protegerán contra liberación rápida, tales como formulaciones de liberación controlada, que comprenden implantes y sistemas de administración microencapsulados. En la presente invención se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de vinil etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Además, el anticuerpo de la presente invención puede recubrirse o coadministrarse con un material o compuesto que evita la inactivación del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo de la presente invención puede administrarse junto con un vehículo apropiado, por ejemplo, liposoma o un diluyente.

45 Las vías de administración de la composición preventiva y terapéutica de la presente invención se pueden dividir en vías oral y parenteral. La vía de administración preferida es una vía intravenosa, subcutánea o intranasal, pero no está limitada a las mismas.

50 Las formas de dosificación oral se pueden formular como comprimidos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas o aceitosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras, cápsulas de gelatina blanda, jarabes o elixires, pastillas, grageas, líquidos, geles o suspensiones. Estas formulaciones pueden contener excipientes farmacéuticos que comprenden, pero sin limitación, diluyentes inertes, agentes de granulación y desintegrantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, conservantes, agentes colorantes, agentes saborizantes o edulcorantes, aceites vegetales o minerales, agentes humectantes y agentes espesantes.

60 Las formulaciones para administración parenteral pueden estar en forma de soluciones o suspensiones para inyección o infusión no tóxicas estériles isotónicas acuosas o no acuosas. Las soluciones o suspensiones pueden comprender agentes que no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas tales

como 1,3-butanodiol, solución de Ringer, solución de Hank, solución isotónica de cloruro sódico, aceites, ácidos grasos, agentes anestésicos locales, conservantes, reguladores, agentes de aumento de la viscosidad o solubilidad, antioxidantes solubles en agua, antioxidantes solubles en aceite y agentes quelantes de metales.

5 La presente invención también proporciona una composición para uso en el diagnóstico del virus de la influenza A, que comprende un conjugado que comprende una etiqueta unida al anticuerpo descrito anteriormente que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A.

10 La composición para el diagnóstico de acuerdo con la presente invención comprende al menos una etiqueta detectable, tal como una fracción/agente detectable. La etiqueta puede unirse de forma no covalente al anticuerpo de la presente invención. La etiqueta también puede estar enlazada directamente al anticuerpo mediante unión covalente. Alternativamente, la etiqueta también puede estar unida al anticuerpo por medio de uno o más compuestos de enlace. Las técnicas para unir la etiqueta al anticuerpo son bien conocidas por los expertos en la técnica. La fracción o agente detectable como etiqueta es preferiblemente cualquiera seleccionado del grupo que
15 consiste en enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales que emiten positrones y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos, pero no está limitado a los mismos.

20 El anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede utilizarse en un método para el tratamiento de una enfermedad causada por el virus de la influenza A, comprendiendo el método administrar a un sujeto que tiene la enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A.

25 En el método terapéutico, el virus de la influenza A es preferiblemente cualquiera seleccionado del grupo que consiste en subtipos H1, H3, H5, H7 y H9, y el subtipo H3 del virus de la influenza A es preferiblemente H3N2, pero no está limitado a los mismos.

30 En el método terapéutico, cualquier agente terapéutico conocido por los expertos en la técnica puede administrarse junto con el anticuerpo de la presente invención.

35 En el método terapéutico, la enfermedad causada por el virus de la influenza A puede ser cualquiera seleccionada del grupo que consiste en una nueva cepa de gripe, gripe pandémica y gripe estacional, pero no se limita a ellas.

40 En el método terapéutico, la dosis del anticuerpo que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A puede ajustarse para proporcionar la respuesta óptima. La dosis es, por ejemplo, 0,01-200 mg/kg, preferiblemente 0,1-150 mg/kg, y más preferiblemente 1-100 mg/kg, pero no se limita a la misma. Pueden administrarse varias dosis diarias, o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente, según lo indicado por las exigencias de la situación de un individuo. El modo de administración no está limitado y puede ser decidido por el médico tratante.

45 En el método terapéutico, las vías de administración del anticuerpo que tiene actividad neutralizante frente al virus de la influenza A se pueden dividir en vías de administración oral y parenteral. La vía de administración preferida es una vía intravenosa, pero no se limita a ella.

50 El anticuerpo de acuerdo con la presente invención también puede usarse en un método para la prevención de una enfermedad causada por el virus de la influenza A, comprendiendo el método administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A.

55 En el método preventivo, cualquier agente preventivo conocido por los expertos en la técnica puede administrarse junto con el anticuerpo de la presente invención.

60 En el método preventivo, la dosis del anticuerpo que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A puede ajustarse para proporcionar la respuesta óptima. La dosis es, por ejemplo, 0,01-200 mg/kg, preferiblemente 0,1-150 mg/kg, y más preferiblemente 1-100 mg/kg, pero no se limita a la misma. Pueden administrarse varias dosis diarias, o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente, según lo indicado por las exigencias de la situación de un individuo. El modo de administración no está limitado y puede ser decidido por el médico tratante.

65 En el método preventivo, las vías de administración del anticuerpo que tiene actividad neutralizante frente al virus de la influenza A se pueden dividir en vías de administración oral y parenteral. La vía de administración preferida es una vía intravenosa, pero no está limitada a la misma.

El anticuerpo de acuerdo con la presente invención también se puede usar en un método para el diagnóstico de la infección por el virus de la influenza A de un paciente, comprendiendo el método las etapas de: 1) poner una muestra en contacto con el anticuerpo de la invención que tiene actividad neutralizante contra virus de la influenza A; y 2) detectar una reacción entre la molécula de unión y la muestra. Además, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención también puede usarse en un método para el diagnóstico de la infección por el virus de la

influenza A de un paciente, comprendiendo el método las etapas de: 1) poner una muestra en contacto con la composición de diagnóstico de la presente invención; y 2) detectar una reacción entre el anticuerpo y la muestra.

5 En el método de diagnóstico, el virus de la influenza A es preferiblemente uno seleccionado del grupo que consiste en los subtipos H1, H3, H5, H7 y H9, y el subtipo H3 del virus de la influenza A es preferiblemente H3N2, pero no está limitado a ellos.

10 En el método de diagnóstico, el anticuerpo de la presente invención puede estar, si es necesario, enlazado con una etiqueta para el diagnóstico y la detección de acuerdo con cualquier método conocido por los expertos en la técnica.

15 En el método de diagnóstico, la muestra es preferiblemente cualquiera seleccionada del grupo que consiste en flema, esputo, sangre, célula pulmonar, moco de tejido pulmonar, tejido respiratorio y saliva, pero no se limita a ellas. La muestra se puede preparar de acuerdo con cualquier método convencional conocido por los expertos en la técnica.

20 En el método de diagnóstico, el método para detectar la reacción puede ser uno seleccionado del grupo consistente en inmunoensayos de unión homogéneos y heterogéneos, tales como radioinmunoanálisis (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, FACS, BIACORE y transferencia Western, pero no se limita a ellos, y cualquier método de detección conocido por los expertos en la técnica puede ser utilizado en la presente invención.

25 La presente invención también proporciona un kit para el diagnóstico del virus de la influenza A, comprendiendo el kit: 1) el anticuerpo de la invención que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A; y 2) un recipiente.

Además, la presente invención proporciona un kit para el diagnóstico del virus de la influenza A, comprendiendo el kit: 1) la composición de la invención para el diagnóstico del virus de la influenza A; y 2) un recipiente.

30 En el kit de diagnóstico de la presente invención, el virus de la influenza A es preferiblemente cualquiera seleccionado del grupo que consiste en los subtipos H1, H3, H5, H7 y H9, y el subtipo H3 del virus de la influenza A es preferiblemente H3N2, pero es no limitado a ellos.

35 En el kit de diagnóstico de la presente invención, el recipiente 2) comprende un soporte sólido. El anticuerpo de la presente invención se puede unir a un soporte sólido, y este soporte sólido puede ser poroso o no poroso, plano o no plano.

Ejemplos

40 Ejemplo 1: Aislamiento de PBMC de sangre de pacientes que se recuperaron de la gripe

45 Un grupo de pacientes recuperado consistió en pacientes voluntarios que fueron 2-4 semanas después de la confirmación de nuevas infecciones de la influenza. Se confirmó que los voluntarios no tenían virus de influenza (H1N1) en su sangre y tenían un anticuerpo contra el nuevo virus de la influenza. Este estudio fue realizado bajo la aprobación de la Junta de Revisión Institucional (IRB). Este grupo de pacientes tenía las siguientes características: (1) los pacientes no fueron vacunados contra la influenza estacional; (2) los pacientes eran negativos para otros virus infecciosos, es decir, HBsAg, y eran negativos para el anticuerpo anti-VHC y el anticuerpo anti-VIH; (3) el plasma del paciente era negativo para la RT-PCR para el subtipo H1N1 del virus de la influenza; (4) el suero del paciente mostró un título de 1:160 o superior en ensayos ELISA para la HA monomérica (H1N1) del subtipo H1N1 del virus de la influenza A. Se recogieron aproximadamente 100 mL de sangre completa de los voluntarios y se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la sangre recogida usando Lymphoprep^{MR} (Axis-Shield, Noruega, 1114545). Las PBMC aisladas se lavaron tres veces con solución salina regulada con fosfato, se suspendieron en medio de congelación KM banker II (Cosmobio, Japón, KOJ-16092010) a una concentración de 2×10^7 células/mL y se almacenaron en un depósito de nitrógeno líquido.

55 Ejemplo 2: Selección primaria de anticuerpos monoclonales

60 Las células B que secretaban anticuerpos específicos del antígeno se seleccionaron usando el método descrito por Jin et al. (Jin A. et al., 2009. Nat Med 15, 1088-1092). Brevemente, las PBMC aisladas en el Ejemplo 1 se añadieron a cada pozo de un chip de microarreglo preparado a una densidad de una célula/pozo. Los anticuerpos secretados a partir de las células individuales fueron confirmados por el anticuerpo anti-IgG humano previamente recubierto. Si las células secretoras de anticuerpo seleccionadas secretaron anticuerpos de unión a HA, se examinaron usando el antígeno HA marcado. Las secuencias completas de los genes de cadena pesada y de cadena ligera de los anticuerpos de las células individuales secretoras de anticuerpos se obtuvieron mediante una reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR). Los ADN obtenidos de cadena pesada y de cadena ligera se insertaron en vectores de expresión pcADN 3.1(+) (Invitrogen, EE.UU., V790-20) para preparar vectores de expresión que producen cada una de las cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos. Los vectores de

expresión preparados se cotransfectaron en células CHO. A continuación, utilizando los anticuerpos derivados de las células CHO transfectadas, se seleccionaron principalmente 82 anticuerpos que se unen a HA mediante el método HA-ELISA descrito en el Ejemplo 3 a continuación. En el presente documento, todos los anticuerpos que mostraban una reacción con HA se seleccionaron principalmente sin diluir en serie las muestras de anticuerpo.

5

Ejemplo 3: Verificación de la capacidad de los anticuerpos monoclonales para unirse a HA

Con el fin de detectar secundariamente los anticuerpos monoclonales, que tienen una alta capacidad para unirse a la HA del virus de la influenza H3N2, de los 82 anticuerpos primariamente seleccionados, se realizó HA-ELISA utilizando la subunidad (HA1) de HA monomérica y la HA trimérica. Se adquirió una subunidad HA1 monomérica recombinante (11056-V08H1) del virus de la influenza A a través de Sino Biological Inc. (China). La subunidad HA1 adquirida consistió del fragmento del extremo terminal N (Met1-Arg345) de la HA que comprende residuos de polihistidina en el extremo terminal C y se derivó de células humanas transfectadas. La HA trimérica recombinante (FR-61) fue proporcionada por IRR (Influenza Reagent Resource, EE.UU.). La HA trimérica comprendía un sitio de escisión de trombina en el extremo terminal C, un dominio de trimerización (faldón) y seis residuos de histidina y se produjo usando un sistema de baculovirus.

La reactividad del anticuerpo con el antígeno de HA se midió mediante ELISA utilizando la HA y el anticuerpo. Específicamente, se adsorbió primero 50 μ L de antígeno HA trimérica (250 ng/mL) sobre cada pozo de una placa de microtitulación de 96 pozos (Nunc, Dinamarca, 449824). La placa se bloqueó con solución salina regulada con fosfato (Teknova, EE.UU., D5120) que contenía albúmina de suero bovino al 1% (BSA), y después se añadió una muestra de anticuerpo diluida en serie 3 veces (concentración inicial: 1 μ g/mL) a cada pozo de la placa. A continuación, la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se trató con anticuerpo gamma antihumano de cabra marcado con peroxidasa (Zymed, EE.UU., 62.8420). Después de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, la placa se incubó con tetrametilbencidina (TMB, Sigma-Aldrich, EE.UU., T0440), y la incubación se detuvo añadiendo HCl 1N. La absorbancia a 450/570 nm se midió usando un lector de placas (Spectramax plus 384, Molecular Device) y la reactividad antígeno-anticuerpo se expresó gráficamente utilizando el programa Graphpad prism (GraphPad Software Inc. EE.UU.).

La mayoría de los anticuerpos no se unieron a la HA de H3N2, pero como se muestra en la Figura 1, los anticuerpos CT129, CT135, CT147, CT149, CT164 y CT166 mostraron altas afinidades de unión. Particularmente, estos anticuerpos se unieron fácilmente a la HA trimérica, pero no se unieron a la subunidad HA1. Esto sugiere que los anticuerpos seleccionados no se unen al epítipo de HA1 previamente conocido, sino que tienen la capacidad de unirse solamente al límite entre los segmentos HA1 y HA2, o a HA2 o a HA con una conformación normal.

Sobre la base de los resultados mostrados en la Figura 1, de los 82 anticuerpos primariamente seleccionados, se seleccionaron secundariamente 6 anticuerpos (anticuerpos CT129, CT135, CT147, CT149, CT164 y CT166) que mostraban altas afinidades de unión para la HA trimérica del virus de la influenza H3N2. Con el fin de aumentar los niveles de expresión de los anticuerpos secundariamente seleccionados, estos genes de anticuerpos fueron clonados nuevamente a partir de los vectores pcADN en vectores de expresión MarEx (construidos y patentados por Celltrion, Inc.) de la siguiente manera. Después de clonar nuevamente, los vectores de expresión MarEx que contenían los genes de anticuerpo se usaron para producir anticuerpos requeridos para un ensayo de microneutralización (ensayo MN) y ensayo de inhibición de hemaglutinación (ensayo HI).

Los vectores pcADN originales que contenían cada uno de los genes de cadena pesada y genes de cadena ligera de los seis anticuerpos secundariamente seleccionados se trataron con las enzimas de restricción *NheI* y *PmeI* para obtener genes de cadena pesada y genes de cadena ligera. Los genes de cadena pesada y los genes de cadena ligera obtenidos se insertaron respectivamente en vectores pCT145 y vectores pCT147, que habían sido tratados con las mismas enzimas de restricción. Los vectores pCT145 y pCT147 fueron construidos por Celltrion, Inc., con el fin de clonar la cadena pesada y la cadena ligera de cada uno de los anticuerpos, respectivamente (Figura 2). A continuación, con el fin de construir vectores de expresión que contienen una unidad de transcripción de cadena pesada (promotor-gen de cadena pesada-poli-A) junto con la unidad de transcripción de cadena ligera (promotor-gen de cadena ligera-poli-A), los vectores pCT145 que contienen los genes de cadena pesada se trataron con las enzimas de restricción *PacI* y *Ascl* para obtener unidades de transcripción de cadena pesada y a continuación los vectores pCT147 que contenían los genes de cadena ligera se trataron con las mismas enzimas de restricción y después se insertaron las unidades de transcripción de cadena pesada. A continuación, los vectores que contenían tanto la unidad de transcripción de cadena pesada como la unidad de transcripción de cadena ligera se seleccionaron usando enzimas de restricción (Figura 3). Los vectores seleccionados se extrajeron utilizando un kit Endofree plasmid maxi (QIAGEN, Alemania, 12362), y se analizaron las secuencias de nucleótidos de porciones de las muestras de ADN extraídas, determinando de este modo las secuencias de nucleótidos de los anticuerpos.

A continuación, el ADN de los anticuerpos extraídos se transfectó en un cultivo en suspensión de una línea celular F2N (preparada por Celltrion, Inc., Corea), preparando con ello una línea celular transitoria que produce anticuerpos monoclonales. La transfección se realizó de la siguiente manera. La transfección transitoria de las células se llevó a cabo usando el polímero catiónico FreeStyle^{MR} Max (Invitrogen, EE.UU., 16447-100) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El día antes de la transfección, se centrifugaron y suspendieron células F2N cultivadas

65

en medio exento de suero EX-CELL 293 (SAFC, LIK, 14571C, en lo sucesivo denominado como "medio EX-CELL 293") a una concentración celular de 1×10^6 células/mL en medio EX-CELL 293 modificado (SAFC, LIK, 65237; elaborado sobre pedido), y se sembraron 80 mL de la suspensión celular en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, o se sembraron 200 mL de la suspensión celular en un Erlenmeyer de 1 litro. El día de la transfección, en el caso en el que se sembraron 80 mL de la suspensión celular, se diluyeron cada 100 µg de un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal y 100 µL de reactivo de FreeStyle^{MR} Max hasta un volumen de 1,6 mL usando medio OptiPRO SFM II, seguido de agitación suave. En el caso en el que se sembraron 200 mL de la suspensión celular, se diluyó cada muestra de 250 µg de ADN y 250 µg del reactivo FreeStyle^{MR} Max hasta un volumen de 4 mL utilizando medio OptiPRO SFM II, seguido de agitación suave. Inmediatamente después del proceso de agitación, se mezcló la solución que contenía el reactivo FreeStyle^{MR} Max diluido allí con la solución que contenía ADN diluido allí y se incubó la solución mezclada a temperatura ambiente durante 19 minutos. Durante la incubación a temperatura ambiente durante 19 minutos, se diluyeron las células F2N sembradas hasta una concentración celular de $0,8 \times 10^6$ células utilizando medio EX-CELL 293 modificado recientemente. Después de la incubación durante 19 minutos, se trataron las células F2N y se transfectoron con la solución mezclada que contenía ADN y el reactivo FreeStyle^{MR} Max. Al día siguiente de la transfección, se añadió la misma cantidad de medio EX-CELL 293 a las células transfectadas, que luego se incubaron durante 7-8 días, produciendo de este modo anticuerpos monoclonales.

Ejemplo 4: Examen de la actividad de neutralización *in vitro* contra virus

Los seis anticuerpos seleccionados en HA-ELISA se sometieron a un ensayo de microneutralización (MN) con el fin de examinar su actividad neutralizante contra diversos virus de la influenza.

Ejemplo 4-1 Cultivo de la línea celular MDCK determinación de la concentración del virus

Como línea celular de riñón canino Madin-Darby (MDCK), se usó la línea London (MDCK-L). La línea celular MDCK se cultivó en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% a 37°C usando medio DMEM (Gibco, EE.UU., 11965) que contenía FBS al 10% (Atlas Biologicals, EE.UU., F0500A), 1X penicilina/estreptomina (Gibco, EE.UU. 15140), HEPES 25 mM (Gibco, EE.UU., 15630) y L-glutamina 2 mM (Gibco, EE.UU., 25030).

La concentración de virus se cuantificó mediante un método ELISA basado en células para determinar la dosis infectiva del cultivo tisular al 50% (TCID₅₀). La determinación de la concentración del virus se realizó de la siguiente manera. En primer lugar, una solución madre del virus se diluyó en serie 10 veces con un diluyente del virus [DMEM (Gibco, EE.UU.), BSA 3% (Gibco, EE.UU., 15260), 1X penicilina/estreptomina (Gibco, EE.UU.) y HEPES 25 mM, EE.UU.], y se añadieron 100 µL del virus diluido a cada pozo de una placa de 96 pozos. Como control negativo, se utilizó un diluyente de virus que no contenía ningún virus. A continuación, la línea celular MDCK que se estaba cultivando se separó de la incubadora de cultivo por tratamiento con tripsina y después se trató con medio de cultivo MDCK para neutralizar la tripsina. A continuación, los sedimentos de células se lavaron dos veces con solución salina regulada con fosfato, y después se diluyeron con un diluyente de virus hasta una concentración de células de 5×10^5 células/mL. Se añadieron 3-4 µg/mL de TPCK-tripsina (Sigma, EE. UU.) a la placa de 96 pozos que contenía el virus, e inmediatamente después se añadieron 100 µL de la línea celular MDCK a cada pozo de la placa y se incubaron en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % a 37°C durante 20 horas. La placa incubada se lavó una vez con solución salina regulada con fosfato y a continuación se añadieron 200 µL de una solución mezclada de acetona: solución salina regulada con fosfato fría (PBS) (80:20) a cada pozo de la placa. A continuación, las células se fijaron durante 8 minutos y la placa se secó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Cada pozo de la placa se lavó dos veces con 200 µL de solución salina regulada con fosfato. Se diluyó 2.000 veces el anticuerpo monoclonal de proteína anti-nuclear biotinilada (NP) (Millipore, EE.UU., MAB8257B) con solución salina regulada con fosfato que contenía BSA al 1% (Tween 20 al 0,1%) y se añadieron 100 µL de la dilución a cada pozo de la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó tres veces con 200 µL/pozo de solución salina regulada con fosfato y a continuación se añadieron 100 µL de una dilución de 20.000 veces del anticuerpo conjugado con estreptavidina-HRP en solución salina regulada con fosfato conteniendo BSA al 1% a cada pozo de la placa y se incubó a presión ambiente durante 1 hora. Después de lavar la placa cuatro veces con solución salina regulada con fosfato, se añadieron 100 mL de solución OPD (Sigma, EE.UU., P8287) a cada pozo de la placa y la placa se desarrolló a temperatura ambiente durante 10 minutos y se trató con 50 µL/pozo de HCl 3M para detener el desarrollo del color, después de lo cual se midió la DO₄₉₀ de cada pozo. Con base en la DO₄₉₀ medida, se calculó TCID₅₀ usando el método de Reed & Muench (The American 1938).

Ejemplo 4-2 Ensayo MN

Cada anticuerpo se diluyó con un diluyente de virus hasta una concentración de 10 µg/mL. A partir de esta concentración inicial, se diluyó dos veces en serie la dilución del anticuerpo con un diluyente de virus, y se añadieron 50 µL de cada una de las diluciones a cada pozo de una placa de 96 pozos. Además, se añadieron 50 µL de virus a cada pozo de la placa a una concentración correspondiente a 100 TCID₅₀ y se incubaron en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% a 37°C durante 1 hora. A continuación, se añadieron a cada pozo 3-4 µg/mL de TPCK-tripsina (Sigma, EE.UU., T1426), y se añadieron 100 µL de las células MDCK tratadas a cada pozo, seguido de incubación en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% a 37°C durante 20 horas. Después de la incubación durante 20 horas, se realizó un ensayo MN de acuerdo con el mismo método que el método de cuantificación del

virus descrito en el Ejemplo 4-1, determinando así el valor de DO₄₉₀ de cada pozo. Se determinó que los pozos que mostraban valores de DO₄₉₀ más altos que el del pozo introducido sólo con las células estaban infectados con virus.

Entre los valores de OD₄₉₀ para cada anticuerpo en el que no se detectó antígeno viral, la concentración más baja (µg/mL) del anticuerpo se muestra en la Tabla 1 a continuación, y la concentración más baja del anticuerpo significa la mayor actividad neutralizante contra el virus.

Tabla 1: Resultados del ensayo de microneutralización (ensayo MN) realizado utilizando anticuerpos seleccionados y diversos tipos de virus H3N2

ID de mAb	A/Wisconsin/67/05	A/Hong Kong/68	A/Brisbane/10/07
CT129	>10 µg/mL	>10 µg/mL	>10 µg/mL
CT135	>10 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL
CT147	2,5 µg/mL	2,5 µg/mL	0,625 µg/mL
CT149	1,25 µg/mL	2,5 µg/mL	1,25 µg/mL
CT164	2,5 µg/mL	1,25 µg/mL	0,625 µg/mL
CT166	5 µg/mL	2,5 µg/mL	1,25 µg/mL
*Unidad: µg/mL			

Como puede observarse a partir de los resultados de los ensayos MN de seis anticuerpos candidatos frente a los virus de la influenza del subtipo H3, el anticuerpo CT129 mostró alta afinidad de unión en HA-ELISA, pero no mostró actividad neutralizante contra los tres tipos de virus utilizados en los ensayos. El anticuerpo CT135 mostró actividad neutralizante contra dos tipos de virus H3N2 (A/Hong Kong/68 y A/Brisbane/10/07) y los anticuerpos CT147, CT149, CT164 y CT166 mostraron actividad neutralizante contra tres tipos de virus H3N2 (A/Wisconsin/67/05, A/Hong Kong/68 y A/Brisbane/10/07).

Entre los anticuerpos mencionados anteriormente, se seleccionó el anticuerpo CT149, y se analizaron sus actividades neutralizantes contra diversos tipos de virus de la influenza mediante un ensayo MN (Tabla 2).

Tabla 2: Resultados del ensayo de microneutralización (ensayo MN) realizado usando anticuerpos seleccionados y diversos tipos de virus

Subtipo	cepas	Título de MN (mg/mL)
H1N1	A/OH/07/2009	10 mg/mL
H2N2	A/Ann Arbor/6/60, CA	>20 mg/mL
H5N1	A/Vietnam/1203/04 x PR8	2,5 mg/mL
H7N2	A/pavo/Virginia/02 x PR8	10 mg/mL
H9N2	A/Trullo de alas verdes/209/TX/2009	0,156 mg/mL
H9N2	A/ck/HK/G9/97 x PR8	0,625 mg/mL
H3N2	A/Beijing/353/89-X109	0,156 mg/mL
H3N2	A/Beijing/32/92-R-H3	0,078 mg/mL
H3N2	A/Johannesburgo/33/94 R-H3	0,625 mg/mL
H3N2	A/Nanchang/933/95	0,625 mg/mL
H3N2	A/Sydney/5/97	0,625 mg/mL
H3N2	A/Panamá/2007/99	0,312 mg/mL
H3N2	Wyoming/3/03.rg	5 mg/mL
H3N2	A/Brisbane/10/07	0,625 mg/mL

Como puede observarse en la Tabla 2 anterior, el anticuerpo CT149 mostró actividad neutralizante contra los virus de influenza de subtipo H1N1, H5N1, H7N2, H9N2 y H3N2 utilizados en el ensayo MN.

Ejemplo 5 Examen de la capacidad del anticuerpo para inhibir la reacción de hemaglutinación causada por virus

Se diluyó en serie un anticuerpo 2 veces en una placa de 96 pozos de fondo en V, y se añadieron virus que tenían unidades de HA 4 veces y se mezclaron con el anticuerpo. A continuación, la placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, y luego se añadieron 1% de glóbulos rojos de ave a cada pozo de la placa. El punto final de la inhibición de la hemaglutinación se determinó como la concentración de anticuerpo más baja a la que no se observó reacción de hemaglutinación.

Como resultado, todos los anticuerpos analizados no inhibieron la hemaglutinación del virus del subtipo H3N2 (A/Brisbane/10/07) utilizado en el ensayo, incluso a altas concentraciones (> 20 µg/mL) (Tabla 3).

Tabla 3: Resultados del ensayo de inhibición de hemaglutinación para los anticuerpos seleccionados contra el virus del subtipo H3N2

ID de mAb	A/Brisbane/10/07
CT129	>20 µg/mL
CT135	>20 µg/mL
CT147	>20 µg/mL
CT149	>20 µg/mL
CT164	>20 µg/mL
CT166	>20 µg/mL

5 Ejemplo 6: Examen de los efectos preventivo y terapéutico del anticuerpo contra el virus de la influenza mediante experimento con animales

Ejemplo 6-1: Examen de los efectos preventivo y terapéutico del anticuerpo contra el virus de influenza en ratones

10 Con el fin de examinar si el anticuerpo CT149 tiene efectos preventivo y terapéutico contra el virus H3N2 en ratones, se llevó a cabo el siguiente experimento. Cada grupo que consistía en cinco ratones fue infectado en forma intranasal con 10 DL₅₀ del virus A/Hong Kong/68. El anticuerpo CT149 se administró a los ratones mediante inyección intraperitoneal en una cantidad de 10 o 20 mg/kg a las 24 horas antes de la infección viral o a las 24 horas o 48 horas después de la infección viral.

15 Como resultado, como se muestra en la Figura 4, en el caso del grupo de control negativo, todos los ratones del grupo de control negativo murieron antes de 11 días después de la infección viral, mientras que en el caso del grupo inyectado con 10 mg/kg o 20 mg/kg del anticuerpo CT149 24 horas o 48 horas después de la infección viral, todos los ratones sobrevivieron, lo que sugiere que el anticuerpo CT149 tiene un efecto preventivo contra la infección viral. En el caso en el que el anticuerpo CT149 se inyectó después de una infección viral con el fin de confirmar el efecto terapéutico del anticuerpo, cuando los ratones se inyectaron con 10 mg/kg del anticuerpo 48 horas después de la infección viral, murió el 20% de los ratones, y cuando los ratones fueron inyectados con 10 mg/kg del anticuerpo 24 horas después de la infección viral o con 20 mg/kg del anticuerpo 48 horas después de la infección viral, todos los ratones sobrevivieron, lo que sugiere que el anticuerpo CT149 tiene un efecto terapéutico contra la infección viral.

25 Ejemplo 6-2: Examen del efecto terapéutico del anticuerpo contra el virus de la influenza en hurones

30 Los hurones muestran sensibilidad y síntomas similares a aquellos de los humanos para el virus de la influenza, y por lo tanto se usan con frecuencia en estudios sobre el virus de la influenza. Por lo tanto, el experimento siguiente se llevó a cabo utilizando hurones con el fin de examinar si el anticuerpo CT149 tiene efectos terapéuticos contra los virus H3N2 y H5N1.

35 Cada grupo de ensayo consistió en 9 hurones. La cavidad nasal y el órgano de cada hurón se infectaron con 1×10^6 EID₅₀/mL de virus de influenza H3N2 (A/Hong Kong/68) o 1×10^2 EID₅₀ <mL del virus de la influenza de H5N1 (A/Vietnam/1203/04). Un día después de la infección viral, cada hurón se inyectó por vía intravenosa una vez con 30 mg/kg del anticuerpo CT-P6 de control negativo (independientemente del virus de la influenza) o 15 mg/kg o 30 mg/kg del anticuerpo CT149 o en forma intravenosa con 30 mg/kg del anticuerpo CT149 una vez al día durante 3 días.

40 1, 3, 5, 7 y 9 días después de la infección viral, se recogió el lavado nasal de los hurones de cada grupo de ensayo usando 1 mL de PBS que contenía antibióticos. 3, 5 y 9 días después de la infección viral, se sacrificaron 3 hurones de cada grupo de ensayo y se extrajo el tejido pulmonar y se midió la concentración viral de los mismos utilizando óvulos fértiles. Para realizar una prueba de titulación del virus utilizando óvulos fértiles, se centrifugó el lavado nasal y se añadió 1 g del tejido pulmonar del hurón a 1 mL de PBS que contenía antibiótico, se rompió y se centrifugó.

45 Cada uno de los sobrenadantes se diluyó en serie 10 veces con PBS que contenía antibiótico. Se infectaron los óvulos fértiles de 10-13 días de edad con el sobrenadante diluido y se incubaron durante 48 horas. A continuación, se mezclaron 50 µL del fluido alantoideo recogido de los óvulos con la misma cantidad de glóbulos rojos al 0,5%, y la mezcla se incubó durante 30 minutos y después se tituló con virus por aglutinación de la sangre.

50 Se midieron los títulos virales en los animales de ensayo (hurones) administrados con el control negativo (CT-P6) y CT149 a las 24 horas después de la infección con el virus de la influenza H3N2 (A/Hong-Kong/68). Como resultado, en el caso del grupo de control negativo, se observó un título viral de aproximadamente log 4 EID₅₀/mL o mayor un día después de la infección viral, y los títulos virales en el lavado nasal y el tejido pulmonar se mantuvieron o aumentaron hasta 5 días después de la infección. Sin embargo, 7 días después de la infección viral, no se detectó ningún virus en el grupo de control. El grupo administrado con CT149 mostró un título viral similar al del grupo de control negativo un día después de la infección viral, pero el título viral en el grupo tratado con CT149 comenzó a disminuir después de 3 días y no se detectó ningún virus en el grupo tratado con CT149 en el día 9, lo que indica

que el virus en el grupo tratado con CT149 se eliminó rápidamente. Particularmente, el título viral en el tejido pulmonar disminuyó más rápidamente a medida que aumentó la cantidad de anticuerpo administrado (Figura 5).

5 Se midieron los títulos virales en los animales de ensayo (hurones) administrados con el control negativo (CT-P6) y CT149 a las 24 horas después de la infección con el virus de la influenza H5N1 (A/Vietnam/1203/04). Como resultado, en el caso del grupo de control negativo, se observó un título viral de aproximadamente log 2,4 EID50/mL o mayor un día después de la infección viral y los títulos virales en el lavado nasal y el tejido pulmonar aumentaron hasta 5 días después de la infección viral. A los 5 días después de la infección viral, sólo uno de los seis hurones en el grupo de control sobrevivió y, por tanto, el título del virus en el lavado nasal se midió en un solo hurón a los 5 días. 10 A los 9 días después de la infección viral, todos los hurones del grupo de control ya habían muerto y, por lo tanto, no se podía medir el título viral. En el grupo administrado con CT149, el título del virus comenzó a disminuir a partir de 3 días después de la infección viral, y no se detectó ningún virus a los 9 días, lo que indica que el virus se eliminó rápidamente. Además, el título viral en el grupo administrado con CT149 disminuyó más rápidamente a medida que aumentaba la cantidad de anticuerpo administrado. Además, en el grupo administrado una vez con 15 mg/kg de 15 CT149, sólo un hurón murió a los 7 días después de la infección viral, lo que sugiere que CT149 tiene un efecto terapéutico contra el virus de la influenza (Figura 6).

<110> CELLTRION INC.

20 <120> Una molécula de unión generada a partir de células B humanas capaz de neutralizar virus de la influenza A

<130> CPD2012014KR

<150> 10-2011-0099646

25 <151> 2011-09-30

<160> 52

<170> KopatentIn 2.0

30

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> CT147_LC_CDR1

<400> 1

40

Arg Ala Ser Arg Arg Val Gly Ser Thr Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CT147_LC_CDR2

50 <400> 2

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ala
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CT147_LC_CDR3

60 <400> 3

Gln Gln Tyr Ala Ala Ser Pro Trp Thr
1 5

ES 2 641 257 T3

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> CT147_HC_CDR1
 <400> 4
 Thr Tyr Gly Ile Ser
 1 5
 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> CT147_HC_CDR2
 <400> 5
 Trp Ile Ser Ala Tyr Thr Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Val Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CT147_CT164_HC_CDR3
 <400> 6
 Asp Lys Val Gln Gly Arg Val Glu Ala Gly Ser Gly Gly Arg His Asp
 1 5 10 15
 Tyr
 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> CT149_LC_CDR1
 <400> 7
 Arg Ala Ser His Arg Val Gly Ser Thr Tyr Ile Ala
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CT149_CT164_LC_CDR2
 <400> 8
 Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

ES 2 641 257 T3

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> CT149_CT164_CT166_LC_CDR3
 <400> 9
 10
 Gln Gln Phe Ser Val Ser Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CT149_CT164_CT166_HC_CDR1
 20 <400> 10
 Thr Tyr Gly Val Ser
 1 5
 <210> 11
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CT149_HC_CDR2
 30 <400> 11
 Trp Ile Ser Ala Tyr Thr Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 35 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> CT149_CT166_HC_CDR3
 <400> 12
 Asp Lys Val Gln Gly Arg Val Glu Val Gly Ser Gly Gly Arg His Asp
 1 5 10 15
 <210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CT164_LC_CDR1
 55 <400> 13
 Arg Ala Ser His Ser Val Gly Ser Thr Tyr Ile Ala
 1 5 10

ES 2 641 257 T3

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> CT164_HC_CDR2
 <400> 14
 10
 Trp Ile Ser Gly Tyr Thr Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Ser Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> CT166_LC_CDR1
 20
 <400> 15
 Arg Ala Ser His Ser Ile Gly Ser Thr Tyr Ile Ala
 1 5 10
 25 <210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> CT166_LC_CDR2
 <400> 16
 Gly Ala Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5
 35
 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> CT166_HC_CDR2
 45 <400> 17
 Trp Ile Ser Gly Tyr Thr Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 18
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> CT147_LC_CDR1
 55 <400> 18
 agggccagtc ggcgcgttg cagcacctac ttagcc 36

ES 2 641 257 T3

<210> 19
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> CT147_LC_CDR2
<400> 19
10 ggtgcatcca gcagggccgc t 21
<210> 20
<211> 27
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> CT147_LC_CDR3
20 <400> 20
cagcagtatg ctgcctcacc gtggacg 27
<210> 21
<211> 15
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> CT147_HC_CDR1
30 <400> 21
acctatggca tcagc 15
<210> 22
<211> 51
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
40 <223> CT147_HC_CDR2
<400> 22
tggatcagcg cttactactgg aaatacagac tatgcacaga aggtccaggg c 51
45 <210> 23
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
50 <220>
<223> CT147_HC_CDR3
<400> 23
55 gataaggtcc aggggcgcgt tgaagcggga agtgggggcc ggcattgacta c 51
<210> 24
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
60 <220>
<223> CT149_LC_CDR1
<400> 24
65 agggccagtc accgtgttg cagcacctac atagcc 36

ES 2 641 257 T3

<210> 25
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> CT149_CT164_LC_CDR2
<400> 25
10 ggtgcatcca acaggccac t 21
<210> 26
<211> 27
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> CT149_CT164_CT166_LC_CDR3
20 <400> 26
cagcagttfa gtgttcacc gttgacg 27
<210> 27
<211> 15
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> CT149_HC_CDR1
30 <400> 27
acttatggag tcagt 15
<210> 28
<211> 51
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
40 <223> CT149_HC_CDR2
<400> 28
tggatcagcg cttactcgg tatcacagac tacgcacaga agtttcaggg c 51
45 <210> 29
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
50 <220>
<223> CT149_CT166_HC_CDR3
<400> 29
55 gataagggtc aggggcgct tgaagtggga tctgggggtc gtcattgacta c 51
<210> 30
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
60 <220>
<223> CT164_LC_CDR1
<400> 30
65 agggccagtc acagtgtgg cagcacctac atagcc 36

ES 2 641 257 T3

<210> 31
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> CT164_CT166_HC_CDR1
<400> 31
10 acttatggag tcagc 15
<210> 32
<211> 51
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> CT164_HC_CDR2
<400> 32
20 tggatcagcg gttatactgg taccacagac tacgcacaga agtctcaggg c 51
<210> 33
<211> 51
<212> ADN
25 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> CT164_HC_CDR3
<400> 33
30 gacaaagtc aggggcgct tgaagcgga tctgggggtc gtcacgacta c 51
<210> 34
<211> 36
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> CT166_LC_CDR1
40 <400> 34
agggccagtc acagtattgg cagcacctac atagcc 36
<210> 35
45 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
50 <223> CT166_LC_CDR2
<400> 35
ggtgcatcca acagggcctc t 21
55 <210> 36
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
60 <220>
<223> CT166_HC_CDR2
<400> 36
65 tggatcagcg gttacactgg taccacagac tacgcacaga agtttcaggg c 51

<210> 37
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> CT147_LC_Fab

<400> 37

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

10

<210> 38
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> CT147_HC_Fab

20

<400> 38

ES 2 641 257 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Thr Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Val
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Val Gln Gly Arg Val Glu Ala Gly Ser Gly Gly Arg
 100 105 110
 His Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Xaa Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270

ES 2 641 257 T3

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 39
 <211> 215
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CT149_LC_Fab

<400> 39

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Arg Val Gly Ser Thr
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Arg Leu Glu
 65 70 75 80

15

ES 2 641 257 T3

130						135										140
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	
145					150					155					160	
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	
				165					170					175		
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	
			180					185					190			
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	
		195					200					205				
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	
	210					215					220					
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	
225					230					235					240	
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	
				245					250					255		
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	
			260					265					270			
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	
		275					280					285				
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
	290					295					300					
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	
305					310					315					320	
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	
				325					330					335		
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	
			340					345					350			
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	
		355					360					365				
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
	370					375					380					
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	
385					390					395					400	
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	
				405					410					415		
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	
			420					425					430			
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	
		435					440					445				
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
450						455										

ES 2 641 257 T3

<210> 41
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> CT164_LC_Fab

<400> 41

10

```

Glu Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Thr Leu Pro Pro Gly
  1                    5                10                15

Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Ser Val Gly Ser Thr
                20                25                30

Tyr Ile Ala Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Arg Arg Leu
                35                40                45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Arg Leu Glu
  65                70                75                80

Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Ser Val Ser Pro
                85                90                95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
                100                105                110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
                115                120                125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
  130                135                140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
  145                150                155                160

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

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
                180                185                190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
                195                200                205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
  210                215
  
```

15

<210> 42
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

20

<223> CT164_HC_Fab

<400> 42

ES 2 641 257 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Pro Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Gly Tyr Thr Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Ser
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ala Ser Thr Ala Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Leu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Pro Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Val Gln Gly Arg Val Glu Ala Gly Ser Gly Gly Arg
 100 105 110
 His Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335

ES 2 641 257 T3

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 43
 <211> 215
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CT166_LC_Fab

10 <400> 43

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Ser Ile Gly Ser Thr
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Ser Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Ser Val Ser Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

ES 2 641 257 T3

145						150						155				160
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	
				165					170					175		
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
			180					185					190			
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	
		195					200					205				
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210					215										

- <210> 44
- 5 <211> 456
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> CT166_HC_Fab
- <400> 44

ES 2 641 257 T3

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

ES 2 641 257 T3

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

5 <210> 45
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> CT147_LC_Fab

<400> 45

ES 2 641 257 T3

	gagattgtgt tgactcagtc tccaggcacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtcg gcgcggtggc agcacctact tagcctggta ccagcagaaa	120
	cctggccagg ctcccaggcg cctcatctat ggtgcatcca gcagggccgc tggcatccca	180
	gacaggttca gtggcactgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagggtggac	240
	cctgaagatt ttgcggtata ttactgtcag cagtatgctg cctcaccgtg gacgttcggc	300
	caagggacca cgggtggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg	360
	ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
	tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc	480
	caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg	540
	acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag	600
5	ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtag	648

<210> 46
 <211> 1371
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> CT147_HC_Fab
 15 <400> 46

ES 2 641 257 T3

caggttcagc tgggtgcagtc tggaggtgag ctgaagaagc ctggggcctc agtgagggtc 60
 tcctgtaagc cttctggcta cacctttacc acctatggca tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag gccttgagtg ggtgggatgg atcagcgctt atactggaaa tacagactat 180
 gcacagaagc tccagggcag agtaacctatg accacggaca catccacgag cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctcac atctgacgac acggccgtct attactgtgc gagagataag 300
 gtccaggggc gcggtgaagc ggggaagtggg ggccggcatg actactgggg ccaggggaacc 360
 ctggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 420
 tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc 480
 gaaccgggtga cgggtgctgtg gaactcagge gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg 540
 gctgtcctac agtcctcagg actctactct ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc 600
 agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaargtg 660
 gacaagaaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 720
 cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 780
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct 840
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 900
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 960
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggctctca acaaagccct cccagcccc 1020
 atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1080
 cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1140
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggagccgga gaacaactac 1200
 aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1260
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgagggt 1320
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaagt a 1371

5

<210> 47
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> CT149_LC_Fab

15

<400> 47

ES 2 641 257 T3

gaagttgtgt tgacacagtc tcccggcacc ctggctttgc ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca ccgtgttggc agcacctaca tagcctggta tcagcagaag 120
tctggccagg ctcccaggcg cctcatctat ggtgcatcca acagggccac tgacatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtccgggaca gacttcactc tcaccatcag gagactggag 240
cctgaagatt ctgcagtgta ttactgtcag cagtttagtg tttcacctg gacgttcggc 300
caagggacca ggggtgaaat caagcgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctggtg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc ggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 648

<210> 48
<211> 1371
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> CT149_HC_Fab

<400> 48

caggttcagc tgggtcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaaga cttctgggta ttccttttcc acttatggag tcagttgggt ccgacaggcc 120
cccggacaag ggcctgagtg ggtgggatgg atcagcgctt aactggtat cacagactac 180

15

ES 2 641 257 T3

gcacagaagt ttcagggcag agtcactctg accacagacg caaccacggc caccgccttc 240
ctggacctga ggagtctgag acctgacgac acggccacgt atttctgtgc gagagataag 300
gtgcaggggc gcggtgaagt gggatctggg ggtcgtcatg actactgggg acaggggaacc 360
ctggtcatcg tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 420
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc 480
gaaccgggtga cgggtgctgt gaactcaggg gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc 540
gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctccagcagc tgggtgaccgt gccctccagc 600
agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg 660
gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 720
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 780
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 840
gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 900
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag 960
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc 1020
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1080
ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1140
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1200
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc 1260
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggg 1320
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaatg a 1371

<210> 49
<211> 648
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> CT164_LC_Fab

<400> 49

gaagtttgtt tgacgcagtc tcccggcacc ctgactttgc ctccagggga cagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca cagtgttggc agcacctaca tagcctggtt tcagcagaag 120
tctggccagg ctcccaggcg cctcatctat ggtgcatcca acagggccac tgacatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtccgggaca gacttactc tcaccatcag gagactggag 240
cctgaagatt ctgcagtgta ctactgtcag cagtttagtg tttcaccgtg gacgttcggc 300
caagggacca ggggtggaaat caagcgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccc 360

15

ES 2 641 257 T3

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctggtg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
 ggctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 648

<210> 50
 <211> 1371
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> CT164_HC_Fab

10

<400> 50

caggttcagc tgggtccagtc tggagtagag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaaga cttctgggta tccgttttcc acttatggag tcagctgggt ccgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg ggtgggatgg atcagcgggt atactggtat cacagactac 180
 gcacagaagt ctcagggcag agtcactctg acgacagacg caagcacggc caccgccttc 240
 ttggagctga ggagtctgag gcctgacgac acggccacct atttttgtgc gagagacaaa 300
 gtgcaggggc gcggtgaagc gggatctggg ggtcgtcacg actactgggg acagggaaacc 360
 ctgggtcatcg tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 420
 tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc 480
 gaaccgggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg 540
 gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc 600
 agcttgggca cccagacctc catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg 660
 gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 720
 cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 780
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct 840
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 900
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 960
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc 1020
 atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1080
 ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1140
 ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1200
 aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 1260

15

ES 2 641 257 T3

	gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgagggt	1320
	ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctctctc cgggtaaata a	1371
5	<210> 51 <211> 648 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> CT166_LC_Fab <400> 51	
	gaagtttgtt tgacgcagtc tcccggcacc ctggctttgc ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtca cagtattggc agcacctaca tagcctggta tcagcagaag	120
	tctggccagg ctcccaggcg cctcatctat ggtgcatcca acagggcctc tgacatccca	180
	gacaggttca gtggcagtgg gtccgggaca gacttcaactc tcaccatcag gagactggag	240
	cctgaagatt ctgcagtgta ttactgtcag cagtttagtg tttcacctg gacgttcggc	300
	caagggacca ggggtggaat caagcgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg	360
	ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
	tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc	480
	caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctctg	540
	acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
	ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag	648
15	<210> 52 <211> 1371 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> CT166_HC_Fab <400> 52	
	caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggctc	60
	tcctgcaaga cttctgggta ttccctttcc acttatggag tcagctgggt ccgacaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg ggtgggatgg atcagcgggtt aactggtat cacagactac	180
	gcacagaagt ttcagggcag agtcactctg accacagacg caaccacggc caccgccttc	240
	ctggagctga ggagtctgag acctgacgac acggccacct atttctgtgc gagagataag	300
	gtgcaggggc gcggtgaagt gggatctggg ggtcgtcatg actactgggg acagggaaacc	360
	ctggctcatg tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc	420
25	tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc	480

ES 2 641 257 T3

gaaccggtga	cggtgtcgtg	gaactcaggg	gccctgacca	gcggcgtgca	caccttcccg	540
gctgtcctac	agtcctcagg	actctactcc	ctcagcagcg	tggtgaccgt	gccctccagc	600
agcttgggca	cccagaccta	catctgcaac	gtgaatcaca	agcccagcaa	caccaaggtg	660
gacaagaaag	ttgagcccaa	atcttgtgac	aaaactcaca	catgcccacc	gtgcccagca	720
cctgaactcc	tggggggacc	gtcagtcttc	ctcttcccc	caaaacccaa	ggacaccctc	780
atgatctccc	ggaccctga	ggtcacatgc	gtggtggtgg	acgtgagcca	cgaagaccct	840
gaggtcaagt	tcaactggta	cgtggacggc	gtggaggtgc	ataatgccaa	gacaaagccg	900
cgggaggagc	agtacaacag	cacgtaccgt	gtggtcagcg	tcctcaccgt	cctgcaccag	960
gactggctga	atggcaagga	gtacaagtgc	aaggtctcca	acaaagccct	cccagcccc	1020
atcgagaaaa	ccatctccaa	agccaaaggg	cagccccgag	aaccacaggt	gtacaccctg	1080
cccccatccc	gggatgagct	gaccaagaac	caggtcagcc	tgacctgcct	ggtcaaaggc	1140
ttctatccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	gagagcaatg	ggcagccgga	gaacaactac	1200
aagaccacgc	ctcccgtgct	ggactccgac	ggctccttct	tcctctacag	caagctcacc	1260
gtggacaaga	gcaggtggca	gcaggggaac	gtcttctcat	gctccgtgat	gcatgaggg	1320
ctgcacaacc	actacacgca	gaagagcctc	tcctgtctc	cggtgaaatg	a	1371

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A, que comprende cualquier secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en las siguientes secuencias polipeptídicas:
- 5 una molécula de unión compuesta de una cadena ligera que comprende, como se determinó de acuerdo con el método de Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 1, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 2 y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 3, y una cadena pesada que comprende, como se determinó de acuerdo con el método de Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 4, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 5 y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 6;
- 10 una molécula de unión compuesta de una cadena ligera que comprende, como se determinó de acuerdo con el método de Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 7, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 8 y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 9, y una cadena pesada que comprende, como se determinó de acuerdo con el método de Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 10, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 11 y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 12;
- 15 una molécula de unión compuesta de una cadena ligera que comprende, como se determinó de acuerdo con el método de Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 13, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 8 y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 9, y una cadena pesada que comprende, como se determinó de acuerdo con el método de Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 10, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 14 y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 6; y
- 20 una molécula de unión compuesta de una cadena ligera que comprende, como se determinó de acuerdo con el método de Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 15, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 16 y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 9, y una cadena pesada que comprende, como se determinó de acuerdo con el método de Kabat, una región CDR1 expuesta en la SEQ ID NO: 10, una región CDR2 expuesta en la SEQ ID NO: 17 y una región CDR3 expuesta en la SEQ ID NO: 12.
- 25
- 30 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo está compuesto de una cadena ligera que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 37, y una cadena pesada que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 38.
- 35 3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo está compuesto de una cadena ligera que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 39, y una cadena pesada que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 40.
- 40 4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo está compuesto de una cadena ligera que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 41, y una cadena pesada que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 42.
- 45 5. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo está compuesto por una cadena ligera que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 43, y una cadena pesada que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 44.
- 50 6. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un fragmento Fab, un fragmento Fv, un diacuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
7. Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Un vector de expresión que tiene insertado en él la molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 7.
9. Una línea celular que produce un anticuerpo que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A, comprendiendo la línea celular el vector de expresión de la reivindicación 8 transfectado en una célula huésped.
- 55 10. La línea celular de la reivindicación 9, en donde la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en células CHO, células F2N, células BHK, células SP2/0, células NS0 y células HEK 293.
- 60 11. Una composición que comprende un anticuerpo que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 65 12. Una composición para uso en la prevención y tratamiento de una enfermedad causada por el virus de la influenza A, comprendiendo la composición un anticuerpo que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

13. Una composición para uso en el diagnóstico del virus de la influenza A, comprendiendo la composición un conjugado que comprende una etiqueta enlazada a un anticuerpo que tiene actividad neutralizante contra el virus de la influenza A de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 5 14. La composición de la reivindicación 13, en donde la etiqueta es cualquiera seleccionada del grupo que consiste en enzimas, luciferasas, isótopos radiactivos y toxina.
15. Un kit para diagnóstico del virus de la influenza A, que comprende:
- 10 1) un anticuerpo que tiene actividad neutralizante contra al virus de la influenza A de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y
2) un recipiente.
- 15 16. El kit de la reivindicación 15, en donde el virus de la influenza A se selecciona del grupo que consiste en los subtipos H1, H3, H5, H7 y H9.

Fig1

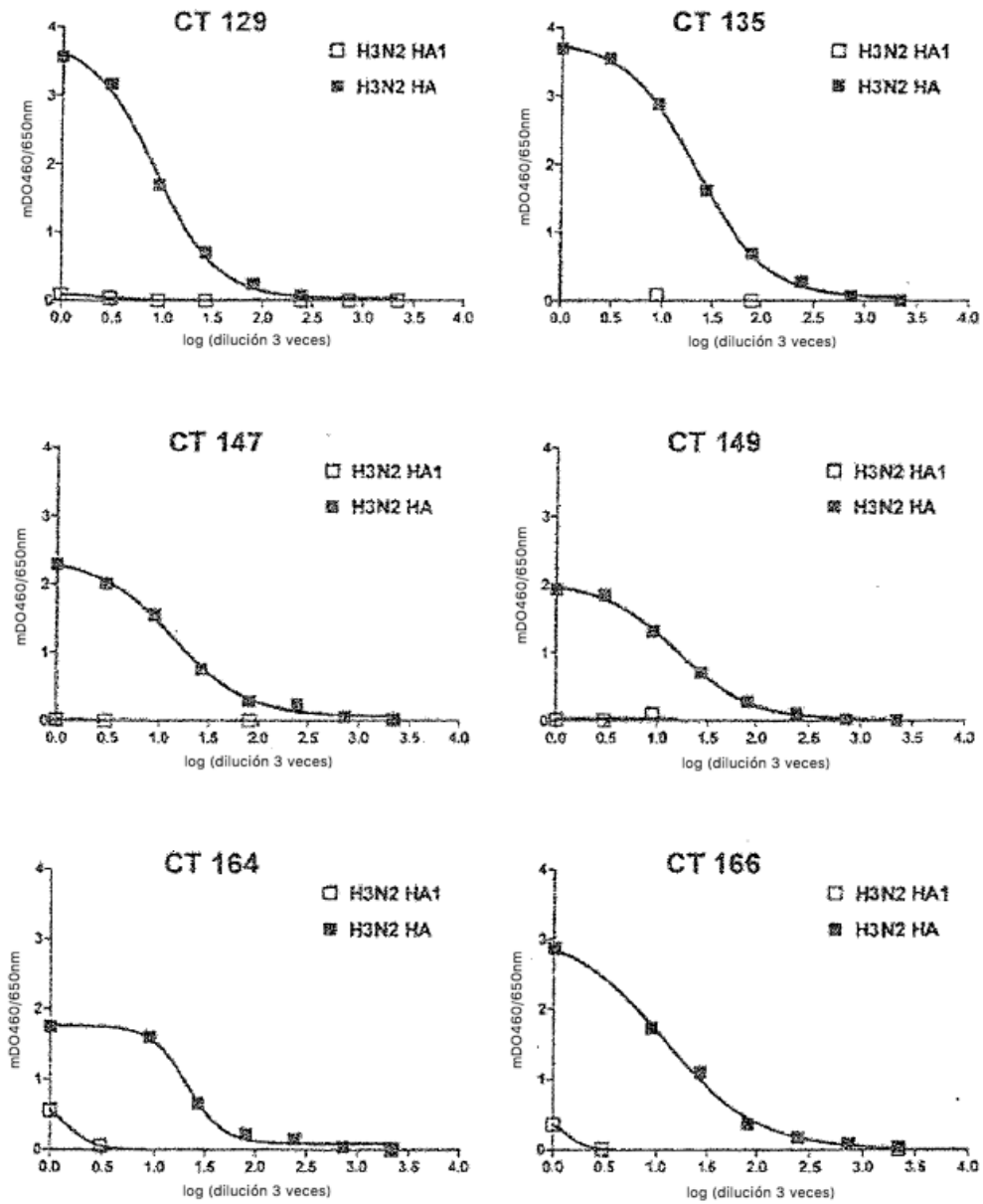


Fig 2

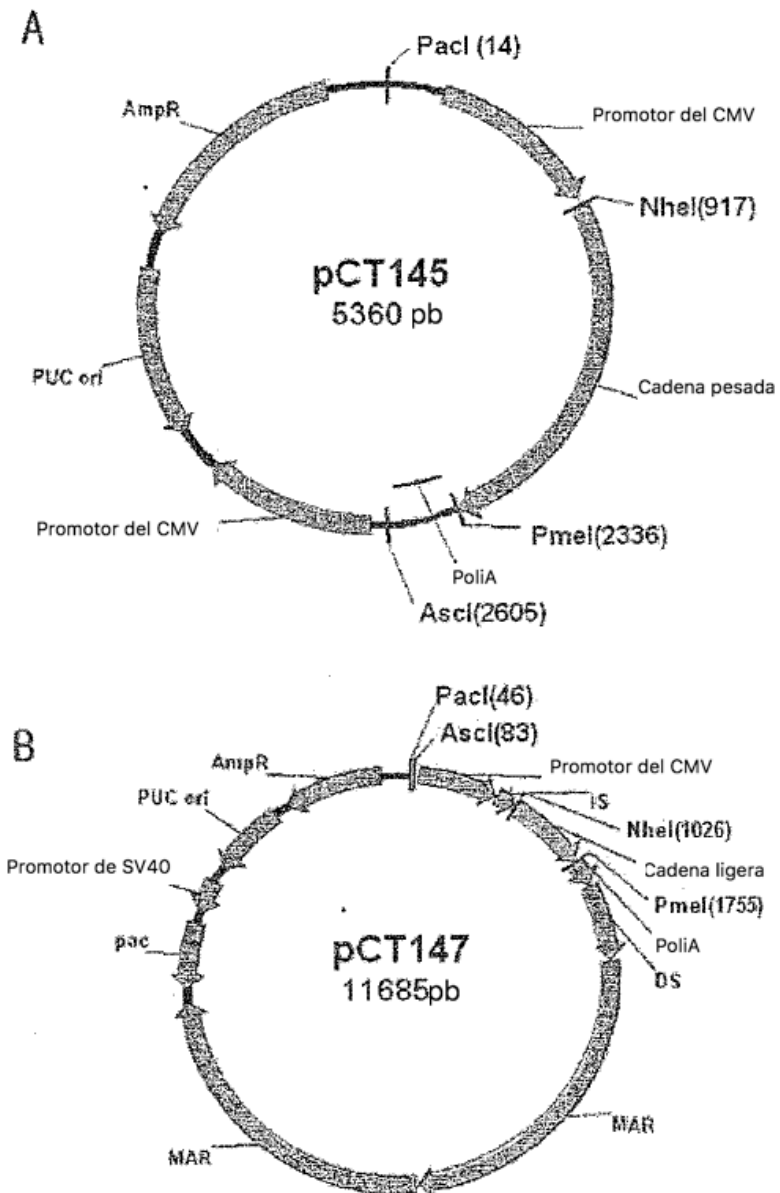


Fig 3

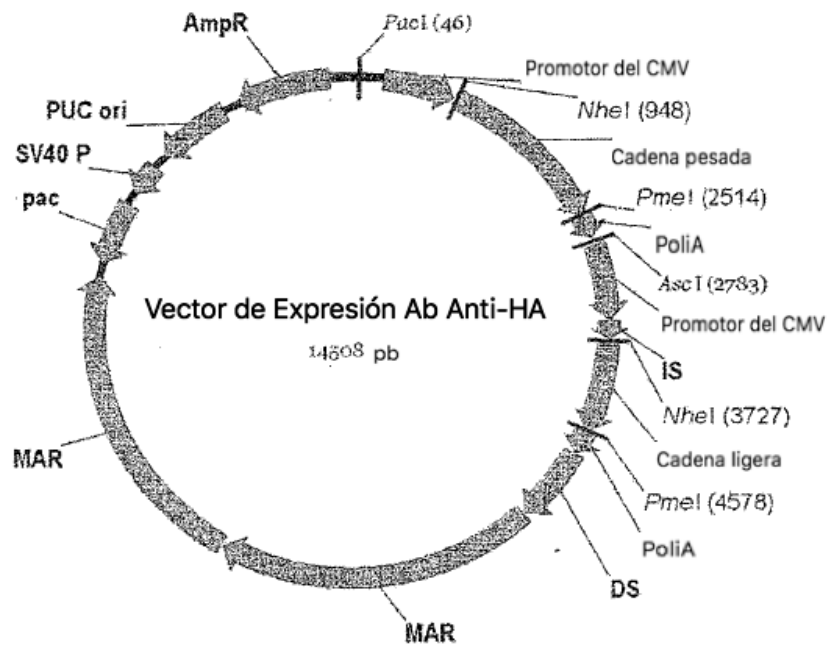


Fig 4

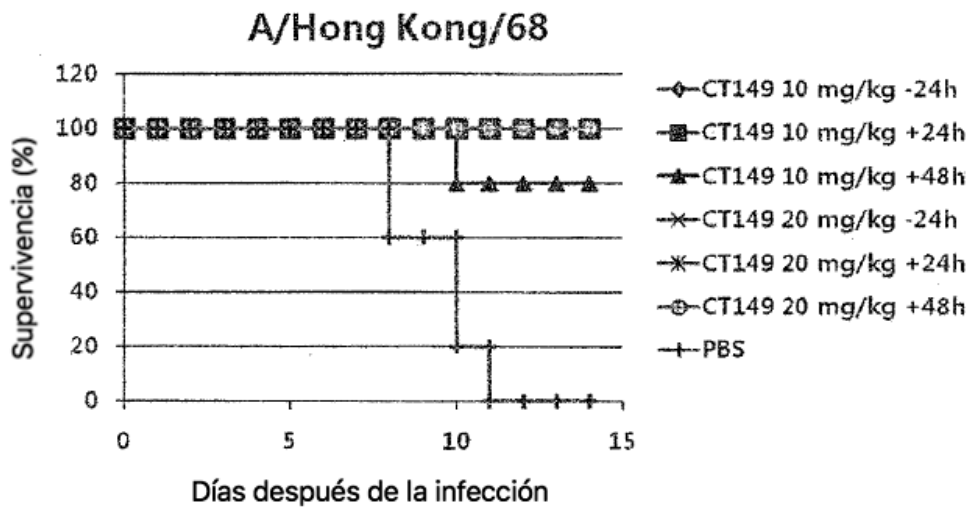


Fig 5

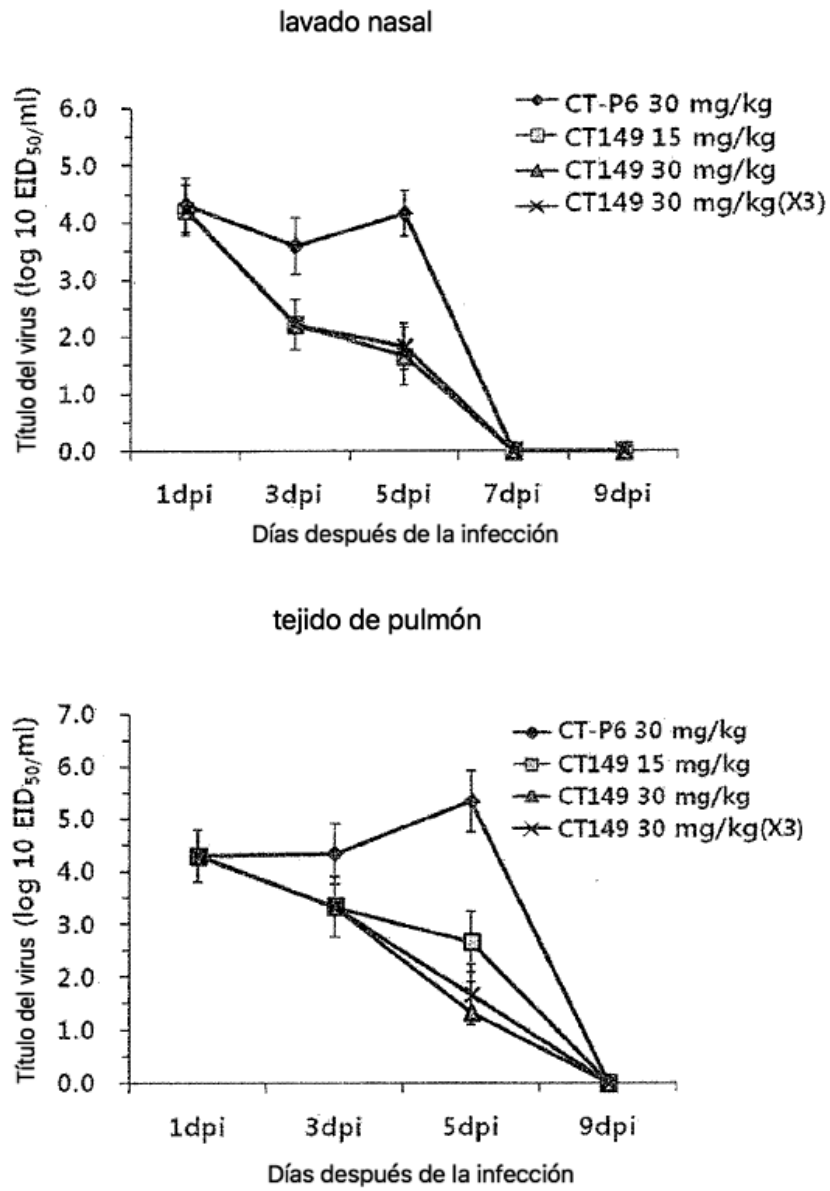


Fig 6

