

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 536**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2008 PCT/US2008/085876**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2009 WO09079259**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2008 E 08862950 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2222701**

54 Título: **Anticuerpos contra el virus de la influenza y métodos para su uso**

30 Prioridad:

06.12.2007 US 5725
25.08.2008 US 91599

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.01.2018

73 Titular/es:

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(50.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, MA 02215, US y
BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL
RESEARCH (50.0%)

72 Inventor/es:

MARASCO, WAYNE A.;
SUI, JIANHUA y
LIDDINGTON, ROBERT C.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 649 536 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra el virus de la influenza y métodos para su uso

5 Campo técnico de la invención

Esta invención se refiere en general a anticuerpos antivirales, así como a métodos para su uso.

10 Antecedentes de la Invención

Una influenza pandémica representa una de las mayores amenazas infecciosas agudas para la salud humana. La influenza pandémica de 1918-1919 causó aproximadamente 500.000 muertes en los Estados Unidos, por lo que es el evento más fatal en toda la historia de los Estados Unidos. La propagación de la influenza aviar altamente patógena (HPAI) H5N1 a través de Asia y ahora hacia el medio oriente y el norte de África crea un riesgo sustancial para que surja una nueva pandemia.

20 La variación natural, así como los mutantes de escape sugieren que la evolución continua del virus debería tener un impacto en la decisión sobre qué cepa o cepas deberían usarse para la inmunización pasiva y activa. Aunque se han reportado una cantidad importante de estudios de mapeo de epítomos y de escape de neutralización, se requieren nuevos anticuerpos neutralizantes y estudios estructurales relacionados para desarrollar estrategias de inmunización contra la HPAI H5N1. Los desafíos para desarrollar una vacuna protectora contra la HPAI H5N1 son formidables y se necesitan nuevos enfoques para prevenir y tratar la infección humana por un enemigo en constante cambio. Existe la necesidad de desarrollar rápidamente estrategias terapéuticas para provocar inmunidad protectora para los huéspedes, tanto de forma pasiva como activa.

25 Se han realizado tremendos avances en el campo de la ingeniería de anticuerpos humanos (Ab). Las inmunoterapias basadas en anticuerpos monoclonales (Mab) se están convirtiendo en el estándar de atención en un número creciente de enfermedades humanas, incluido el VSR. El cambio hacia el aislamiento de Mab humano de nueva procedencia y su uso clínico se debe en parte a la nueva presentación de anticuerpos y otras técnicas de exploración de bibliotecas que ahora se explotan para construir anticuerpos humanos con alta afinidad y especificidad. Las inmunoterapias con Mab humano pueden proporcionar un papel cada vez más importante en el tratamiento clínico de las enfermedades humanas. US 5631350; Okuno, Y. et al. (1993) JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, No. 5, páginas 2552-2558; y Smirnov, Y. A. et al., (2000), ARCHIVES OF VIROLOGY, vol. 145, No. 8, páginas 1733-1741 describen un anticuerpo monoclonal que se une a la región del tallo de la hemaglutinina.

35 Sumario de la invención

40 La invención se define de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y se basa en el descubrimiento de anticuerpos monoclonales que neutralizan el virus de la influenza, por ejemplo, el virus de la influenza A. El virus de la influenza A es un virus de influenza A del agrupamiento I, tal como un virus de influenza de agrupamiento H1. El virus de influenza de agrupamiento H1 es un agrupamiento H1a o un agrupamiento H1b. El anticuerpo monoclonal es completamente humano. En diversos aspectos, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo bivalente, un anticuerpo monovalente, un anticuerpo monocatenario o un fragmento del mismo. Específicamente, tal anticuerpo monoclonal se une a un epítopo en la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA), tal como el polipéptido HA1 o HA2. El epítopo no es lineal.

45 Opcionalmente, el epítopo comprende tanto HA-1 como HA-2. El epítopo no es lineal. En algunos aspectos, el epítopo comprende la posición del aminoácido 18, 38, 40, 291 del polipéptido HA1 y el aminoácido en la posición 18, 19, 20, 21, 38, 41, 42, 45, 49, 52, 53 y 56 del polipéptido HA2.

50 Los anticuerpos monoclonales ilustrativos incluyen anticuerpos monoclonales D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 o H98 o un anticuerpo que se une al mismo epítopo que D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 o H98.

55 Los anticuerpos monoclonales pueden tener la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 o H98. Alternativamente, la afinidad de unión puede variar de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 200 mM. Los anticuerpos monoclonales funcionan para inhibir la fusión viral y de la membrana celular.

60 El anticuerpo monoclonal tiene una secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada que contiene las SEQ ID NOS: 2, 6, 12, 18, 24, 28, 32 y 36 y/o una secuencia de aminoácidos variable de cadena ligera que contiene las SEQ ID NOS: 4, 8, 14, 16, 20, 22, 26, 30, 34 y 38.

65 El anticuerpo monoclonal tiene una secuencia de ácido nucleico variable de cadena pesada que contiene las SEQ ID NOS: 1, 5, 13, 15, 21, 23, 29, 33, 37 y 40 y/o una secuencia de ácido nucleico variable de cadena ligera que contiene las SEQ ID NOS: 3, 9, 11, 17, 19, 25, 27, 31, 35, 39 y 42. También se describe un anticuerpo de proteína hemaglutinina antiinfluenza monoclonal o fragmento del mismo, donde el anticuerpo tiene una región CDR1 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos SYAFS, TNAFS, AYAFT, SFAIS, SYAIS, GYYIH, MTAFT o DNAIS; una región CDR2 de V_H

que tiene la secuencia de aminoácidos GIIPMFGTPNYAQKFQG, GVIPLFRTASY AQNVQG, GIIMFGTANY AQKFQG, GISPMFGTPNY AQKFQG, GIIGVFGVPKY AQKFQG, WINPMTGGTNY AQKFQG, GISPIFRTPKY AQKFQG o GIIPFGKPNY AQKFQG; una región CDR3 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos SSGYYYG GGFVDV, SSGYHFGRSHFDS, GL YYESSLDY, SPSYICSGGTCVFDH, EPGYYVGKNGFDV, GASVLRVFDWQPEALDI, TLSSYQPNNDAFAI, o DSDAYYYGSGGMDV; una región CDR1 de V_L que tiene las secuencias de aminoácidos TGSSSNIGNYVA, TGSSSNIAANYVQ, TGTSSDVGGYNSVS, TGNSNNVGNQGAA, TGDSNNVGHQGTA, GGNIGIGYSVH, RASQSVSSYLA, RASQSLSSKYLA, TGSSSNIGNYV A, SGSSNIGSNTVN, RASQSISSYLN o TLSSGHSNYIA; una región CDR2 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos SNSDRPS, EDDRRPS, EVTKRPS, RNDRPS, RNGNRPS, DDKDRPS, DASNRAT, GASSRAT, SNNQRPS, AASSLQR, SNEQRPS o VNSDGSHTKGD y/o una región CDR3 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos QSYDSLAYSV, QSYDTNNHAV, CSYAGHSAYV, STWDSSLSAVV, SVWDSSLSA WV, QVWDSGNDRPL, QQYGSSPQV, QQYDGVPRT, QSYDSRLSASL, QQYDSSPYT, ASWDDNLSGWV o ETWDTKIHV.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo de proteína hemaglutinina antiinfluenza monoclonal aislado o un fragmento del mismo cuando el anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos de V_H codificada por el gen de la línea germinal de V_H IGHV1-69 * 01 y el aminoácido en posición: a) 27 es una valina; b) 28 es treonina; c) 30 es serina; d) 31 es serina; e) 54 es metionina; f) 55 es fenilalanina; g) 58 es treonina; h) 100 es prolina; i) 101 es serina; j) 102 es tirosina; k) 103 es isoleucina y 105 es serina.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno causado por un virus de la influenza administrando a una persona en riesgo de padecer dicha enfermedad o trastorno, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal o anticuerpo scFV descrito en este documento. El anticuerpo monoclonal o el anticuerpo scFV se administra en una dosis suficiente para neutralizar el virus de la influenza. El método también incluye la administración de un fármaco antiviral, un inhibidor de la entrada viral o un inhibidor de la unión viral. El fármaco antiviral es un inhibidor de la neuraminidasa, tal como zanamivir, o fosfato de oseltamivir, un inhibidor de HA, un inhibidor del ácido siálico o un canal de iones M2, tal como la amantadina o la rimantadina. El anticuerpo se administra antes o después de la exposición a un virus de influenza.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para detectar la presencia de un virus de influenza en una muestra poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal como se describe en la presente memoria, y detectando la presencia o ausencia de un complejo anticuerpo-antígeno, detectando así la presencia de un virus de influenza en una muestra. La muestra de prueba generalmente se obtiene de sangre, cabello, raspado o frotis de mejillas, saliva, biopsia, orina, heces, esputo, aspiración nasal o semen.

La descripción se basa además en el descubrimiento de un protocolo para generar anticuerpos humanos ampliamente neutralizantes que se dirigen a un epítipo altamente conservado en la región del tallo de HA. Mediante el uso del ectodominio trimérico H5 expresado en baculovirus que produce N-glicanos más cortos y manosas sin carga absorbidas sobre una superficie plástica, se permitió la presentación dominante del epítipo del tallo mientras se entierra la cabeza globular normalmente inmunodominante.

Por consiguiente, también se divulga un método para producir un anticuerpo aislado que se une específicamente a un virus de envoltura patógena exponiendo una biblioteca de expresión de Fab de cadena sencilla a una proteína de fusión de membrana del virus, identificando un anticuerpo en la biblioteca que se une específicamente a dicho proteína; y aislando el anticuerpo de la biblioteca. Preferiblemente, la proteína de fusión se inmoviliza en una superficie sólida, por ejemplo, plástico. En diversos aspectos, la proteína de fusión tiene glicosilaciones modificadas en comparación con una proteína de fusión de tipo silvestre. Por ejemplo, la fusión se produce en una célula no de mamífero, tal como una célula de insecto. La proteína de fusión es, por ejemplo, una proteína de hemaglutinina (HA) trimérica.

La divulgación proporciona además un método para vacunar a un sujeto contra virus de envoltura patógena tal como un virus de influenza administrando al sujeto una proteína de fusión de membrana (por ejemplo, una proteína de hemaglutinina (HA) trimérica recubierta) o incrustada en una matriz biológicamente compatible. En diversos aspectos, la proteína de fusión tiene glicosilaciones modificadas en comparación con una proteína de fusión de tipo silvestre.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende un anticuerpo monoclonal como se describe en este documento y kits que contienen la composición en uno o más contenedores e instrucciones de uso.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto, la presente especificación, incluidas las definiciones, primará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1A es una ilustración de la estructura del trímero A/Vietnam 1203/04. El sitio de unión al receptor y los sitios de variación antigénica se resaltan en el monómero.
- 10 La Figura 1B es una ilustración que muestra la ubicación de los residuos de aminoácidos en la HA de los virus de la influenza H5N1 que están bajo selección positiva.
- 15 La Figura 2 es una ilustración esquemática de la inmunoterapia de combinación convergente para H5N1.
- 20 La Figura 3 es una ilustración que muestra una comparación de la secuencia de aminoácidos de las regiones marco 1-4 (FR1-4) y las regiones 1-3 determinantes de complementariedad (CDR1-3) tanto para la VH como para la VL de los anticuerpos antiinfluenza de la invención. Las regiones FR y CDR se definen utilizando la base de datos de Kabat. El nombre del gen de VH y VL se muestra a la derecha (utilizando la base de datos IMGT). Los puntos muestran la identidad de secuencia para la secuencia consenso. Los guiones representan espacios.
- 25 La Figura 4 muestra la neutralización *in vitro* de anticuerpos anti-H5. (a) (panel superior) Los 10 nAb se convirtieron en scFv-Fc solubles (fragmento de cadena sencilla de región variable unida a bisagra, CH2 y CH3) y se evaluaron para determinar la actividad neutralizante contra virus pseudotipificados con H5-TH04. El porcentaje de neutralización a 2 concentraciones se muestra con barras de error estándar. El mAb 80R¹⁶ se usó como control (Ctrl.). (Paneles central e inferior), Neutralización de HS-VN04 de tipo silvestre y H5-IN05 por los 10 scFv-Fc a tres concentraciones usando un ensayo de reducción de placa. Los resultados son consistentes con los obtenidos a partir de un ensayo de microneutralización (datos no mostrados). (b) Neutralización del subtipo cruzado. nAb D8, F10 y A66 todos neutralizaron virus pseudotipificados H5-TH04, H1-SC1918 ((A/ Carolina del Sur/1/1918 (H1N1)), H1-PR34 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)), H2-JP57 (A/Japón/305/57 (H2N2)) y H6-NY98 (A/pollo/Nueva York/14677-13/1998 (H6N2)). (c) ensayo de microneutralización. Títulos de neutralización de F10 contra H5N1 de tipo silvestre, H1N1 (A/Ohio/83 ("H1-OH83")) y 1 mg/mL de solución madre de Ab). "<" Indica un título de menos de 20. Los resultados representan dos experimentos independientes.
- 30 La Figura 5 muestra el mecanismo de Neutralización. (a) ensayo de inhibición de unión a virus usando HA de longitud completa de virus HIV-1 pseudotipificados con H5-TH04. La unión de virus a células en grupos tratados con Ab se comparó con la unión a células en ausencia de Ab (definido como 100%). Ninguno de los tres nAb (D8, F10 y A66) inhibió la unión del virus a las células, mientras que un mAb anti-H5 de ratón, 17A2.1.2 y suero de hurón anti-H5N1, que inhiben la hemaglutinación y presuntamente se unen a la cabeza, se redujeron significativamente la unión. (b) Inhibición de la formación de sincitios por nAb. Las células HeLa se transfectaron con plásmido que expresa H5-TH04. La formación de sincitios inducida por breve exposición al regulador de pH 5,0 fue completamente inhibida por los nAb D8, F10 y A66, a razón de 20 µg/mL, mientras que el control y un mAb anti-HA1 (2A) a la misma concentración no tuvieron efecto.
- 35 La Figura 6 muestra la estructura del epítipo H5-F10 y la conservación de la secuencia/estructural. (a) Estructura del trímero H5 unido a F10 (scFv). H5 es muy similar a la estructura no complejada²¹ (RMSD por parejas (Cα) = 1,0 y 0,63 Å para 2 trímeros independientes). HA1, HA2, la hélice αA de HA2, el "péptido de fusión" (FP) y F10 (VH y VL) están codificados por color. El tercer F10 está escondido detrás del tallo. Téngase en cuenta que VL no hace contacto con H5. (b) Superficie de la región central del tallo. Un monómero está coloreado por la cadena; la ruta de FP a través del epítipo (rojo) está remarcada; las mutaciones que no afectan a la unión están en color azul verdoso. El péptido de fusión (FP y FP') es visible en dos monómeros. Los residuos de los epítipos se etiquetan de blanco (HA2) o amarillo (HA1). (c) Primer plano del epítipo que muestra la punta de F10 (cinta roja) y cadenas laterales de CDR seleccionadas. De 1500 Å² de superficie enterrada en la interfaz, el 43% implica interacciones hidrófobas. (d) Superposición de subtipos de HA: H1, H5 y H9 (Grupo 1) en tonos de rojo/amarillo (1RU7, 2IBX y 1JSD); H3 y H7 (Grupo 2) en tonos de azul (1MQL y 1TI8). Las RMSD para superposiciones por pares son de 0,56 ± 0,11 Å (rango observado, Grupo 1); 0,75 Å (Grupo 2); y 1,21 ± 0,12 Å entre grupos. Las diferencias consistentes entre los grupos incluyen la orientación de W21₂, que está relacionada con las direcciones alternativas de cadena lateral en 18₁ y 38₁, el entierro de la tirosina más grande (Grupo 1) frente a histidina (Grupo 2) en 17₁ y el empaquetamiento de His111₂ enterrada (Grupo 1) contra W21₁. Otros residuos de epítipos están indicados por círculos blancos numerados. N38₁ está glicosilado en H3 y en el agrupamiento H7. (e) Secuencias de los 16 subtipos de HA. Las energías de unión calculadas se indican de la siguiente manera. fuerte = (S), intermedia = (I); débil = (W); desfavorable = (U). El resaltado indica la conservación de la secuencia dentro de agrupamientos y grupos. La red de contactos entre hélices que estabilizan la estructura fusogénica²⁹ se indican debajo de las secuencias.
- 40 La Figura 7 muestra la eficacia profiláctica y terapéutica de nAb anti-H5 en ratones. Los ratones se trataron con diferentes dosis de nAb ya sea antes o después de la exposición viral letal. Eficacia profiláctica (a, b, g y h). Los ratones se trataron con nAb anti-H5 o mAb de control 24 horas antes la exposición letal por vía intranasal (i.n.) con 10 dosis letales medias (MLD₅₀) de H5N1 o H1N1. (a) Una inyección intraperitoneal (i.p.) de 10 mg/kg de cualquiera de los tres nAb proporcionó protección completa de los ratones expuestos a H5-VN04 (A/Vietnam/1203/04 (H5N1), Clado 1). Una dosis de anticuerpo más baja (2,5 mg/kg) también fue altamente protectora. (b) Se observó protección profiláctica contra virus H5-HK97 (A/Hong Kong/483/97 (H5N1), Clado 0) en 80-100% de los ratones tratados con 10 mg/kg de cualquiera
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

de los tres nAb. (g) Cualquiera de los tres nAb (con 10 mg/kg de inyección única) proporcionó una protección completa de los ratones expuestos al virus H1-WSN33 (A/WSN/1933 (H1N1)). (h) D8 y F10 protegieron completamente a los ratones expuestos a H1-PR34 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) cuando se les administró una dosis de 10 mg/kg de una inyección única. A66 proporcionó protección completa de ratones cuando se les administró 25 mg/kg de anticuerpo como una inyección única. Eficacia terapéutica (c-f). Los ratones se inocularon con H5-VN04 y se les inyectó nAb a las 24, 48, 72 horas después de la inoculación (c, e y f) o con H5-HK97 a las 24 horas después de la inoculación (d). El tratamiento i.p. con 15 mg/kg (una dosis terapéuticamente alcanzable en humanos) de cualquiera de los 3 nAb a las 24 horas después de la inoculación (hpi) protegió al 80-100% de los ratones expuestos con 10 veces la MLD₅₀ del virus H5-VN04 o H5-HK97.

La Figura 8 ilustra SDS-PAGE y el análisis de filtración en gel de proteínas HA. (a) El anticuerpo 2A se obtuvo a partir de una selección dirigida por HA1 separada contra el fragmento HA1 (residuos 11-325) de H5-TH04 (panel izquierdo). HA de H5 (cepa H5-VN04) utilizada para la selección de bibliotecas se muestra en panel derecho, (b) complejo H5-VN04 (H5) y scFv F10. HA0 se escindió completamente en HA1 y HA2 por coexpresión con furina (panel izquierdo). Los complejos se formaron mezclando primero H5 y F10 a una relación molar de 1:10, y luego se purificaron mediante filtración en gel.

La Figura 9 muestra la unión de scFv-Fc anti-H5 a H5 o HA1 mediante ELISA y ELISA de competición. (a) Se usó 1 µg/mL de scFv-Fc anti-H5 seguido de IgG1 de HRP-antihumana para detectar la unión de scFv-Fc anti-H5 a HA1 (H5-TH04) o H5 (H5-VN04) recubiertos en una placa de ELISA. Un anticuerpo seleccionado contra la subunidad HA1, mAb 2A scFv-Fc, unido tanto a HA1 como a H5. Los 10 potentes neutralizantes scFv-Fc unidos a H5, pero no a HA1. (b) Se mezclaron 10¹² pfu de fagos-scFvs anti-H5 con 5 µg/mL de scFv-Fc anti-H5 y se añadieron a placas recubiertas con H5 (H5-VN04), se lavaron y seguidos por HRP-anti-M13 para detectar fago-scFv unidos a H5. El mAb 2A-Fc no compitió por el epítipo reconocido por los 10 Ab seleccionados con H5. Todos los scFv-Fc seleccionados por H5 compitieron de forma cruzada. De estos, la unión de Ab F10 (fago-scFv) al trómero H5 fue la menos inhibida por los otros scFv-Fc lo que sugiere que tiene la afinidad más alta entre todos los Ab ensayados.

La Figura 10 muestra la caracterización cinética y termodinámica de la unión de H5 a los nAb D8, F10 y los A66-IgG1. Los nAb fueron capturados en un chip CM4 a través de anti-IgG1 humana; se inyectó H5 trimérico (H5-VN04) a diversas concentraciones (20; 10; 5; 2,5; 2,5; 1,25; 0,625 nM) sobre la superficie del chip. Las cinéticas de unión se evaluaron usando un modelo de unión de Langmuir 1:1. Las curvas de unión grabadas (restando el blanco de referencia) y las curvas calculadas son muy superponibles. Cada valor de *ka*, *kd* y *K_D* representa la media y el error estándar de tres experimentos.

La Figura 11 muestra las relaciones filogenéticas y la comparación de secuencias entre subtipos de HA. Árbol filogenético de los 16 subtipos de HA de virus influenza A basados en secuencias de aminoácidos. Cuatro agrupamientos de subtipos HA están sombreados en diferentes colores. Las secuencias utilizadas para el análisis fueron: H1 (A/Carolina del Sur/1/1918), H2 (A/Japón/305/1957), H3 (A/Aichi/2/1968), H4 (A/pato/República Checa/56), H5 (A/Vietnam/1203/2004), H6 (A/pollo/California/431/00), H7 (A/Holanda/219/03), H8 (A/pato/Ontario/6118/68), H9 (A/cerdo/HK/9/98), H10 (A/pollo/Alemania/N49), H11 (A/pato/Inglaterra/56), H12 (A/pato/Alberta/60/76), H13 (A/gaviota/Maryland/704/77), H14 (A/pato/Astrakán/263/1982), H15 (A/pardela/Australia Occidental/2576/79) y H16 (A/gaviota de cabeza negra/Suecia/2/99).

La Figura 12 muestra títulos virales en pulmón, bazo y cerebro de ratones tratados con nAb anti-H5 después de la exposición a H5-VNO4. Se trataron ratones BALB/c (n = 5) mediante inyección i.p. de 15 mg/kg de mAb a las 24, 48 o 72 horas después de la infección i.n. con 10 MLD₅₀ de H5-VN04. Los títulos virales se determinaron en pulmón, cerebro y bazo recogidos a las 96 hpi. Los datos se muestran en forma de una distribución de caja y bigotes en los que la caja se extiende del percentil 25 al 75, con una línea horizontal en la mediana. Los bigotes arriba y abajo de la caja indican los valores extremos. Los resultados del análisis estadístico de la prueba T de Student se anotan con una única estrella (*) para p < 0,05 y estrellas dobles (**) para p < 0,01. Las flechas que cruzan el eje Y indican el límite de detección de la titulación.

La Figura 13 muestra el análisis FACS de la unión de los nAb anti-H5 a todos los HA del agrupamiento H1, incluidos H1, H2, H5, H6, H11, H13 y H16. Se transfectaron transitoriamente células 293T con diferentes plásmidos que expresan HA, y se analizó la unión de mAb a las células que expresan HA mediante FACS. El mAb 80R anti-SARS se usó como control. 2A-Fc es un anticuerpo específico de HA de H5. También se mostró la falta de unión a un grupo 2 HA, H7. Los detalles de la cepa viral de H11, H13 y H16 son: H11-MP74 (A/Pato/Memphis/546/74 (H11N9)), H13-MD77 (A/Gaviota/MD/704/77 (H13N6)) y H16-DE06 (A/Ave del litoral/DE/172/06 (H16N3)).

Descripción detallada de la invención

La influenza A es un virus de ARN monocatenario de sentido negativo, con un genoma de ocho segmentos que codifica 10 proteínas. Pertenece a la familia Orthomyxoviridae que incluye los géneros del virus de la influenza A, B y C tal como se define por la antigenicidad de la nucleocápside y las proteínas de la matriz. En general, el virus de la influenza A está asociado con una enfermedad más grave en los humanos. El virus de la influenza A está subtipificado por dos proteínas de superficie, la hemaglutinina (HA) que une el virión a la célula huésped para la entrada a la célula y la neuraminidasa

(NA) que facilita la propagación del virus de la progenie mediante la escisión del ácido siálico del huésped unido al virus de la progenie o superficie de la célula.

Hay 16 subtipos de HA y 9 subtipos de NA que componen todos los subtipos de virus de influenza A por diversas combinaciones de HA y NA. Todas las combinaciones de los 16 subtipos de virus HA y 9 NA se encuentran en aves acuáticas. De los cientos de cepas de virus de la influenza A aviar, se sabe que solo cuatro han causado infecciones en humanos: H5N1, H7N3, H7N7 y H9N2. En general, la infección en humanos con estos virus ha producido síntomas leves y muy poca enfermedad grave: solo ha habido un caso mortal de neumonía causada por H7N7. Sin embargo, la excepción es el virus H5N1 altamente patógeno, para el cual no hay inmunidad natural en humanos. La infidelidad de la ARN polimerasa y la presión selectiva de la inmunidad del huésped pueden conducir a la acumulación de mutaciones y al cambio en la antigenicidad superficial de estas proteínas. Este cambio antigénico se denomina deriva antigénica. Además, como resultado de su genoma segmentado, puede producirse el arrastre de segmentos de genes si dos subtipos diferentes de virus de influenza A infectan a la misma célula. Por ejemplo, si un virus H3N2 humano y un virus H5N1 aviar infectan al mismo tiempo a un ser humano u otro miembro de una especie de mamífero, tal evento puede producir un nuevo H5N2. Este nuevo virus puede transmitirse de manera eficiente de humano a humano porque la mayoría de los segmentos de genes provienen del virus humano. Tal reordenamiento genético conduciría a un importante cambio de antígeno, el denominado cambio antigénico, lo que significaría que la mayoría de la población mundial no tendría ningún anticuerpo neutralizante contra el virus de genoma reordenado. Tal situación, junto con la alta mortalidad de la neumonía por influenza H5N1, es uno de los escenarios más temidos en el campo de la salud pública.

La hemaglutinina (HA) del virus de la influenza es el antígeno más variable del virus de la influenza, y es responsable de la entrada del virus en las células. Se sintetiza como un polipéptido precursor trimérico HA0 que se escinde postraduccionalmente a dos polipéptidos HA1 y HA2 unidos mediante un único enlace disulfuro. La cadena HA1 de HA es responsable de la unión del virus a la superficie de la célula. HA2 media la fusión de las membranas celulares y virales en los endosomas, lo que permite la liberación del complejo de ribonucleoproteína en el citoplasma. En contraste con HA1, la molécula de HA2 representa una parte relativamente conservada de HA. Una segunda proteína de influenza inmunogénica es la neuraminidasa (NA). Esta glicoproteína tetramérica es responsable de liberar viriones del ácido siálico superficial en las células productoras, y también puede tener un papel en promover el acceso a las células objetivo en las vías respiratorias. Aunque los anticuerpos neutralizantes contra NA son protectores en los animales y en el hombre, hay una escasez de datos sobre sus mecanismos de acción. Un informe reciente sobre la estructura cristalina de la neuraminidasa N1 demostró la presencia de una cavidad adyacente a su sitio activo que puede ser explotada para desarrollar nuevos medicamentos contra la influenza, incluidos los anticuerpos. Este hallazgo es particularmente importante a la luz de los informes de aparición de resistencia a los medicamentos para oseltamivir (Tamiflu) y zanamivir (Relenza) para los virus H5N1.

Tanto las cadenas HA1 como HA2 de HA son inmunogénicas y se han demostrado anticuerpos reactivos con ambas cadenas después de la infección natural en humanos. Mientras que los anticuerpos específicos para HA1 son mayoritariamente neutralizantes, se han descrito diferentes mecanismos de neutralización viral mediante Mab específicos de HA1 *in vitro*, incluyendo el bloqueo del sitio receptor en HA1, la inhibición intracelular de la fusión virus-célula o la inhibición simultánea de unión y la inhibición de la fusión virus-célula, dependiendo de la concentración de anticuerpos. Aunque menos estudiado, se ha informado de la inhibición de la fusión celular por anticuerpos anti-HA2.

Hace más de dos décadas, la molécula de HA del subtipo H3 se caracterizó por la secuenciación de la HA de las variantes de deriva antigénica y los mutantes de escape, y los epítomos antigénicos se mapearon en la estructura tridimensional de la molécula. Desde entonces, los sitios antigénicos en H1, H2 y H5 de un virus patógeno aviar se mapearon en las estructuras tridimensionales de H3. Después del brote de infección por H5N1 en humanos en Hong Kong en 1997 y el aislamiento del virus H9N2 de casos humanos en 1999, se resolvieron las estructuras de ambas proteínas por rayos X. Sin embargo, la deriva antigénica del aislado porcino de 1997 (A/Pato/Singapur/3/97) que se usó para resolver la estructura, y cepas altamente patógenas aisladas más recientemente, es significativa. De hecho, hay 28 cambios menores y dos cambios potencialmente importantes entre el aislado porcino (A/Pato/Singapur/3/97) y la cepa HPAI H5N1 (A/Vietnam1203/04).

Los análisis filogenéticos de los genes de HA H5 del brote de 2004-2005 han mostrado dos linajes diferentes de genes de HA, denominados clados 1 y 2. La cepa HPAI H5N1 (A/Vietnam1203/04) es un miembro del clado 1. Los virus en cada uno de estos clados se distribuyen en regiones geográficas no superpuestas de Asia. Los virus H5N1 de Indochina están estrechamente agrupados dentro del clado 1, mientras que el H5N1 aislado de varios países circundantes son distintos de los aislados del clado 1 y pertenecen a un clado 2 más divergente. Se aislaron virus del clado 1 de humanos y aves en Vietnam, Tailandia y Camboya, pero solo de pájaros en Laos y Malasia. Los virus del clado 2 se encontraron en virus aislados exclusivamente de aves en China, Indonesia, Japón y Corea del Sur. Los estudios epidemiológicos más recientes analizaron 82 virus H5N1 aislados de aves de corral en Indonesia y Vietnam, así como 11 aislamientos de humanos del sur de Vietnam junto con datos de secuencias disponibles en bases de datos públicas, para abordar cuestiones relevantes con respecto a la introducción del virus, endemicidad y evolución³⁶. El análisis filogenético mostró que todos los virus de Indonesia forman un sublinaje distinto de los virus del genotipo Z de H5N1, lo que sugiere que este brote probablemente se originó a partir de una única introducción por diseminación en todo el país durante los últimos dos años. Las continuas actividades del virus en Indonesia se atribuyeron a la transmisión a través del movimiento avícola dentro del país, en lugar de a través de repetidas introducciones por migración de aves. Dentro de

Indonesia y Vietnam, los virus H5N1 han evolucionado a lo largo del tiempo en grupos geográficamente distintos dentro de cada país.

Recientemente, se resolvió la estructura de HA de A/Vietnam1203/4. La comparación de sus secuencias de aminoácidos con los genes de HA de HPAI 2004 y 2005 aislados de los virus de clado 1 y 2 identificó 13 posiciones de variación antigénica que se agrupan principalmente alrededor del dominio de unión al receptor, mientras que el resto está dentro del dominio de la esterasa vestigial. Se han identificado regiones de variación antigénica en los serotipos H1 y H3 (Figura 1A). Para H1, estos sitios se designan Sa, Sb, Ca y Cb, mientras que para H3, los sitios se designan A, B, C y D. Los mutantes de escape de las HA de H5 se pueden agrupar en tres epítomos; sitio 1: un asa expuesta (HA1 140-145) que se superpone a los sitios antigénicos A de H3 y Ca2 de H²; sitio 2: residuos 156 y 157 de HA1 que corresponden al sitio antigénico B en serotipos H3; y 3) HA1 129-133, que está restringido al sitio Sa en los serotipos de los HA de H1 y H9. En los estudios recientes de Smith, la detección de selección positiva a nivel de aminoácidos indicó que ocho residuos en las proteínas HA estaban bajo selección positiva (Figura 1B). Estos residuos incluyen cinco en sitios antigénicos A y E (posiciones 83, 86, 138, 140 y 141); dos implicados en la unión al receptor (posiciones 129 y 175); y la posición 156 es un sitio para la posible glicosilación ligada a N que está cerca del sitio de unión al receptor. Los resultados revelaron además que tres residuos en HA (Val 86, Ser 129 y Thr 156) se observaron con mayor frecuencia en aislados humanos que en aislados de pollo o pato y probablemente representaban una adaptación temprana del genotipo Z de H5N1 a los seres humanos. Otro hallazgo importante de estos estudios es que las diferencias filogenéticas entre los sublinajes de Indonesia y Vietnam también se reflejaron en diferencias significativas en la reactividad cruzada antigénica entre estos dos grupos de virus. Específicamente, los virus de Indonesia no reaccionaron contra los antisueros de hurón contra A/Vietnam 1203/04, y los virus representativos de Vietnam no reaccionaron con antisueros de hurón contra los virus indonesios IDN/5/06 y Dk/IDN/MS/04. Estos hallazgos están de acuerdo con estudios anteriores con suero humano inmune y virus H5N1 humanos de 1997 y 2003 que indicaron que estas cepas no solo eran filogenéticamente sino también antigénicamente distintas. Por lo tanto, la variación natural, así como los mutantes de escape sugieren que la evolución continua del virus debería afectar la decisión sobre qué cepa o cepas se deben utilizar para la inmunización pasiva y activa.

La presente descripción proporciona métodos para la identificación, producción y caracterización de anticuerpos monoclonales humanos antiinfluenza.

Identificación y caracterización de scFv y anticuerpos monoclonales

Se han identificado mAbs anti-HA humanos de alta afinidad, subtipo cruzado, ampliamente neutralizantes. Estos nAb inhiben el proceso de fusión posterior a la unión mediante el reconocimiento de un epítomo neutralizante novedoso y altamente conservado dentro de la región del tallo en un punto donde los elementos clave del cambio conformacional - el péptido de fusión y la superficie expuesta de la hélice α - se ponen en aposición. El análisis estructural y de secuencia de los 16 subtipos de HA apunta a la existencia de solo dos variantes de este epítomo, correspondientes a las dos agrupaciones filogenéticas de HA (Grupos 1 y 2). Estos resultados plantean la posibilidad de que un pequeño cóctel de nAb derivados de un subconjunto de cada grupo podría proporcionar una amplia protección tanto contra la influenza estacional como la influenza pandémica.

Un informe reciente utilizó células inmunitarias de pacientes infectados con H5N1 para aislar nAb anti-HA. Sin embargo, sus epítomos y modos de acción no fueron informados. Sorprendentemente, se han aislado repetidamente nAb que utilizan el mismo gen de la línea germinal de VH, IGHV1-69*01, y codifica un bucle de CDR3 que contiene una tirosina en una posición equivalente a Y102, de una biblioteca no inmune. Esto sugiere que existe una amplia inmunidad cruzada anti-HA en la población no modificada de H5, posiblemente debido a la exposición previa a H1 y, para los donantes de bibliotecas nacidos antes de 1968, subtipos de H2. El uso recurrente de este segmento de VH germinal, la comunidad de la tirosina de CDR3 introducida a través de la inserción de N y/o el ensamblaje del gen D de línea germinal, y el uso promiscuo de los genes de VL por los nAb descubiertos en ambos estudios, sugieren que la frecuencia precursora de segmentos de VH reorganizados que podrían reconocer este epítomo son significativos. Esto plantea la posibilidad de que con una exposición adecuada al epítomo F10 identificado en la presente memoria, estos nAb de amplio espectro puedan inducirse fácilmente *in vivo*. Si bien aún se desconoce la complejidad genética y estructural de los nAb requeridos para proporcionar protección universal contra los subtipos de virus en ambos grupos, nuestros datos parecen apuntar a una solución sorprendentemente simple.

Se identificaron tres scFv anti-HA-1 únicos por análisis de secuenciación de los 58 clones positivos de HA-1. Estos scFv se designaron como 3B y 1C. La secuencia de aminoácidos de VH y VL de 2A se muestra en la Tabla 1B.

Se identificaron diez scFv anti-HA0 únicos por análisis de secuenciación de los 97 clones positivos de HA0. Estos scFv se designaron como 7, 8, 10, 17, 40, 66, 80, 88, 90 y 98. Se revelaron 6 genes de VH diferentes y 10 de VL diferentes. Algunos scFv comparten el mismo gen de VH. Cinco de los seis genes de VH diferentes pertenecían a la familia de genes IGHV1-69. Tres de cada diez genes de VL eran de cadena kappa.

scFv 2A es un anticuerpo neutralizante moderado, 3B y 1C son anticuerpos no neutralizantes. Diez scFv, 7, 8, 10, 17, 40, 66, 80, 88, 90 y 98 son potentes anticuerpos neutralizantes. Figuras 4A y 4B

ES 2 649 536 T3

El ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de influenza neutralizantes se proporcionan a continuación:

| |
|--|
| Tabla 1A. Secuencias de ácido nucleico de la región variable del anticuerpo 2A |
| Cadena V _H de 2A (SEQ ID NO: 1) |
| CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGG CACCTTCAGTGACAATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCAGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGGGGCATCATTCCTA TCTTTGGAAAACCAACTACGCACAGAAGTCCAGGGCAGAGTCACGATTACTGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTAC ATGGACCTGAGGAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGATTAGACGCGTATTACTATGGTTC GGGGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA |
| Cadena V _L de 2A (SEQ ID NO:3) |
| CTGCCTGTGCTGACTCAATCATCCTCTGCCTCTGCTTCCCTGGGATCCTCGGTCAAGCTCACCTGCACTCTGAGCAGTGG GCATAGTAACTACATCATCGCATGGCATCAACAGCAGCCAGGGAAGGCCCTCGGTAAGTTAATAGTGATG GCAGCCACACCAAGGGGACGGGATCCCTGATCGCTTCTCAGGCTCCAGCTCTGGGGCTGACCGCTACCTACCATCTCC AACCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTAGTTATTTCTGTGAGACCTGGGACACTAAGATTATGTCTTCGGAAGTGGACCAA GGTCTCCGTCCTCAG |

| |
|--|
| Tabla 1B. Secuencias de aminoácidos de la región variable del anticuerpo 2 ^a |
| Cadena V _H de 2A (SEQ ID NO: 2) |
| QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGTFSDNAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGKPNYAQKFGQGRVITADESTSTAY MDLRLSRSEDTAVYYCARDSDAYYYGSGGMDVWGQGLVTVSS |
| Cadena V _L de 2A (SEQ ID NO: 4) |
| LPVLTQSSSASASLGSSVKLTCTLSGHSNYIIANHQQPGKAPRYLMKVNSDGSHTKGDGIPDRFSGSSSGADRYLTIS NLQSEDEASYFCETNDTKIHVFGTGTKVSVL |

5

| |
|--|
| Tabla 1C. Secuencias de ácido nucleico de la región variable del anticuerpo D7 |
| Cadena V _H de D7 (SEQ ID NO: 5) |
| CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTCCTGGAGG TATCTTCAACACCAATGCTTTCAGCTGGGTCCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGGTGGGAGGGGTATCCCTT TGTTTCGAACAGCAAGCTACGCACAGAACGTCCAGGGCAGAGTCACCATTACCGCGGACGAATCCACGAAACAGCCTAC ATGGAGCTTACCAGCCTGAGATCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGTAGTGGTTACCATTTAGGAGTCA CTTTGACTCCTGGGGCCTGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA |
| Cadena V _L de D7 (SEQ ID NO: 9) |
| AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTGCGGCTCTCCGGGGAAGACGGTGACCATCTCCTGCACCGGCAGCAGTGG CAACATTGCCGCCAACTATGTGCAGTGGTACCAACAACGTCCGGGCAGTGCCCCACTACTGTGATCTATGAGGATGACC GAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGGTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCAGGA CTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGTGACTTATGATACCAACAATCATGCTGTGTTTCGGAGGAGGCACCCA CCTGACCGTCCTC |

| |
|---|
| Tabla 1D. Secuencias de ácido nucleico de la región variable del anticuerpo H98 |
| Cadena V _H de H98 (SEQ ID NO: 7) |
| |

ES 2 649 536 T3

CAGGTGCAGCTGGTGCATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTCCTGGAGG
TATCTTCAACACCAATGCTTTCAGCTGGGTCCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGGTGGGAGGGGTTCATCCCTT
TGTTTTCGAACAGCAAGCTACGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCTAC
ATGGAGCTTACCAGCCTGAGATCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGTAGTGGTTACCATTTTAGGAGTCA
CTTTGACTCCTGGGGCCTGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCCTCA

Cadena V_L de H98 (SEQ ID NO:11)

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGAAACACGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAGGCACCTC
CAACATCGGACGTAATCATGTAACTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAATGAAC
AGCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAATCTGGCACCTCCGCTCCCTGGCCGTGAGTGGGCTCCAG
TCTGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCATCATGGGATGACAACTTGAGTGGTTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCT
GACCGTCCTA

Tabla 1E. Secuencias de aminoácidos de la cadena de la región variable del anticuerpo D7 y H98

Cadena V_H de D7 y H98 (SEQ ID NO: 6)

QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKAPGGI FNTNAFSWVRQAPGQGLEWVGGVI PLFRTASYAQNVQGRVTITADESTNTAY
MELTSLSRSDTAVYYCARSSGYHFRSHFDSWGLGTLTVSS

Cadena V_L de D7 (SEQ ID NO: 8)

NFMLTQPHSVSAS PGKTVTISCTGSSGNIAANYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDRRPSGVPDRFSGSIDRSSNSASLTISG
LKTEDEADYYCQTYDTNNHAVFGGGTHLTVL

Cadena V_L de H98 (SEQ ID NO: 10)

SYELTQPPSASGKHGQRVTISCSGGTSNIGRNHVNWYQQLPGTAPKLLIYSNEQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAVSGLQ
SEDEADYYCASWDDNLSGWVFGGGTKLTVL

Tabla 1F. Secuencias de ácido nucleico de la región variable del anticuerpo D8

Cadena V_H de D8 (SEQ ID NO: 13)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGG
CACCTTCAGCGCTTATGCTTTCACCTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGCATCACCGGAA
TGTTTTGGCACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTAACCGCGGACGAACCTACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGTTGAGCTCCCTGACATCTGAAGACACGGCCCTTTATTATTGTGCGAGAGGATTGTATTACTATGAGAGTAGTCT
TGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCCTCAG

Cadena V_L de D8 (SEQ ID NO: 17)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAG
TGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCA
CTAAGCGGCCCTCAGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTC
CAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTTCTGCTGCTCATATGCAGGCCACAGTGCTTATGTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGT
CACCGTCCTG

Tabla 1G. Secuencias de ácido nucleico de la región variable del anticuerpo D80

Cadena V_H de D80 (SEQ ID NO:15)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAGGGCTTCTGGAGG
CACCTTCAGCGCTTATGCTTTCACCTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGCATCACCGGAA
TGTTTTGGCACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTAACCGCGGACGAACCTACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGTTGAGCTCCCTGACATCTGAAGACACGGCCCTTTATTATTGTGCGAGAGGATTGTATTACTATGAGAGTAGTCT

| |
|--|
| TGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG |
| Cadena V _k de D80 (SEQ ID NO: 19) |
| GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTCTTAGCAGCAAGTACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAGTAGACTGGAG CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTCCTGTGACAGTATGATGGCGTACCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCACGGTGGAAAT CAA |

| |
|--|
| Tabla 1H. Secuencias de aminoácidos de la cadena de la región variable del anticuerpo D8 y D80 |
| Cadena V _H de D8 y D80 (SEQ ID NO: 12) |
| QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSAYAFWVRQAPGQGLEWMGGITGMFGTANYAQKFQGRVTITADELSTAY MELSSLTSEDALYYCARGLYYYESSLDYWGQGLVTVSS |
| Cadena V _L de D8 (SEQ ID NO: 14) |
| QSVLTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGYNVSVSWYQHPGKAPKLMIEVTKRPSGVPDRFSAKSGNTASLTVSGL QAEDEADYFCCSYAGHSAYVFGTGTKVTVL |
| Cadena V _k de D80 (SEQ ID NO:16) |
| EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSLSSKYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYSCQQYDGVPRTFGQGTVEIK |

| |
|--|
| Tabla 1I. Secuencias de ácido nucleico de la región variable del anticuerpo F10 |
| Cadena V _H de F10 (SEQ ID NO: 21) |
| CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCACGTCTCTGAAGT CACCTTCAGTAGTTTTGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGCTGGGAGGGATCAGCCCTA TGTTTGGAAACACCTAATTACGCGCAGAAGTTCCAAGGCAGAGTCACCATTACCGCGGACCAGTCCACGAGGACAGCCTAC ATGGACCTGAGGAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCGAGATCTCCTTCTTACATTTGTTCTGGTGG AACCTGCGTCTTTGACCATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA |
| Cadena V _L de F10 (SEQ ID NO: 25) |
| CAGCCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCCAAGGGCTTGAGACAGACCGCCACACTCACCTGCACTGGGAACAGCAA CAATGTTGGCAACCAAGGAGCAGCTTGGCTGCAGCAGCACCAGGGCCACCCTCCCAAACCTCTATCCTACAGGAATAATG ACCGCCCTCAGGGATCTCAGAGAGATTCTCTGCATCCAGGTGAGGAAACACAGCCTCCCTGACCATTACTGGACTCCAG CCTGAGGACGAGGCTGACTATTACTGCTCAACATGGGACAGCAGCCTCAGTGCTGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCT GACCGTCCTA |

| |
|--|
| Tabla 1J. Secuencias de ácido nucleico de la región variable del anticuerpo E90 |
| Cadena V _H de E90 (SEQ ID NO: 23) |
| CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCACGTCTCTGAAGT CACCTTCAGTAGTTTTGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGCTGGGAGGGATCAGCCCTA TGTTTGGAAACACCTAATTACGCGCAGAAGTTCCAAGGCAGAGTCACCATTACCGCGGACCAGTCCACGAGGACAGCCTAC ATGGACCTGAGGAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCGAGATCTCCTTCTTACATTTGTTCTGGTGG AACCTGCGTCTTTGACCATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA |
| Cadena V _L de E90 (SEQ ID NO: 27) |

ES 2 649 536 T3

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
 GAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT
 TGCAAAGAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATTAGCAGCCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGTCAGCAGTATGATAGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTAGAGATCAA
 A

Tabla 1K. Secuencias de aminoácidos de la región variable del anticuerpo F10 y E90

Cadena V_H de F10 y E90 (SEQ ID NO: 18)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSSEVTFSSFAISWVRQAPGQGLEWLGGISPMFGTPNYAQKFQGRVTITADQSTRTAY
 MDLRLRSEDYAVYYCARSPSYICSGGTCVFDHWGQGLVTVSS

Cadena V_L de F10 (SEQ ID NO:20)

QPGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLSYRNDRPSGISERFSASRSGNTASLTIITGLQ
 PEDEADYYCSTWDSLSAVVFGGGTKLTVL

Cadena V_L de E90 (SEQ ID NO: 22)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQRGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQP
 EDFAVYYCQQYDSSPYTFGQGTKVEIK

Tabla 1L. Secuencias de ácido nucleico de la región variable del anticuerpo G17

Cadena V_H de G17 (SEQ ID NO:29)

CAGGTGCAGCTGGTGCATCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGAGT
 CACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGTTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCGGTG
 TCTTTGGTGTACCAAAGTACGCGCAGAACTTCCAGGGCAGAGTACAATTACCGCGACAAACCGACGAGTACAGTCTAC
 ATGGAGCTGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGCCCCGGTACTACGTAGGAAAGAA
 TGGTTTTGATGCTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA

Cadena V_L de G17 (SEQ ID NO: 31)

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCCAAGGGCTTGAGACAGACCGCCATACTCACCTGCACTGGAGACAGCAA
 CAATGTTGGCCACCAAGGTACAGCTTGGCTGCAACAACACCAGGGCCACCCTCCCAAACCTCTATCCTACAGGAATGGCA
 ACCGGCCCTCAGGGATCTCAGAGAGATTCTCTGCATCCAGGTCAGGAAATACAGCCTCCCTGACCATTATTGGACTCCAG
 CCTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGCTCAGTATGGGACAGCAGCCTCAGTGCCTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCT
 GACCGTCCTA

Tabla 1M. Secuencias de aminoácidos de la región variable del anticuerpo G17

Cadena V_H de G17 (SEQ ID NO: 24)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKTSVTFSSYAIISWVRQAPGQGLEWMMGGIIGVFGVPKYQNFQGRVTITADKPTSTVY
 MELNSLRAEDTAVYYCAREPGYYVGNKGFVWVGQGMVTVSS

Cadena V_L de G17 (SEQ ID NO: 26)

SYELTQPPSVSKGLRQTAILTCTGDSNNVGHQGTAWLQQHQGHPPKLLSYRNGNRPSGISERFSASRSGNTASLTIIGLQ
 PEDEADYYCSVWDSLSAVVFGGGTKLTVL

Tabla 1N. Secuencias de ácido nucleico de la región variable del anticuerpo H40

ES 2 649 536 T3

| |
|--|
| Cadena V _H de H40 (SEQ ID NO: 33) |
| CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCATGTAAGGCTTCTGGATA CACCTTCACCGGTTATTATATTTCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGGTTGGATCAACCTA TGACTGGTGGCACAACCTATGCACAGAAGTTTTAGGTCTGGGTACCATGACCCGGGACACGTCCATCAACACAGCCTAC ATGGAGGTGAGCAGGCTGACATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGGGGCTTCCGTATTACGATATTTTGA CTGGCAGCCCCAGGCTCTTGATATCTGGGGCCTCGGGACCACGGTACCCTCTCCTCA |
| Cadena V _L de H40 (SEQ ID NO: 35) |
| CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTGAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAGCATTCCCTGTGGGGGGAACAACAT TGGAGGCTACAGTGTACACTGGTACCAACAAAAGCCGGGCCAGGCCCTCTTGGTCATTTATGACGATAAAGACCGGC CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCGCCAACTCTGGGAGCACGGCCACCCTGACAATCAGCAGGGTCGAAGCCGGG GATGAGGGCGACTACTACTGTGAGGTGTGGGATAGTGGTAATGATCGTCCGCTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGT CCTA |

| |
|--|
| Tabla 1O. Secuencias de aminoácidos de la región variable del anticuerpo H40 |
| Cadena V _H de H40 (SEQ ID NO: 28) |
| QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSKASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPMTGGTNYAQKFQVWVTMTRDTSINTAY MEVSRLLTSDDAVYYCARGASVLRVYFDWQPEALDIWGLGTTVTVSS |
| Cadena V _L de H40 (SEQ ID NO: 30) |
| QPVLTPPPSVSVAPGQTASIPCGGNNIGGYSVHWYQQKPGQAPLLVIYDDKDRPSGIPERFSGANS GSTATLTI SRVEAG DEGDYYCQVWDSGNDRPLFGGGTKLTVL |

| |
|--|
| Tabla 1P. Secuencias de ácido nucleico de la región variable del anticuerpo A66 |
| Cadena V _H de A66 (SEQ ID NO: 37) |
| CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCGGTGAAGGTTTCTGCAAGGCTTCTGGAGG CCCCTTCAGCATGACTGCTTTACCTGGCTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGTTGGGATCAGCCCTA TCTTTTCGTACACCGAAGTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTACGATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCAAC ATGGAGCTGACCAGCCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACCCTTTCTCCTACCAACCGAATAA TGATGCTTTTGTCTATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTACCCTCTCTTCA |
| Cadena V _K de A66 (SEQ ID NO: 39) |
| GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACA GGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCT GAAGATTTTGCAGTCTATTTCTGTGACGAGTATGGTAGCTCACCTCAATTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA |

| |
|--|
| Tabla 1Q. Secuencias de aminoácidos de la región variable del anticuerpo A66 |
| Cadena V _H de A66 (SEQ ID NO: 32) |
| QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGPFSMTAFTWLRQAPGQGLEWMGGISPIFRTPKYAQKFQGRVTITADESTNTAN MELTSLSKSEDAVYYCARTLSSYPNNDFAIHWGQGMVTVSS |
| Cadena V _K de A66 (SEQ ID NO: 34) |
| EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYFCQQYGGSSPQFGQGRLEIK |

ES 2 649 536 T3

| |
|---|
| Tabla 1R. Secuencias de ácido nucleico de la región variable del anticuerpo E88 |
| Cadena V _H de E88 (SEQ ID NO: 40) |
| CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCGGTGAAGGTTTCTGCAAGGCTTCTGGAGG CCCCTTCAGCATGACTGCTTTCACCTGGCTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGTGGGATCAGCCCTA TCTTTCGTACACCGAAGTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCAAC ATGGAGCTGACCAGCCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACCCTTTCCTCCTACCAACCGAATAA TGATGCTTTTGTATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA |
| Cadena V _L de E88 (SEQ ID NO: 42) |
| CTGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTTCTGGAAGCAGCTC CAACATCGGAAGTAATACTGTAAACTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAATAATC AGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAGGTCAGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCATTGGACTCCGG CCTGAGGATGAAGCTGATTACTGTGAGTGTATGACAGCAGGCTCAGTGCTTCTCTCTTCGGAACCTGGGACCACGGT CACCGTCCCTC |

| |
|---|
| Tabla 1S. Secuencias de aminoácidos de la región variable del anticuerpo E88 |
| Cadena V _H de E88 (SEQ ID NO: 36) |
| QVQLVQSGAEVKKKPGSSSVKVSCKASGGPFSSMTAFTWLRQAPGQGLEWMGGISPIFRTPKYAQKFQGRVTITADESTNTAN MELTSLKSEDTAVYYCARTLSSYQPNNDFAFIWGQGMVTVSS |
| Cadena V _L de E88 (SEQ ID NO: 38) |
| LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSRSGTSASLAIIGLR PEDEADYYCQSYSRSLASLFGTGTTVTVL |

5 Las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos neutralizantes de la influenza se muestran en la Tabla 2 a continuación y en la Figura 3.

Tabla 2

| Anticuerpo | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
|------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| CONSENSO | SYAFS (SEQ ID NO: 43) | GIIPMFGTPNYAQKFQG (SEQ ID NO: 51) | SSGYYYG GGFVDV (SEQ ID NO: 59) |
| D7/H98VH | TNAFS (SEQ ID NO: 44) | GVIPLFRTASYAQNVQG (SEQ ID NO: 52) | SSGYHFGRSHFDS (SEQ ID NO: 60) |
| D8/D80VH | AYAFT (SEQ ID NO: 45) | GIIGMFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 53) | GLYYYYESSLDY (SEQ ID NO: 61) |
| F10/90VH | SFAIS (SEQ ID NO: 46) | GISPMFGTPNYAQKFQG (SEQ ID NO: 54) | SPSYICSGGTCVFDH (SEQ ID NO: 62) |
| G17VH | SYAIS (SEQ ID NO: 47) | GIIGVFGVPKYAQKFQG (SEQ ID NO: 55) | EPGYVVGKNGFDV (SEQ ID NO: 63) |
| H40VH | GYIYH (SEQ ID NO: 48) | WINPMTGGTNYAQKFQV (SEQ ID NO: 56) | GASVLRVFDWQPEALDI (SEQ ID NO: 64) |
| A66VH | MTAFT (SEQ ID NO: 49) | GISPIFRTPKYAQKFQG (SEQ ID NO: 57) | TLSSYQPNNDFAFI (SEQ ID NO: 65) |
| 2AVH | DNAIS (SEQ ID NO: 50) | GIIPFGKPNYAQKFQG (SEQ ID NO: 58) | DSDAYYYGSGGMDV (SEQ ID NO: 66) |
| CONSENSO | TGSSSNIGNYVA (SEQ ID NO: 67) | SNSDRPS (SEQ ID NO: 79) | QSYDSL SAYV (SEQ ID NO: 91) |
| D7VL | TGSSSNIAANYVQ (SEQ ID NO: 68) | EDDRRPS (SEQ ID NO: 80) | QSYDTNNHAV (SEQ ID NO: 92) |
| DD8VL | TGTSSDVGGYNSVS (SEQ ID NO: 69) | EVTKRPS (SEQ ID NO: 81) | CSYAGHSAYV (SEQ ID NO: 93) |

| | | | |
|-------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| F10VL | TGNSNNVGNQGAA (SEQ ID NO: 70) | RNNDRPS (SEQ ID NO: 82) | STWDSSLSAVV (SEQ ID NO: 94) |
| G17VH | TGDSNNVGHQGTA (SEQ ID NO: 71) | RNGNRPS (SEQ ID NO: 83) | SVWDSSLSAVV (SEQ ID NO: 95) |
| H40VH | GGNNIGGYSVH (SEQ ID NO: 72) | DDKDRPS (SEQ ID NO: 84) | QVWDGSGNDRPL (SEQ ID NO: 96) |
| A66VH | RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 73) | DASNRAT (SEQ ID NO: 85) | QQYGSSSPQV (SEQ ID NO: 97) |
| D80VL | RASQSLSSKYLA (SEQ ID NO: 74) | GASSRAT (SEQ ID NO: 86) | QQYDGVPRPT (SEQ ID NO: 98) |
| E88VL | TGSSSNIGNYVA (SEQ ID NO: 75) | SNNQRPS (SEQ ID NO: 87) | QSYDSRLSASL (SEQ ID NO: 99) |
| E90VK | SGSSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 76) | AASSLQR (SEQ ID NO: 88) | QQYDSSPYT (SEQ ID NO: 100) |
| H98VL | RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 77) | SNEQRPS (SEQ ID NO: 89) | ASWDDNLSGWV (SEQ ID NO: 101) |
| 2AVL | TLSSGHSNYIIA (SEQ ID NO: 78) | VNSDGSHTKGD (SEQ ID NO: 90) | ETWDTKIHV (SEQ ID NO: 102) |

5 Los expertos en la técnica reconocerán que scFv adicionales y anticuerpos monoclonales que tienen afinidades de unión diferentes también pueden ser terapéuticamente eficaces. Por ejemplo, los anticuerpos y scFv que tienen afinidades de unión que varían de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 200 mM también pueden ser terapéuticamente eficaces.

Neutralización de H5N1 con anticuerpos antigripales.

10 Se incubaron virus pseudotipificados H-5 con scFv bivalente y anticuerpos de longitud completa y se puso en contacto la mezcla anticuerpo-virus con células 293T. La infectividad se cuantificó midiendo la actividad de la luciferasa en las células objetivo. Los anticuerpos D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 y H98 tienen una potente actividad de neutralización contra H5. Los anticuerpos D8, F10 y A66 también cruzaron el H1N1 neutralizado, la cepa H1-SC/1918 neutralizada de manera potente y la cepa moderadamente neutralizada H1-PR-34 (Figuras 4A y 4B)

15 Caracterización del epítipo 8, 10 y 66.

20 El mapeo de epítipos primarios de la unión de 8,10 y 66 a la proteína hemaglutinina de la influenza (HA) mostró que los epítipos de estos tres anticuerpos eran similares y están ubicados en las posiciones 307 en HA1 y en las posiciones 52, 59, 65 y 93 en HA2. Este epítipo está compuesto por la proteína hemaglutinina que no es desprendida por el virus. Esto es diferente a la mayoría de otros anticuerpos antigripales conocidos que se unen a la proteína neuraminidasa que es desprendida por el virus.

25 Caracterización estructural del epítipo nAb

El epítipo y modo de unión de uno de los nAb, F10, resolviendo la estructura cristalina de su fragmento scFv en complejo con HA (H5-VN04) a una resolución de 3,2 Å, y mediante mutagénesis. (Fig. 6 y Tabla 4)

30 En el complejo, cada trímero de H5 se une a tres moléculas de F10, en sitios relacionados con la simetría, comprando ~1500 Å² de superficie de proteína por anticuerpo; la estructura de H5 en sí misma no se ve significativamente alterada por la unión de F10. HA se sintetiza como una cadena sencilla, HA0, que se activa por escisión proteolítica en dos subunidades, HA1 y HA2. La escisión conduce al entierro del "péptido de fusión" (que comprende los primeros ~ 21 residuos de HA2) en el vástago proximal a la membrana. La unión de F10 ocurre exclusivamente en esta región (Fig. 6), estableciendo contactos íntimos con el péptido de fusión, elementos de HA1 y HA2 (los cuales son parte integral de la estructura de esta región) que bloquean el péptido en su lugar en la conformación de pH neutro, así como la horquilla helicoidal grande de HA2 que experimenta un cambio de conformación masivo a pH ácido para propulsar el péptido de fusión desde su bolsillo proximal de la membrana viral a la superficie distal del virus, donde puede desencadenar la fusión con la membrana endosómica.

40 La cadena pesada de F10 juega el papel principal en la unión a H5, utilizando las puntas de sus tres regiones determinantes de complementariedad (CDR). Cada molécula F10 establece contactos con las subunidades HA1 y HA2 dentro de un solo monómero del trímero de HA (Fig. 6). La región de contacto comprende un bolsillo formado por parte del péptido de fusión de HA2, con elementos de HA1 en un lado y una cara expuesta de hélice αA de HA2 en el otro (Figura 6). Una triada de residuos de anticuerpos - F55 y M54 de CDR H2, y Y102 de CDR H3 - forman puntos de contacto principales. El anillo de fenilo de F55 se extiende a través de una superficie plana formada por un bucle prominente del bucle peptídico de fusión (residuos DGW de HA2 19₂-21₂ (esquema de numeración de H3; los subíndices 1 y 2 se refieren a cadenas HA1 y HA2)) y las cadenas laterales aromáticas de dos histidinas flanqueantes

(residuos 18₁ y 38₁) y un triptófano, W21₂, que forma la parte posterior del bolsillo. La cadena lateral de M54 también entra en contacto con los anillos aromáticos de W21₂ y H38₁, así como con la cadena lateral de I45₂ de la hélice αA, mientras que su cadena principal carbonilo de oxígeno hidrógeno se une con la cadena lateral de H38₁. Y102 inserta su cadena lateral en una hendidura hidrófoba creada por cuatro cadenas laterales de la hélice αA, y también enlaces de hidrógeno con una cadena principal carbonilo (D19₂) del péptido de fusión. El bucle CDR H1 hace múltiples contactos con el extremo terminal C de la hélice αA y un bucle de HA1 en la base de la región de la cabeza (Figuras 6B y 6C).

En paralelo, se llevaron a cabo experimentos de mutagénesis en la hélice αA para ayudar a definir el epítipo (Fig. 6). Las mutaciones en 3 residuos que entran en contacto directo con el anticuerpo: V52A/E, N53A e I56A, redujeron significativamente o suprimieron la unión del anticuerpo, mientras que la mutación conservadora, V52L, no tuvo ningún efecto. Como controles, las mutaciones en una cara expuesta diferente de la hélice, que no entra en contacto con el anticuerpo, no tuvieron ningún efecto sobre la unión del anticuerpo (Figura 4D). Por lo tanto, la mutagénesis de la hélice αA es completamente coherente con el epítipo definido cristalográficamente para F10. Además, los otros dos nAb, para los cuales no existen datos estructurales, mostraron un perfil de unión a mutante-nAb casi idéntico, indicativo de un epítipo estrechamente coincidente y consistente con la unión competitiva (Figura 6, Figura 9). Tomados en conjunto, concluimos que los tres nAb neutralizan virus estabilizando la conformación de pH neutro de HA en una región que proporciona el desencadenante (la liberación más probable del péptido de fusión de su bolsillo) para cambios conformacionales que conducen al estado fusogénico.

20 Anticuerpos

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno. Por "se une específicamente" o "inmunorreacciona con" se entiende que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona con otros polipéptidos. Los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de expresión de dAb (anticuerpo de dominio) policlonal, monoclonal, quimérico, fragmentos F_{ab}, F_{ab}' y F_{(ab)2} monocatenarios, scFv y F_{ab}.

Una molécula polipeptídica de Fv de cadena sencilla ("scFv") es un heterodímero V_H::V_L unido covalentemente, que se puede expresar a partir de una fusión génica que incluye genes que codifican V_H y V_L unidos mediante un enlazador que codifica un péptido. (Véase Huston et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85 (16): 5879-5883). Se han descrito varios métodos para discernir estructuras químicas para convertir las cadenas polipeptídicas ligera y pesada naturalmente agregadas, pero químicamente separadas, de una región V de anticuerpo en una molécula de scFv, que se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión al antígeno. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5.091.513, 5.132.405, y 4.946.778.

Se han creado y pueden crearse bibliotecas de scFv humanas no modificadas muy grandes para ofrecer una gran fuente de genes de anticuerpos reordenados frente a una plétora de moléculas objetivo. Las bibliotecas más pequeñas se pueden construir a partir de individuos con enfermedades infecciosas con el fin de aislar anticuerpos específicos de la enfermedad. (Véase Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9339-43 (1992); Zebedee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3175-79 (1992)).

En general, las moléculas de anticuerpo obtenidas de humanos se refieren a cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas clases también tienen subclases, como IgG1, IgG2 y otras. Además, en humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

El término "sitio de unión a antígeno" o "porción de unión" se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión al antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables ("V") del extremo terminal N de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera, denominadas "regiones hipervariables", se interponen entre los tramos flanqueantes más conservados conocidos como "regiones marco" o "FR". Por lo tanto, el término "FR" se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran naturalmente entre, y adyacentes a, regiones hipervariables en inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada están dispuestas una respecto de la otra en un espacio tridimensional para formar una superficie de unión al antígeno. La superficie de unión al antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y ligera se denominan "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR".

Como se usa en este documento, el término "epítipo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina, un scFv o un receptor de células T. Los determinantes epitópicos suelen consistir en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y, por lo general, tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos contra péptidos del terminal N o del terminal C de un polipéptido.

Como se usa en el presente documento, los términos "unión inmunológica" y "propiedades de unión inmunológica" se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se produce entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica. La fuerza o afinidad de las interacciones de unión inmunológica se puede expresar en términos de la constante de disociación (K_d) de la interacción, donde una K_d más pequeña representa una afinidad mayor. Las propiedades de unión inmunológica de polipéptidos seleccionados se pueden cuantificar usando métodos bien conocidos en la técnica. Uno de tales métodos implica medir las velocidades de formación y disociación del complejo sitio de unión al antígeno/antígeno, donde esas velocidades dependen de las concentraciones de los socios del complejo, la afinidad de la interacción y los parámetros geométricos que influyen igualmente en la velocidad en ambas direcciones. Por lo tanto, tanto la "constante de afinidad" (K_{on}) como la "constante de disociación" (K_{off}) pueden determinarse mediante el cálculo de las concentraciones y las relaciones reales de asociación y disociación. (Véase Nature 361: 186-87 (1993)). La relación de K_{off}/K_{on} permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación K_d . (Véase, en general, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59: 439-473). Se dice que un anticuerpo de la presente invención se une específicamente a un epítipo de influenza cuando la constante de unión en equilibrio (K_d) es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$, más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$, y lo más preferiblemente $\leq 100 \text{ pM}$ hasta aproximadamente 1 pM , medido por ensayos tales como ensayos de unión de radioligando o ensayos similares conocidos por los expertos en la técnica.

Una proteína de la influenza (por ejemplo, HA o neuraminidasa) de la descripción o un derivado, fragmento, análogo, homólogo u ortólogo de la misma, se puede utilizar como un inmunógeno en la generación de anticuerpos que unen inmuno-específicamente estos componentes proteicos.

Los expertos en la técnica reconocerán que es posible determinar, sin excesiva experimentación, si un anticuerpo monoclonal humano tiene la misma especificidad que un anticuerpo monoclonal humano de la invención al determinar si el primero impide que este último se una a la proteína HA del virus de la influenza. Si el anticuerpo monoclonal humano que se prueba compite con el anticuerpo monoclonal humano de la invención, como se muestra por una disminución en la unión por el anticuerpo monoclonal humano de la invención, entonces es probable que los dos anticuerpos monoclonales se unan al mismo o a un epítipo estrechamente relacionado.

Otra forma de determinar si un anticuerpo monoclonal humano tiene la especificidad de un anticuerpo monoclonal humano de la invención es incubar previamente el anticuerpo monoclonal humano de la invención con la proteína HA de la influenza, con la que normalmente es reactivo, y luego añadir el anticuerpo monoclonal humano que se está probando para determinar si el anticuerpo monoclonal humano que se está probando se inhibe en su capacidad de unirse a la proteína HA. Si el anticuerpo monoclonal humano que se prueba se inhibe entonces, con toda probabilidad, tiene la misma especificidad epitópica, o funcionalmente equivalente, que el anticuerpo monoclonal de la invención. El cribado de anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se puede llevar a cabo utilizando el virus de la influenza y determinando si el anticuerpo monoclonal de prueba puede neutralizar el virus de la influenza.

Se pueden usar diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra una proteína de la divulgación, o contra derivados, fragmentos, análogos, homólogos u ortólogos de los mismos. (Véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, y Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Los anticuerpos pueden purificarse mediante técnicas bien conocidas, tales como la cromatografía de afinidad usando proteína A o proteína G, que proporcionan principalmente la fracción de IgG del suero inmune. Posteriormente, o alternativamente, el antígeno específico que es el objetivo de la inmunoglobulina buscada, o un epítipo del mismo, se puede inmovilizar en una columna para purificar el anticuerpo inmune específico mediante cromatografía de inmunoafinidad. La purificación de inmunoglobulinas se analiza, por ejemplo, por D. Wilkinson (The Scientist, publicado por The Scientist, Inc., Filadelfia PA, Vol. 14, No. 8 (17 de abril de 2000), págs. 25-28).

El término "anticuerpo monoclonal" o "MAb" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpos que contiene solo una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste en un producto génico único de cadena ligera y un producto génico único de cadena pesada. En particular, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los MAb contienen un sitio de unión a antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular del antígeno caracterizado por una afinidad de unión única para él.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256: 495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

El agente inmunizante típicamente incluirá el antígeno de proteína, un fragmento del mismo o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, se usan linfocitos de sangre periférica si se desean células de origen humano, o células de bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos luego se fusionan con una

línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) págs. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas generalmente son células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen en roedor, bovino y humano. Habitualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficiente, soportan la expresión estable de alto nivel del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) páginas 51-63)).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede a continuación ensayarse en cuanto a la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980). Además, en aplicaciones terapéuticas de anticuerpos monoclonales, es importante identificar anticuerpos que tengan un alto grado de especificidad y una alta afinidad de unión por el antígeno objetivo.

Después de que se identifican las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar por métodos estándar. (Véase Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) páginas 59-103). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado de Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de proteína A-Sefarosa, de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente de los Estados Unidos No. 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la divulgación sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que luego se transfectan en células hospedadoras tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (véase la patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994)) o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no de inmunoglobulina. Tal polipéptido no de inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos completamente humanos son moléculas de anticuerpo en las que la secuencia completa tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, que incluye las CDR, proviene de genes humanos. Dichos anticuerpos se denominan "anticuerpos humanos" o "anticuerpos completamente humanos" en este documento. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse usando la técnica de trioma; la técnica del hibridoma de células B humanas (véase Kozbor, et al., 1983 *Immunol Today* 4: 72); y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, et al., 1985 en: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Se pueden utilizar anticuerpos monoclonales humanos y se pueden producir usando hibridomas humanos (véase Cote, et al., 1983. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026-2030) o transformando células B humanas con virus de Epstein Barr *in vitro* (véase Cole, et al., 1985 en: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96).

Además, los anticuerpos humanos también se pueden producir usando técnicas adicionales, que incluyen bibliotecas de

presentación en fagos. (Véase Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)). De forma similar, los anticuerpos humanos pueden prepararse introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la que se observa en humanos en todos los aspectos, incluida la reorganización genética, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, y en Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13, 65-93 (1995).

Los anticuerpos humanos se pueden producir adicionalmente usando animales transgénicos no humanos que se modifican para producir anticuerpos completamente humanos en lugar de los anticuerpos endógenos del animal en respuesta al reto por un antígeno. (Véase la publicación PCT WO94/02602). Los genes endógenos que codifican las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera en el huésped no humano han sido incapacitados, y los loci activos que codifican las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera humanas se insertan en el genoma del huésped. Los genes humanos se incorporan, por ejemplo, usando cromosomas artificiales de levadura que contienen los segmentos de ADN humano requeridos. Entonces se obtiene un animal que proporciona todas las modificaciones deseadas como progenie mediante cruzamiento de animales transgénicos intermedios que contienen menos que el complemento total de las modificaciones. La realización preferida de dicho animal no humano es un ratón, y se denomina Xenomouse^{MR} como se describe en las publicaciones PCT WO 96/33735 y WO 96/34096. Este animal produce células B que secretan inmunoglobulinas completamente humanas. Los anticuerpos se pueden obtener directamente del animal después de la inmunización con un inmunógeno de interés, como, por ejemplo, una preparación de un anticuerpo policlonal, o alternativamente de células B inmortalizadas derivadas del animal, tales como hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, los genes que codifican las inmunoglobulinas con regiones variables humanas pueden recuperarse y expresarse para obtener los anticuerpos directamente, o pueden modificarse adicionalmente para obtener análogos de anticuerpos tales como, por ejemplo, moléculas de Fv de una sola cadena (scFv).

Un ejemplo de un método para producir un huésped no humano, ejemplificado como un ratón, que carece de expresión de una cadena pesada de inmunoglobulina endógena se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5.939.598. Puede obtenerse mediante un método, que incluye eliminar los genes del segmento J de al menos un locus de cadena pesada endógena en una célula madre embrionaria para evitar la reorganización del locus y evitar la formación de una transcripción de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina reorganizada, la eliminación se efectúa mediante un vector de direccionamiento que contiene un gen que codifica un marcador seleccionable; y produciendo a partir de la célula madre embrionaria un ratón transgénico cuyas células somáticas y germinales contienen el gen que codifica el marcador seleccionable.

Un método para producir un anticuerpo de interés, tal como un anticuerpo humano, se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5.916.771. Este método incluye introducir un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada en una célula huésped de mamífero en cultivo, introducir un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera en otra célula huésped de mamífero y fusionar las dos células para formar una célula híbrida. La célula híbrida expresa un anticuerpo que contiene la cadena pesada y la cadena ligera.

En una mejora adicional de este procedimiento, un método para identificar un epítipo clínicamente relevante en un inmunógeno, y un método correlativo para seleccionar un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente al epítipo relevante con alta afinidad, se describen en la publicación PCT WO 99/53049.

El anticuerpo puede expresarse mediante un vector que contiene un segmento de ADN que codifica el anticuerpo monocatenario descrito anteriormente.

Estos pueden incluir vectores, liposomas, ADN desnudo, ADN asistido por adyuvante, pistola génica, catéteres, etc. Los vectores incluyen conjugados químicos tales como los descritos en el documento WO 93/64701, que tiene una fracción de direccionamiento (por ejemplo, un ligando para un receptor de la superficie celular), y una fracción de unión a ácido nucleico (por ejemplo, polilisina), vector viral (por ejemplo, un vector viral de ADN o ARN), proteínas de fusión tales como las descritas en el documento PCT/US 95/02140 (WO 95/22618) que es una proteína de fusión que contiene una fracción objetivo (por ejemplo, un anticuerpo específico para una célula objetivo) y una fracción de unión a ácido nucleico (por ejemplo, una protamina), plásmidos, fago, etc. Los vectores pueden ser cromosómicos, no cromosómicos o sintéticos.

Los vectores preferidos incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina Moloney. Se prefieren vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores de viruela tales como vectores ortoviruela o viruela aviar, vectores del virus del herpes tales como un vector del virus del herpes simple I (HSV) (véase Geller, AI et al., *J. Neurochem.* 64: 487 (1995); Lim, F. et al., en *DNA Cloning: Mammalian Systems*, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, AI et al., *Proc Natl. Acad. Sci.: USA* 90: 7603 (1993), Geller, AI, et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1149 (1990), vectores de adenovirus (véase LeGal LaSalle et al., *Science*, 259: 988 (1993); Davidson, et al., *Nat. Genet* 3: 219 (1993); Yang, et al., *J. Virol.* 69: 2004 (1995) y

vectores de virus adenoasociados (véase Kaplitt, MG et al., Nat. Genet., 8: 148 (1994).

Los vectores virales de viruela introducen el gen en el citoplasma de las células. Los vectores del virus de viruela aviar dan como resultado solo una expresión a corto plazo del ácido nucleico. Se prefieren vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados y vectores del virus del herpes simple (HSV) para introducir el ácido nucleico en las células neurales. El vector de adenovirus da como resultado una expresión a más corto plazo (aproximadamente 2 meses) que el virus adenoasociado (aproximadamente 4 meses), que a su vez es más corto que los vectores de HSV. El vector particular elegido dependerá de la célula objetivo y la condición que se trate. La introducción puede ser mediante técnicas estándar, por ejemplo, infección, transfección, transducción o transformación. Los ejemplos de modos de transferencia génica incluyen, por ejemplo, ADN desnudo, precipitación con CaPO₄, DEAE dextrano, electroporación, fusión de protoplastos, lipofección, microinyección celular y vectores virales.

El vector se puede emplear para dirigirse esencialmente a cualquier célula objetivo deseada. Por ejemplo, la inyección estereotáxica se puede usar para dirigir los vectores (por ejemplo, adenovirus, HSV) a una ubicación deseada. Además, las partículas pueden administrarse mediante infusión intracerebroventricular (icv) usando un sistema de infusión de mini bomba, tal como un sistema de infusión SynchroMed. Un método basado en el flujo a granel, denominado convección, también ha demostrado ser eficaz en el suministro de moléculas grandes a áreas extendidas del cerebro y puede ser útil para suministrar el vector a la célula objetivo. (Véase Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994); Morrison et al., Am. J. Physiol., 266: 292-305 (1994)). Otros métodos que pueden usarse incluyen catéteres, inyección intravenosa, parenteral, intraperitoneal y subcutánea, y vías de administración oral u otras conocidas.

Estos vectores se pueden usar para expresar grandes cantidades de anticuerpos que se pueden usar de varias maneras. Por ejemplo, para detectar la presencia de un virus de influenza en una muestra. El anticuerpo también se puede usar para intentar unirse y romper la fusión de la membrana celular del virus de la influenza.

Las técnicas se pueden adaptar para la producción de anticuerpos monocatenarios específicos para una proteína antigénica de la divulgación (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.946.778). Además, los métodos pueden adaptarse para la construcción de bibliotecas de expresión de F_{ab} (véase, por ejemplo, Huse, et al., 1989 Science 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos F_{ab} monoclonales con la especificidad deseada para una proteína o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Los fragmentos de anticuerpos que contienen los idiotipos para un antígeno de proteína se pueden producir mediante técnicas conocidas en el arte que incluyen, pero no se limitan a: (i) un fragmento F_{(ab)₂} producido por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento F_{ab} generado al reducir los puentes disulfuro de un fragmento F_{(ab)₂}; (iii) un fragmento F_{ab} generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor y (iv) fragmentos F_v.

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente descripción. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (véase la patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (véanse los documentos WO 91/00360, WO 92/200373, EP 03089). Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, que incluyen aquellos que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos NO. 4.676.980.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, para mejorar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de la influenza. Por ejemplo, el residuo o residuos de cisteína pueden introducirse en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro entre las cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una mayor destrucción de células mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). (Véase Caron et al., J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). Alternativamente, se puede modificar un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y, por lo tanto, puede tener lisis mejorada del complemento y capacidades de ADCC. (Véase Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

La descripción también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o de origen animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen la cadena de difteria A, fragmentos activos no enlazantes de la toxina diftérica, la cadena de exotoxina A (de Pseudomonas aeruginosa), la cadena de ricina A, la cadena de abrina A, la cadena de modeccina A, alfa sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de Sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los

tricotecnos. Una variedad de radionucleidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como clorhidrato de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolieno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén triaminapentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. (Véase el documento WO94/11026).

Los expertos en la técnica reconocerán que una gran variedad de fracciones posibles se puede acoplar a los anticuerpos resultantes o a otras moléculas de la invención. (Véase, por ejemplo, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J.M. Cruse y R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, Nueva York, (1989).

El acoplamiento se puede realizar mediante cualquier reacción química que se unirá a las dos moléculas siempre que el anticuerpo y el otro resto retengan sus actividades respectivas. Este enlace puede incluir muchos mecanismos químicos, por ejemplo unión covalente, unión por afinidad, intercalación, unión coordinada y complejación. La unión preferida es, sin embargo, unión covalente. La unión covalente puede lograrse mediante condensación directa de las cadenas laterales existentes o mediante la incorporación de moléculas puente externas. Muchos agentes enlazantes bivalentes o polivalentes son útiles para acoplar moléculas de proteínas, tales como los anticuerpos de la presente invención, a otras moléculas. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento representativos pueden incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos y hexametilendiaminas. Este listado no pretende ser exhaustivo de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidos en la técnica sino, más bien, es un ejemplo de los agentes de acoplamiento más comunes. (Véase Killen y Lindstrom, Jour. Immun. 133: 1335-2549 (1984), Jansen et al., Immunological Reviews 62: 185-216 (1982), y Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987)). Los enlazadores preferidos se describen en la literatura. (Véase, por ejemplo, Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44: 201-208 (1984) que describe el uso de MBS (éster de M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida). Véase también la patente de Estados Unidos No. 5.030.719, que describe uso de un derivado de hidracida de acetilo halogenada acoplada a un anticuerpo por medio de un enlazador oligopéptido. Los enlazadores particularmente preferidos incluyen: (i) clorhidrato de EDC (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida, (ii) SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (succinimidil-6-[3-(2-piridilditio)propionamida]hexanoato (Pierce Chem. Co., Cat. # 21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidil-6-[3-(2-piridilditio)-propionamida]hexanoato (Pierce Chem. Co. Cat. # 2165-G); v) sulfo-NHS (N-hidroxisulfo-succinimida: Pierce Chem. Co., Cat. # 24510) conjugado con EDC.

Los enlazadores descritos anteriormente contienen componentes que tienen diferentes atributos, lo que conduce a conjugados con diferentes propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, los ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos de alquilo son más estables que los ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos aromáticos. Los enlazadores que contienen éster de NHS son menos solubles que los ésteres de sulfo-NHS. Además, el enlazador SMPT contiene un enlace disulfuro estéricamente impedido, y puede formar conjugados con mayor estabilidad. Los enlaces disulfuro, en general, son menos estables que otros enlaces debido a que el enlace disulfuro se escinde *in vitro*, dando como resultado un menor conjugado disponible. Sulfo-NHS, en particular, puede mejorar la estabilidad de los acoplamientos de carbodiimida. Los acoplamientos de carbodiimida (tales como EDC) cuando se usan junto con sulfo-NHS, forman ésteres que son más resistentes a la hidrólisis, que la reacción de acoplamiento de carbodiimida sola.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con un tiempo de circulación mejorado se describen en la patente de los Estados Unidos No. 5.013.556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina que forma un derivado con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro.

Uso de anticuerpos contra el virus de la influenza

Los métodos para el cribado de anticuerpos que poseen la especificidad deseada incluyen, pero no se limitan a, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y otras técnicas inmunológicamente mediadas conocidas en la técnica.

5 Los anticuerpos dirigidos contra una proteína del virus de la influenza tal como HA (o un fragmento de la misma) pueden usarse en métodos conocidos en la técnica relacionados con la localización y/o cuantificación de una proteína del virus de la influenza (por ejemplo, para usar en la medición de los niveles de la proteína del virus de la influenza dentro de muestras fisiológicas apropiadas, para uso en métodos de diagnóstico, para uso en la formación de imágenes de la proteína, y similares). En una realización dada, los anticuerpos específicos para una proteína del virus de la influenza, o derivado, fragmento, análogo u homólogo de los mismos, que contienen el dominio de unión al antígeno derivado del anticuerpo, se utilizan como compuestos farmacológicamente activos (denominados en lo sucesivo "Terapéuticos").

10 Se puede usar un anticuerpo específico para una proteína del virus de la influenza de la invención para aislar un polipéptido del virus de la influenza mediante técnicas estándar, tales como inmunoafinidad, cromatografía o inmunoprecipitación. Los anticuerpos dirigidos contra una proteína del virus de la influenza (o un fragmento del mismo) se pueden usar para diagnosticar los niveles de proteína en el tejido como parte de un procedimiento de prueba clínica, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección se puede facilitar acoplando (es decir, uniendo físicamente) el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina, y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

20 Los anticuerpos de la invención, que incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados y completamente humanos, pueden usarse como agentes terapéuticos. Tales agentes se emplearán generalmente para tratar o prevenir una enfermedad o patología relacionada con el virus de la influenza (por ejemplo, influenza aviar) en un sujeto. Se administra al sujeto una preparación de anticuerpo, preferiblemente una que tiene alta especificidad y alta afinidad por su antígeno objetivo, y generalmente tendrá un efecto debido a su unión con el objetivo. La administración del anticuerpo puede anular o inhibir o interferir con la internalización del virus en una célula. En este caso, el anticuerpo se une al objetivo y enmascara un sitio de unión del ligando natural, bloqueando así la fusión del virus a la membrana celular inhibiendo la internalización del virus.

25 Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención se refiere generalmente a la cantidad necesaria para alcanzar un objetivo terapéutico. Como se indicó anteriormente, esta puede ser una interacción de unión entre el anticuerpo y su antígeno objetivo que, en ciertos casos, interfiere con el funcionamiento del objetivo. La cantidad requerida para su administración dependerá además de la afinidad de unión del anticuerpo por su antígeno específico, y también dependerá de la velocidad a la que un anticuerpo administrado se elimina del volumen libre del otro sujeto al que se administra. Los intervalos comunes para la dosificación terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención pueden ser, a modo de ejemplo no limitante, de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Las frecuencias de dosificación comunes pueden variar, por ejemplo, de dos veces al día a una vez a la semana.

35 Los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína del virus de la influenza o a un fragmento de la misma, así como a otras moléculas identificadas por los ensayos de cribado descritos aquí, pueden administrarse para el tratamiento de trastornos relacionados con el virus de la influenza en forma de composiciones farmacéuticas. Los principios y consideraciones involucrados en la preparación de tales composiciones, así como la orientación en la elección de los componentes, se proporcionan, por ejemplo, en Remington: The Science And Practice of Pharmacy, 19^a ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., Editores) Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; y Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, Nueva York.

40 Cuando se usan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína objetivo. Por ejemplo, con base en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que conserven la capacidad de unirse a la secuencia de proteína objetivo. Tales péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. (Véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)). La formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Alternativamente, o además, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido.

45 Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

5 Se pueden elaborar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos (patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT^{MR} (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli-D-(-)-ácido 3-hidroxi-butírico. Mientras que los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

15 Un anticuerpo de acuerdo con la invención se puede usar como un agente para detectar la presencia de un virus de la influenza (o una proteína o un fragmento de proteína del mismo) en una muestra. Preferiblemente, el anticuerpo contiene una etiqueta detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Se puede usar un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, F_{ab}, scFv o F_{(ab)2}). El término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende abarcar la marcación directa de la sonda o anticuerpo acoplado (es decir, uniendo físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como la marcación indirecta de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está directamente marcado. Los ejemplos de marcación indirecta incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado de manera fluorescente y el marcado final de una sonda de ADN con biotina de manera que se pueda detectar con estreptavidina marcada de forma fluorescente. El término "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. Incluido dentro del uso del término "muestra biológica", por lo tanto, se encuentra la sangre y una fracción o componente de la sangre que incluye suero sanguíneo, plasma sanguíneo o linfa. Es decir, el método de detección de la invención se puede usar para detectar un ARNm, proteína o ADN genómico de un analito en una muestra biológica *in vitro*, así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de un ARNm analito incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de una proteína analito incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de un ADN genómico de analito incluyen hibridaciones Southern. Se describen procedimientos para realizar inmunoensayos, por ejemplo, en "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; y "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de una proteína analito incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo de proteína anti-analito marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radioactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto pueden detectarse mediante técnicas de formación de imágenes estándar.

40 Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos o agentes de la invención (también denominados aquí "compuestos activos"), y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Tales composiciones típicamente comprenden el anticuerpo o agente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en este documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los portadores adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en este campo. Los ejemplos preferidos de tales vehículos o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero humana al 5%. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. Compuestos activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su ruta de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosal y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); reguladores tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o

viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

5 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL^{MR} (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina regulada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de administración. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

20 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada previamente de forma estéril del mismo.

30 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en tabletas. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de tabletas, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para usar como enjuague bucal, en el que el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se agita y se expectora o se traga. Los agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o los materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido alginico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o saborizante de naranja.

40 Para la administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de un atomizador en aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

45 La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a penetrar. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

50 Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

55 En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, como etileno-acetato de vinilo, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente a través de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) también pueden usarse como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 4.522.811.

65 Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para

5 facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que debe lograrse, y las limitaciones inherentes en la técnica de composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

10 Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un recipiente, empaque o dispensador junto con instrucciones para la administración.

Métodos de cribado

15 La descripción proporciona métodos (también denominados en el presente documento "ensayos de cribado") para identificar moduladores, es decir, compuestos o agentes candidatos o de prueba (por ejemplo, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos) que modulan o bien interfieren con la fusión de un virus de influenza a la membrana celular. También se proporcionan métodos para identificar compuestos útiles para tratar la infección por influenza. La descripción también abarca compuestos identificados usando los ensayos de cribado descritos en este documento.

20 Por ejemplo, la divulgación proporciona ensayos para cribar compuestos candidatos o de prueba que modulan la interacción entre el virus de la influenza y la membrana celular. Los compuestos de prueba de la divulgación se pueden obtener usando cualquiera de los numerosos enfoques en los métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, que incluyen: bibliotecas biológicas; bibliotecas de fases sólidas o fase de solución paralelas direccionables espacialmente; métodos de biblioteca sintética que requieren deconvolución; el método de biblioteca "una cuenta un compuesto"; y métodos de biblioteca sintética que usan selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de la biblioteca biológica está limitado a las bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a las bibliotecas de péptidos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas de compuestos. (Véase, por ejemplo, Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12: 145).

30 Una "molécula pequeña" como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 5 kD y lo más preferiblemente de menos de aproximadamente 4 kD. Las moléculas pequeñas pueden ser, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas. Las bibliotecas de mezclas químicas y/o biológicas, tales como extractos fúngicos, bacterianos o de algas, son conocidas en la técnica y pueden cribarse con cualquiera de los ensayos de la divulgación.

35 Ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares se pueden encontrar en la técnica, por ejemplo, en: DeWitt, et al., 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6909; Erb, et al., 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 11422; Zuckermann, et al., 1994. *J. Med. Chem.* 37: 2678; Cho, et al., 1993. *Science* 261: 1303; Carrell, et al., 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carell, et al., 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; y Gallop, et al., 1994. *J. Med. Chem.* 37: 1233.

40 Las bibliotecas de compuestos se pueden presentar en solución (véase, por ejemplo, Houghten, 1992. *Biotechniques* 13: 412-421), o en perlas (véase Lam, 1991. *Nature* 354: 82-84), en chips (véase Fodor, 1993. *Nature* 364: 555-556), bacterias (véase la patente de los Estados Unidos No. 5.223.409), esporas (véase la patente de los Estados Unidos No. 5.233.409), plásmidos (véase Cull, et al., 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869) o en un fago (véase Scott y Smith, 1990. *Science* 249: 386-390; Devlin, 1990. *Science* 249: 404-406; Cwirla, et al., 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378-6382; Felici, 1991. *J. Mol. Biol.* 222: 301-310 y la patente de los Estados Unidos No. 5.233.409).

45 En una realización, se introduce un compuesto candidato en un complejo anticuerpo-antígeno y se determina si el compuesto candidato rompe el complejo anticuerpo-antígeno, donde una ruptura de este complejo indica que el compuesto candidato modula la interacción entre un virus de influenza y la membrana celular. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser el anticuerpo monoclonal D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 y H98, y el antígeno puede estar localizado en la proteína HA de un virus de la influenza.

50 En otra realización, se proporciona al menos una proteína HA, que está expuesta a al menos un anticuerpo monoclonal neutralizante. Se detecta la formación de un complejo anticuerpo-antígeno y uno o más compuestos candidatos se introducen en el complejo. Si el complejo anticuerpo-antígeno se rompe después de la introducción del uno o más compuestos candidatos, los compuestos candidatos son útiles para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con el virus de la influenza, por ejemplo, influenza aviar. Por ejemplo, puede proporcionarse al menos una proteína del virus de la influenza como una molécula del virus de la influenza.

55 La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para interferir con o romper el complejo anticuerpo-antígeno se puede lograr, por ejemplo, acoplando el compuesto de ensayo con un radioisótopo o marcador enzimático tal que la unión del compuesto de prueba al antígeno o su porción biológicamente activa se puede determinar

detectando el compuesto marcado en un complejo. Por ejemplo, los compuestos de ensayo pueden marcarse con ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³H, directa o indirectamente, y el radioisótopo puede detectarse mediante recuento directo de radioemisión o mediante conteo de centelleo. Alternativamente, los compuestos de ensayo pueden marcarse enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, y la marca enzimática puede detectarse mediante la determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto.

En una realización, el ensayo comprende poner en contacto un complejo anticuerpo-antígeno con un compuesto de ensayo, y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con el antígeno o bien romper el complejo anticuerpo-antígeno existente. En esta realización, determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con el antígeno y/o romper el complejo anticuerpo-antígeno comprende determinar la capacidad del compuesto de prueba para unirse preferentemente al antígeno o a una porción biológicamente activa del mismo, en comparación con el anticuerpo.

En otra realización, el ensayo comprende poner en contacto un complejo anticuerpo-antígeno con un compuesto de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular el complejo anticuerpo-antígeno. La determinación de la capacidad del compuesto de prueba para modular el complejo anticuerpo-antígeno puede lograrse, por ejemplo, determinando la capacidad del antígeno para unirse o interactuar con el anticuerpo, en presencia del compuesto de prueba.

Los expertos en la técnica reconocerán que, en cualquiera de los métodos de cribado descritos en la presente memoria, el anticuerpo puede ser un anticuerpo neutralizante del virus de la influenza, tal como el anticuerpo monoclonal D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 y H98. Adicionalmente, el antígeno puede ser una proteína HA, o una porción de la misma en cualquiera de los ensayos descritos aquí, la capacidad de un compuesto candidato para interferir con la unión entre el anticuerpo monoclonal D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 y H98 y la proteína HA indica que el compuesto candidato será capaz de interferir con o modular la fusión del virus de la influenza y la membrana celular. Además, debido a que la unión de la proteína HA a la célula es responsable de la entrada del virus de la influenza en las células, tales compuestos candidatos también serán útiles en el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con el virus de la influenza, por ejemplo, influenza aviar.

Los métodos de cribado descritos en este documento se pueden realizar como un ensayo basado en células o como un ensayo libre de células. Los ensayos sin células de la divulgación son susceptibles de usar tanto la forma soluble como la forma unida a la membrana de las proteínas HA y fragmentos de las mismas. En el caso de ensayos libres de células que comprenden las formas unidas a la membrana de las proteínas HA, puede ser deseable utilizar un agente solubilizante de tal forma que la forma unida a la membrana de las proteínas se mantenga en solución. Ejemplos de tales agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltosido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecilmaltosido, sulfonato de N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano, sulfonato de 3-(3-colamidopropil)dimetilaminol-1-propano (CHAPS), o sulfonato de 3-(3-colamidopropil)dimetilaminol-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO).

En más de una realización, puede ser deseable inmovilizar el anticuerpo o el antígeno para facilitar la separación de formas complejadas de las no complejadas de una o ambas después de la introducción del compuesto candidato, así como para acomodar la automatización del ensayo. La observación del complejo anticuerpo-antígeno en presencia y en ausencia de un compuesto candidato puede lograrse en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Los ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. En una realización, puede proporcionarse una proteína de fusión que añade un dominio que permite que una o ambas proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión GST-anticuerpo o las proteínas de fusión GST-antígeno se pueden adsorber en perlas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación que forman derivados con glutatión, que luego se combinan con el compuesto de prueba, y la mezcla se incuba en condiciones propicias para la formación de complejos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para la sal y el pH). Después de la incubación, las perlas o los pozos de la placa de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente no unido, se inmoviliza la matriz en el caso de perlas, se determina el complejo directa o indirectamente. Alternativamente, los complejos se pueden disociar de la matriz, y el nivel de formación del complejo anticuerpo-antígeno puede determinarse usando técnicas estándar.

Otras técnicas para inmovilizar proteínas en matrices también pueden usarse en los ensayos de cribado de la divulgación. Por ejemplo, el anticuerpo o el antígeno (por ejemplo, pueden inmovilizarse utilizando conjugación de biotina y estreptavidina). Pueden prepararse anticuerpos biotinilados o moléculas de antígeno a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) usando técnicas bien conocidas en el arte (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, IL), e inmovilizados en los pozos de placas de 96 pozos recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, otros anticuerpos reaccionan con el anticuerpo o antígeno de interés, pero que no interfieren con la formación del complejo anticuerpo-antígeno de interés, pueden formar derivados en los pozos de la placa, y el anticuerpo o antígeno no unido atrapado en los pozos por conjugación de anticuerpos. Los métodos para detectar dichos complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST incluyen la inmunodetección de complejos que usan dichos otros anticuerpos reactivos con el anticuerpo o antígeno.

La divulgación se refiere además a nuevos agentes identificados por cualquiera de los ensayos de cribado antes mencionados y a los usos de los mismos para los tratamientos como se describe en el presente documento.

5 Ensayos de diagnóstico

Los anticuerpos de la presente invención se pueden detectar mediante ensayos apropiados, por ejemplo, tipos convencionales de inmunoensayos. Por ejemplo, se puede realizar un ensayo en el que una proteína de la influenza (por ejemplo, HA1, HA2 o neuraminidasa) o un fragmento de la misma se fija a una fase sólida. La incubación se mantiene durante un período de tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo en la muestra se una al polipéptido inmovilizado en la fase sólida. Después de esta primera incubación, la fase sólida se separa de la muestra. La fase sólida se lava para eliminar los materiales no unidos y las sustancias interferentes, como las proteínas no específicas que también pueden estar presentes en la muestra. La fase sólida que contiene el anticuerpo de interés unido al polipéptido inmovilizado se incuba posteriormente con un segundo anticuerpo marcado o anticuerpo unido a un agente de acoplamiento tal como biotina o avidina. Este segundo anticuerpo puede ser otro anticuerpo antiinfluenza u otro anticuerpo. Las etiquetas para anticuerpos son bien conocidas en la técnica e incluyen radionucleidos, enzimas (por ejemplo, maleato deshidrogenasa, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, catalasa), fluoruros (isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficocianina, fluorescamina), biotina y similares. Los anticuerpos marcados se incuban con el sólido y se mide la etiqueta unida a la fase sólida. Estos y otros inmunoensayos se pueden realizar fácilmente por los expertos en la técnica.

Un método de ejemplo para detectar la presencia o ausencia de un virus de la influenza (en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto de prueba y poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo monoclonal o scFv marcado de acuerdo con la invención de tal manera que la presencia del virus de la influenza se detecta en la muestra biológica.

Como se usa en el presente documento, el término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende abarcar la marcación directa de la sonda o anticuerpo acoplado (es decir, uniendo físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como la marcación indirecta de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está directamente marcado. Los ejemplos de marcación indirecta incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado en forma fluorescente y la marcación final de una sonda de ADN con biotina de manera que se pueda detectar con estreptavidina marcada de forma fluorescente. El término "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. Es decir, el método de detección de la invención puede usarse para detectar un virus de influenza en una muestra biológica *in vitro*, así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de un virus de la influenza incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de un virus de la influenza incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo contra el virus de la influenza marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radioactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto pueden detectarse mediante técnicas estándar de imagenología.

En una realización, la muestra biológica contiene moléculas de proteína del sujeto de prueba. Una muestra biológica preferida es una muestra de leucocitos de sangre periférica aislada por medios convencionales de un sujeto.

La descripción también abarca kits para detectar la presencia de un virus de influenza en una muestra biológica. Por ejemplo, el kit puede comprender: un compuesto o agente marcado capaz de detectar un virus de la influenza (por ejemplo, un scFv antiinfluenza o anticuerpo monoclonal) en una muestra biológica; medios para determinar la cantidad de un virus de influenza en la muestra; y medios para comparar la cantidad de un virus de influenza en la muestra con un estándar. El compuesto o agente se puede envasar en un recipiente adecuado. El kit puede comprender instrucciones para usar el kit para detectar un virus de influenza en una muestra.

50 Inmunización pasiva

La inmunización pasiva ha demostrado ser una estrategia eficaz y segura para la prevención y el tratamiento de enfermedades virales. (Véase Keller et al., Clin. Microbiol. Rev. 13: 602-14 (2000); Casadevall, Nat. Biotechnol. 20: 114 (2002); Shibata et al., Nat. Med. 5: 204-10 (1999) e Igarashi et al., Nat. Med. 5: 211-16 (1999)). La inmunización pasiva utilizando anticuerpos monoclonales humanos neutralizantes podría proporcionar una estrategia de tratamiento inmediato para la profilaxis de emergencia y el tratamiento de la influenza, tal como la influenza aviar, mientras se pone en marcha el desarrollo alternativo y más lento de vacunas y nuevos fármacos.

Las vacunas con subunidades ofrecen potencialmente ventajas significativas sobre los inmunógenos convencionales. Evitan los riesgos de seguridad inherentes a la producción, distribución y suministro de vacunas de patógenos enteros muertos o atenuados convencionales. Además, pueden diseñarse racionalmente para incluir solo epítopos protectores confirmados, evitando así epítopos T supresores (véase Steward et al., J. Virol. 69: 7668 (1995)) o epítopos B inmunodominantes que subvierten el sistema inmune induciendo inutilidad, respuestas no protectoras (por ejemplo, epítopos "señuelo"). (Véase Garrity et al., J. Immunol. 159: 279 (1997)).

Además, los expertos en la técnica reconocerán que existe una buena correlación entre la actividad de neutralización de

anticuerpos *in vitro* y la protección *in vivo* para muchos virus diferentes, rutas de exposición y modelos animales. (Véase Burton, Natl. Rev. Immunol., 2: 706-13 (2002); Parren et al., Adv. Immunol., 77: 195-262 (2001)). Los datos presentados en este documento demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 y H98 se pueden desarrollar y probar además en estudios en animales *in vivo* para determinar su utilidad clínica como un potente inhibidor de la entrada viral para la profilaxis de emergencia y el tratamiento de la influenza.

Quimeras antígeno-Ig en vacunación

Ha pasado más de una década desde que los primeros anticuerpos se usaron como estructuras para la presentación eficiente de determinantes antigénicos a los sistemas inmunes. (Véase Zanetti, Nature 355: 476-77 (1992); Zaghouani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 631-35 (1995)). Cuando se incluye un péptido como parte integral de una molécula de IgG (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal IgA1 11A o 256 descrito en este documento), la antigenicidad y la inmunogenicidad de los epítomos peptídicos se potencian mucho en comparación con el péptido libre. Dicha mejora posiblemente se deba a la semivida mayor de quimeras antígeno-IgG, una mejor presentación y una conformación restringida, que imitan sus estructuras nativas.

Además, una ventaja añadida del uso de una quimera antígeno-Ig es que la región Fc o variable de la quimera antígeno-Ig puede usarse para dirigirse a células presentadoras de antígeno profesionales (APC). Hasta la fecha, se han generado Ig recombinantes en las que las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del gen variable de la cadena pesada (V_H) se reemplazan por diversos péptidos antigénicos reconocidos por las células B o T. Tales quimeras de antígeno-Ig se han usado para inducir respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares. (Véase Bona et al., Immunol. Today 19: 126-33 (1998)).

Se han usado quimeras con epítomos específicos injertados en el bucle de CDR3 para inducir respuestas humorales al bucle V3 de gp120 de VIH-1 o al primer dominio extracelular (D1) del receptor de CD4 humano. (Véase Lanza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11683-87 (1993); Zaghouani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 631-35 (1995)). Los sueros inmunes fueron capaces de prevenir la infección de células CD4 SupT1 por HIV-1MN (anti-gp120 V3C) o inhibir la formación de sincitios (anti-CD4-D1). El CDR2 y CDR3 pueden reemplazarse con epítomos peptídicos simultáneamente, y la longitud del péptido insertado puede ser de hasta 19 aminoácidos de longitud.

Alternativamente, un grupo ha desarrollado una estrategia de "cuerpo de Troya" en la que los antígenos peptídicos se presentan en los bucles de la región constante de Ig (C) y la región variable de la quimera se puede usar para dirigir IgD en la superficie de células B o moléculas MHC de clase II en APC profesionales que incluyen células B, células dendríticas (DC) y macrófagos. (Véase Lunde et al., Biochem. Soc. Trans. 30: 500-6 (2002)).

También se puede preparar una quimera de antígeno-Ig fusionando directamente el antígeno con la porción Fc de una molécula de IgG. You et al., Cancer Res. 61: 3704-11 (2001) pudieron obtener todos los brazos de respuesta inmune específica, incluyendo niveles muy altos de anticuerpos contra el antígeno central del virus de la hepatitis B usando este método.

Vacuna de ADN

Las vacunas de ADN son estables, pueden proporcionarle al antígeno la oportunidad de procesarse naturalmente y pueden inducir una respuesta más duradera. Aunque es una estrategia de inmunización muy atractiva, las vacunas de ADN a menudo tienen una potencia muy limitada para inducir respuestas inmunes. La absorción deficiente de ADN inyectado por APC profesionales, como las células dendríticas (DC), puede ser la causa principal de dicha limitación. Combinado con las vacunas quimera de antígeno-Ig, se ha reportado una nueva estrategia prometedora de vacuna de ADN basada en el mejoramiento de la presentación del antígeno APC (véase Casares, et al., Viral Immunol., 10: 129-36 (1997); Gerloni et al., Nat. Biotech., 15: 876-81 (1997); Gerloni et al., DNA Cell Biol. 16: 611-25 (1997); You et al., Cancer Res. 61: 3704-11 (2001)), que aprovecha la presencia de receptores de Fc (FcγR) en la superficie de las DC.

Es posible generar una vacuna de ADN que codifica una quimera de antígeno (Ag)-Ig. Tras la inmunización, las proteínas de fusión Ag-Ig serán expresadas y secretadas por las células que absorben las moléculas de ADN. Las proteínas de fusión Ag-Ig secretadas, al tiempo que inducen respuestas de células B, pueden captarse e internalizarse mediante la interacción del fragmento Fc con FcγR en la superficie de DC, lo que promoverá la presentación eficiente del antígeno y mejorará enormemente la respuesta inmune específica del antígeno. Aplicando el mismo principio, el ADN que codifica quimeras de antígeno-Ig que portan un gen de la región scFv específico anti-MHC II también puede dirigir los inmunógenos a los tres tipos de APC. Las respuestas inmunes podrían reforzarse adicionalmente con el uso de los mismos antígenos proteicos generados *in vitro* (es decir, "cebado y refuerzo"), si fuera necesario. Usando esta estrategia, se lograron respuestas inmunes celulares y humorales específicas contra la infección del virus de la influenza a través de la inyección intramuscular (i.m.) de una vacuna de ADN. (Véase Casares et al., Viral Immunol., 10: 129-36 (1997)).

Composiciones de vacunas

Se proporcionan aquí composiciones terapéuticas o profilácticas, que generalmente comprenden mezclas de uno o más

anticuerpos monoclonales o ScFvs y combinaciones de los mismos. Las vacunas profilácticas se pueden usar para prevenir una infección por el virus de la influenza y las vacunas terapéuticas se pueden usar para tratar a las personas después de una infección por el virus de la influenza. Los usos profilácticos incluyen la provisión de título aumentado de anticuerpos contra un virus de influenza en un sujeto de vacunación. De esta manera, los sujetos con alto riesgo de contraer la influenza pueden recibir inmunidad pasiva a un virus de influenza.

Estas composiciones de vacuna pueden administrarse junto con agentes inmunorreguladores auxiliares. Por ejemplo, citoquinas, linfoquinas y quimioquinas, que incluyen, pero no se limitan a, IL-2, IL-2 modificada (Cys125 → Ser125), GM-CSF, IL-12, interferón γ , IP-10, MIP1 β , y RANTES.

Métodos de inmunización

Las vacunas de la presente divulgación tienen propiedades inmunoprotectoras e inmunoterapéuticas superiores a otras vacunas antivirales.

La descripción proporciona un método de inmunización, por ejemplo, inducir una respuesta inmune, de un sujeto. Un sujeto se inmuniza mediante administración al sujeto de una composición que contiene una proteína de fusión de membrana de un virus encapsulado patógeno. La proteína de fusión está recubierta o incrustada en una matriz biológicamente compatible.

La proteína de fusión está glicosilada, por ejemplo, contiene una fracción de carbohidrato. La fracción de carbohidrato puede estar en forma de un monosacárido, disacárido(s), oligosacárido(s), polisacárido(s), o sus derivados (por ejemplo, sustituido con azufre o fósforo). El carbohidrato es lineal o ramificado. La fracción de carbohidrato está unida a N o unida a O de un polipéptido. La glicosilación unida a N es con el nitrógeno de la amida de las cadenas laterales de asparagina y la glicosilación unida a O es con el oxígeno del hidroxilo de las cadenas laterales de serina y treonina.

La fracción de carbohidrato es endógena al sujeto que va a ser vacunado. Alternativamente, la fracción de carbohidrato es exógena al sujeto que se va a vacunar. La fracción de carbohidrato son fracciones de carbohidrato que no se expresan típicamente en los polipéptidos del sujeto que se va a vacunar. Por ejemplo, las fracciones de carbohidratos son carbohidratos específicos de plantas. Las fracciones de carbohidrato específicas de la planta incluyen, por ejemplo, glucano unido a N que tiene una fucosa α 1,3 unida al núcleo o una xilosa β 1,2 unida al núcleo. Alternativamente, la fracción de carbohidrato son fracciones de carbohidrato que se expresan en polipéptidos o lípidos del sujeto que se va a vacunar. Por ejemplo, muchas células huésped han sido genéticamente modificadas para producir proteínas humanas con uniones de azúcar similares a las humanas.

Por ejemplo, la proteína de fusión es una proteína de hemaglutinina trimérica. Opcionalmente, la proteína de hemaglutinina se produce en una célula no de mamífero tal como una célula vegetal. El sujeto está en riesgo de desarrollar o sufrir una infección viral. Los virus encapsulados incluyen, por ejemplo, virus de Epstein-Barr, virus del herpes simple, tipo 1 y 2, citomegalovirus humano, virus del herpes humano, tipo 8, virus de varicela zóster, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la influenza, virus del sarampión, virus de parotiditis, virus de parainfluenza, virus sincitial respiratorio, virus de la rabia y virus de la rubéola. Los métodos descritos en este documento conducen a una reducción en la gravedad o el alivio de uno o más síntomas de una infección viral. Las infecciones se diagnostican y/o se controlan, típicamente por un médico usando metodologías estándar. Un sujeto que requiere inmunización se identifica por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los sujetos se inmunizan como se describe en la Recomendación general sobre inmunización de los CDC (51 (RR02) pp1-36). El cáncer se diagnostica, por ejemplo, mediante examen físico, biopsia, análisis de sangre o radiografía.

El sujeto es, por ejemplo, cualquier mamífero, por ejemplo, un ser humano, un primate, un ratón, una rata, un perro, un gato, una vaca, un caballo, un cerdo, un pez o un ave. El tratamiento se administra antes del diagnóstico de la infección. Alternativamente, el tratamiento se administra después del diagnóstico.

La eficacia del tratamiento se determina en asociación con cualquier método conocido para diagnosticar o tratar el trastorno o infección particular. El alivio de uno o más síntomas del trastorno indica que el compuesto confiere un beneficio clínico.

Evaluación de fragmentos de proteína antigénica (APF) para el potencial de la vacuna

Un candidato a vacuna que se dirige a la inmunidad humoral debe cumplir al menos tres criterios para tener éxito: debe provocar una fuerte respuesta de anticuerpos ("inmunogenicidad"); una fracción significativa de los anticuerpos que provoca debe reaccionar de forma cruzada con el patógeno ("aptitud inmunogénica"); y los anticuerpos que provoca deben ser protectores. Si bien la inmunogenicidad a menudo puede mejorarse usando adyuvantes o vehículos, la aptitud inmunogénica y la capacidad de inducir protección (como se evidencia por la neutralización) son propiedades intrínsecas de un antígeno que finalmente determinará el éxito de ese antígeno como componente de la vacuna.

Evaluación de aptitud inmunogénica

La "aptitud inmunogénica" se define como la fracción de anticuerpos inducida por un antígeno que reacciona de forma cruzada con el patógeno. (Véase Matthews et al., J. Immunol. 169: 837 (2002)). Es distinto de la inmunogenicidad, que se mide por el título de todos los anticuerpos inducidos por un antígeno, incluidos los anticuerpos que no reaccionan de forma cruzada con el patógeno. Una aptitud inmunogénica inadecuada probablemente haya contribuido a la decepcionante trayectoria de las vacunas de péptidos hasta la fecha. Los péptidos que se unen con alta afinidad a los anticuerpos y provocan altos títulos de anticuerpos con frecuencia carecen de una aptitud inmunogénica adecuada y, por lo tanto, fallan como posibles componentes de la vacuna. Por lo tanto, es importante incluir la aptitud inmunogénica como uno de los criterios para seleccionar candidatos a vacunas contra la influenza.

Una explicación común para una aptitud inmunogénica pobre es la flexibilidad conformacional de la mayoría de los péptidos cortos. Específicamente, un péptido flexible se puede unir bien a los anticuerpos de pacientes y provocar títulos de anticuerpos sustanciales en sujetos sin tratamiento previo. Sin embargo, si el péptido tiene un gran repertorio de conformaciones, una preponderancia de los anticuerpos que induce en sujetos sin tratamiento previo puede no reaccionar de forma cruzada con el epítipo nativo correspondiente en el patógeno intacto.

Al igual que los péptidos cortos, algunos APF pueden ser muy flexibles y, por lo tanto, pueden fallar como componentes de la vacuna. Los APF con más aptitud inmunogénica es probable que consistan en subdominios de proteínas auto plegables que están intrínsecamente restringidos fuera del contexto de la proteína completa.

Debido a que la aptitud inmunogénica es principalmente una propiedad del APF mismo, y no del sistema inmune que responde, la aptitud inmunogénica se puede evaluar en un modelo animal (por ejemplo, en ratones) aunque finalmente el APF tendrá que funcionar en humanos.

La aptitud inmunogénica lograda por los APF se evalúa mediante inmunosorción de sueros anti-APF con siembra purificada o proteína de membrana, en un procedimiento análogo al descrito en Matthews et al., J. Immunol. 169: 837 (2002). La IgG se purifica a partir de sueros recogidos de ratones que han sido inmunizados. Las proteínas purificadas, biotiniladas (según sea apropiado, dependiendo del APF particular con el que se inmunizaron los ratones) se mezclan con la IgG de ratón y se incuban. Perlas de sefarosa recubiertas con estreptavidina se añaden en cantidad suficiente para capturar toda la proteína biotinilada, junto con cualquier IgG unida. Las perlas recubiertas con estreptavidina se remueven por centrifugación a 13.000 rpm en una microcentrífuga, dejando la IgG que se ha agotado de anticuerpos dirigidos contra la proteína, respectivamente. Las inmunoabsorciones falsas se realizan en paralelo de la misma manera, excepto que la BSA biotinilada se sustituirá por la proteína de la influenza como un absorbente simulado.

Para medir la aptitud inmunogénica de los APF, los anticuerpos absorbidos y los anticuerpos de absorción simulada se titulan uno al lado del otro en ELISA contra el APF inmunizante. Para la afinidad de APF seleccionados de una NPL de presentación en fago, el antígeno para estos ELISA será proteínas de fusión APF-GST purificadas. Para los APF potencialmente glicosilados de la NPL de presentación en células de mamífero, el antígeno para estos ELISA será proteínas de fusión APF-Fc secretadas por células de mamífero y purificadas con proteína A. La disminución porcentual en el título anti-APF de anticuerpos absorbidos en comparación con los anticuerpos absorbidos en forma simulada proporcionarán una medida de la aptitud inmunogénica del APF.

Métodos de tratamiento

La divulgación proporciona métodos tanto profilácticos como terapéuticos para tratar a un sujeto en riesgo de (o susceptible a) una enfermedad o trastorno relacionado con el virus de la influenza. Tales enfermedades o trastornos incluyen, pero no están limitados a, por ejemplo, influenza aviar.

Métodos profilácticos

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para prevenir una enfermedad o trastorno relacionado con el virus de la influenza en un sujeto mediante la administración al sujeto de un anticuerpo monoclonal o anticuerpo scFv de la invención o un agente identificado de acuerdo con los métodos de la divulgación. Por ejemplo, el scFv y/o el anticuerpo monoclonal D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 y H98 pueden administrarse en cantidades terapéuticamente efectivas. Opcionalmente, dos o más anticuerpos antiinfluenza se administran conjuntamente.

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

El agente apropiado se puede determinar con base en los ensayos de selección descritos en este documento. Alternativamente, o además, el agente a administrar es un scFv o anticuerpo monoclonal que neutraliza un virus de influenza que se ha identificado de acuerdo con los métodos de la divulgación.

Métodos terapéuticos

Otro aspecto de la divulgación se refiere a métodos para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con el virus de la influenza en un paciente. En una realización, el método implica administrar un agente (por ejemplo, un agente identificado mediante un ensayo de selección descrito en este documento y/o un anticuerpo scFv o anticuerpo monoclonal identificado de acuerdo con los métodos de la divulgación), o una combinación de agentes que neutralizan la influenza a un paciente que padece la enfermedad o trastorno.

Métodos combinatorios

La divulgación permite tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la influenza, tal como la influenza aviar, en un paciente mediante la administración de dos o más anticuerpos, tales como D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, y H98 que se unen al mismo epítipo de la proteína HA.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: métodos generales

Expresión y preparación de diversos antígenos de barrido para la selección de la biblioteca de anticuerpos de presentación en fagos.

HA1. HA1 es el fragmento del terminal N (aa17-338) de (A/Tailandia/2(SP-33)/2004(H5N1)). El gen de codón optimizado y expresado como proteína de fusión con una etiqueta de 9 aminoácidos en el terminal C (C9-etiqueta: GTETSQVAPA). La proteína de fusión HA1-C9 se expresó en células 293T transitoriamente y la proteína secretada se purificó del sobrenadante por cromatografía de afinidad. La proteína A-Sefarosa acoplada covalentemente con anticuerpo anti-C9 1D4 (Centro Nacional de Cultivo Celular) se utilizó para la purificación de HA1-C9. HA0 trimérico. El ectodominio (HA0) del gen de hemaglutinina (HA) de A/Vietnam/1203/2004 se expresó en células de insecto como una proteína de fusión mediante la adaptación del protocolo descrito previamente³³. Esta construcción contiene una secuencia trimerizadora 'foldón' en el terminal C de la fibrina del bacteriófago T4 para estabilizar la estructura trimérica, seguido de un sitio de trombina y una etiqueta His6. El ADNc de la proteína de fusión se clonó en el vector de transferencia de baculovirus, pAcGP67A (BD Biosciences, Bedford, MA) para permitir la secreción eficiente de proteína recombinante. Se infectaron 9×10^6 células con la carga viral. Tres días después de la infección, las células se centrifugaron y el sobrenadante se incubó con 6 mL de perlas de Ni-NTA (Qiagen Inc., Valencia, CA). Las perlas se lavaron con regulador TBS (Tris.HCl 10 mM/NaCl 80 mM, pH 8,0) con imidazol 10 mM y se eluyeron con TBS con imidazol 250 mM. La proteína HA5 eluida se dializó contra un regulador TBS y se purificó adicionalmente mediante intercambio iónico usando una columna Mono Q HR10/10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los HA5 purificados fueron digeridos por trombina durante la noche. La integridad y la propiedad del trimero de HA0 se examinaron usando filtración en gel (columna Superdex 200) y SDS-PAGE.

Selección de bibliotecas de anticuerpos en fagos y selección de anticuerpos contra H5.

Se usaron dos bibliotecas de scFv humanas no inmunes (un total de $2,7 \times 10^{10}$ miembros) construidas a partir de células B de 57 donantes no inmunizados para la selección de scFv frente a HA1 purificado o HA0 trimérico. Se incubaron 5×10^{11} pfu de fagos-scFv preparados a partir de cada biblioteca con inmunotubos (Nunc, Naperville, IL) recubiertos con 10 µg de HA1 o HA0, por separado. Los procedimientos de selección fueron los mismos que se describieron anteriormente. Después de dos rondas de selección, los clones de scFv de fago único seleccionados al azar se cribaron para determinar la unión específica a HA1 o HA0 mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) como se describió previamente. Los clones que se unieron a HA1 o HA0 con valores de A_{450} de $> 1,0$ se calificaron como positivos, mientras que los clones negativos dieron valores de $< 0,1$. Para los clones de unión específicos de HA1 o HA0, los genes de las regiones variables de cadena pesada (VH) y ligera (VL) se secuenciaron y sus secuencias de aminoácidos correspondientes se alinearon para identificar anticuerpos con secuencia diferente para una caracterización adicional.

Expresión y purificación de scFv-Fc solubles e IgG1 humana de longitud completa.

Se produjeron fago-scFv de clones individuales para el ensayo de neutralización usando el mismo método que para la elaboración de la biblioteca de fagos. Las partículas de fago se concentraron 25 veces usando precipitación de PEG/NaCl. Se produjeron scFv-Fc e IgG1 humanas completas como se describió previamente. En resumen, los scFv seleccionados se convirtieron en scFv-Fc mediante subclonación del scFv en un vector de expresión de Fc pcADN 3.1-Bisagra que contiene los dominios de bisagra, CH2 y CH3 de IgG1 humana, pero carece de CH1. Para las IgG1 humanas completas, los fragmentos del gen de VH y VL de scFv se subclonaron por separado en la cadena ligera kappa de IgG1 humana o en el vector de expresión de la cadena ligera lambda TCAE5 o TCAE6. Los scFv-Fc o IgG1 se expresaron en células 293T o 293F (Invitrogen) mediante transfección transitoria y se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A sefarosa.

Análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR)

Se realizaron análisis cinéticos de la unión de Mab de Ha de H5 a trómero HA0 recombinante (VietNam1203/04) en un Biacore T100 (Biacore) a 25°C. El anticuerpo Fc de IgG antihumano (Biacore) se recubrió covalentemente en superficies de células de flujo individuales de un chip sensor CM4 mediante acoplamiento de amina usando el kit de acoplamiento de amina (Biacore). Los Mab de HA se capturaron en superficies de Fc de IgG antihumano a una velocidad de flujo de 10 µl/min en regulador HBS (Biacore) para asegurar que la unión de Mab-HA0 ocurriera como una interacción de Langmuir 1:1 homogénea. HA0 se inyectó sobre cada celda de flujo a la velocidad de flujo de 30 µl/min en regulador HBS, y a concentraciones que varían de 0,31 a 20 nM. Una inyección de regulador sirvió como control negativo. Todos los experimentos contenían una superficie de control de anticuerpo de Fc anti-IgG humano adicional que sirvió para explicar los cambios en el índice de refracción del regulador y para detectar posibles interacciones no específicas entre HA0 y Fc de IgG antihumana. Tras la finalización de cada ciclo de asociación y disociación, las superficies se regeneraron con solución de MgCl₂ 3M. Las tasas de asociación (*ka*), las constantes de velocidad de disociación (*kd*) y las constantes de afinidad (*KD*) se calcularon utilizando el software de evaluación Biacore T100. La bondad de cada ajuste se basó en el acuerdo entre los datos experimentales y los ajustes calculados, donde los valores de Chi² estaban por debajo de 1,0. Las densidades superficiales de Mab frente a HA0 se optimizaron para minimizar la transferencia de masa y evitar cualquier contribución de efectos de avidéz. Todos los *ka*, *kd*, *KD* reportados aquí representan las medias y los errores estándar de tres experimentos.

Virus y células

Los virus A/Vietnam/1203/2004 (H5N1; H5-VN04), A/Hong Kong/483/1997 (H5N1; H5-HK97), A/Países Bajos/219/2003 (H7N7; H7-NL03), y A/Ohio/4/1983 (H1N1; H1-OH83) de influenza de tipo silvestre, así como una cepa de vacuna adaptada al frío de A/Ann Arbor/6/1960 (H2N2) fueron obtenidos de la Red Mundial de Vigilancia de la Influenza de la OMS y provistos por Alexander Klimov (CDC, Atlanta, EE. UU.). Las células de riñón canino H1-PR34 y Madin-Darby (MDCK) se obtuvieron de la American Type Culture Collection y se propagaron en modificación de Dulbecco del medio de Eagle con suero bovino fetal al 10%. La infectividad viral se determinó mediante ensayo de placa en células MDCK. Los virus vivos H5N1 de tipo silvestre se manejaron en contención de bioseguridad de nivel 3, incluidas las mejoras requeridas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos y el programa de Agentes Selectos <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/bmb15toc.htm>.

Ensayo de neutralización con virus pseudotipificados con HA

Plásmidos y constructos

El gen de HA de longitud completa de A/Tailandia/2(SP-33)/2004 (H5N1), H5-SP33 y el gen de la neuramidasa de A/Vietnam 1203/2004, N1, se optimizaron con codones y se clonaron en el vector pcDNA3.1 para obtener el plásmido de expresión pcADN3.1-H5-SP33 y pcADN3.1-N1, por separado. El plásmido pCAGGS-H1(SC) que codifica la proteína HA de longitud completa de A/Carolina del Sur/1/1918 (H1N1) fue amablemente proporcionado por formalidad del Dr. P. Palese (Mount Sinai School of Medicine, EE. UU.). El plásmido pCAGGS-H1 (PR) que codifica la proteína HA de A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) fue un generosamente obsequiado por el Dr. M. Farzan (Harvard Medical School, EE. UU.).

Elaboración de los virus pseudotipificados con HA

Los virus informadores de luciferasa de VIH de una sola ronda de H5N1 o H1N1 pseudotipificados por H5-SP33, H1-SC/1918 o H1-PR/34 se elaboraron por cotransfección de células 293T con 4 plásmidos que son pcDNA3.1-H5-SP33, vector de empaquetamiento de VIH pCMVΔR 8.2 que codifica Gag-Pol⁵⁷ de VIH-1, vector de transferencia pHIV-Luc que codifica el gen informador de luciferasa de luciérnaga bajo control de LTR de VIH-1 y que expresa el plásmido pcDNA3.1-N1. Treinta y seis horas después de la transfección, los sobrenadantes virales se recogieron y almacenaron a 4°C.

Ensayo de neutralización

Antes de transducir las células, se incubó sobrenadante viral de H1-SC/1918 o virus seudotipado H1-PR/34F con 16 µg/mL de tripsina tratada con TPCK durante una hora a 25°C y luego se neutralizó con solución neutralizadora de tripsina (TNS, Cambrex) en la proporción de 1:1 (V/V). Los anticuerpos o sueros de prueba se incubaron con una cantidad adecuada de virus pseudotipificado H5-SP33 pseudotipificado H1 tratado con tripsina durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió después a células 293T en placas de 96 pozos y se continuó el cultivo durante 48 horas. El nivel de entrada viral se evaluó midiendo la actividad de la luciferasa en las células objetivo con un luminómetro de microplacas.

Mapeo de epítomos de los anticuerpos 8, 10 y 66

Plásmidos y construcciones. pcDNA3.1-H5-SP33, pCAGGS-H1(SC) y pCAGGS-H1(PR) se describieron como anteriormente. pCAGGS-H7 (FPV) que codifica proteínas HA para A/FPV/Rostock/34 (H7N1) fue proporcionado

amablemente por el Dr. X. Yang (Beth Israel Deaconess Medical Center). Todos los mutantes de pcDNA3.1-H5-SP33 o pCAGGS-H7 (FPV) se construyeron mediante el método QuikChange (Stratagene). Análisis de citometría de flujo de la unión de anticuerpos anti-H5 a células que expresan HA. Diversos mutantes de HA y HA de tipo silvestre de longitud completa que expresan plásmidos para H1, H5 o H7 se transfectaron transitoriamente en células 293T. 48 horas después de la transfección, se incubaron anticuerpos anti-H5 (10 µg/mL) con células 293T transfectadas a 4°C durante 1 hora. Después, las células se lavaron tres veces con PBS que contenía 0,5% de BSA y 0,1% de NaN₃. Para la detección de la unión de anticuerpos anti-H5 a células transfectadas con HA, se utilizó IgG de cabra antihumana marcada con FITC (Pierce) como anticuerpo secundario y se incubó con células a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron nuevamente como se indicó anteriormente y se analizaron usando un Becton Dickinson FACSCalibur con el software CellQuest.

Ensayo de microneutralización

El método se realizó como se describió previamente⁴⁸. Brevemente, se mezclaron 100 TCID₅₀ (dosis infecciosas medias de cultivo tisular) de virus en igual volumen con diluciones log₂ de solución madre de anticuerpos (1 mg/mL) en placas de cultivo tisular de 96 pozos, y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Indicador Se añadieron células MDCK indicadoras (1,5 x 10⁴ células/pozo) a las placas, seguido de incubación a 37°C durante 20 horas. Para establecer el punto final, las monocapas celulares se lavaron luego con PBS, se fijaron en acetona, y el antígeno viral se detectó mediante ELISA indirecto con un mAb contra influenza A NP (A-3, Accurate).

Ensayo de reducción de placa

Se incubaron virus A/Vietnam 1203/2004 (H5N1) o A/Holanda/219/03 (H7N7) (10.000 pfu) con scFv-Fc anti-H5 a tres concentraciones diferentes 100 µg/mL, 10 µg/mL y 1 µg/mL a 37°C durante 30 minutos. La mezcla de virus-anticuerpo se transfirió a monocapas de células MDCK en placas de 12 pozos y se incubó a 37°C durante 1 h y luego las células se lavaron y se recubrieron con agar. Después de 4 días de incubación, la capa de agar se descartó, y las placas se visualizaron mediante tinción con cristal violeta.

Prueba de inhibición de hemaglutinación (HI)

Los virus de la influenza aviar se unen preferentemente a los receptores de ácido siálico que contienen enlaces α2,3-galactosa (α2,3Gal) del ácido N-acetilneuramínico mientras que los virus humanos se unen preferentemente a los que contienen enlaces α2,6-galactosa (α2,6Gal) del ácido N-acetilneuramínico. Las bases moleculares para la especificidad del receptor probablemente están determinadas por un conjunto complejo de residuos en la HA viral. Las pruebas de inhibición de la hemaglutinación (HI) son un método simple y ampliamente utilizado para evaluar las respuestas de anticuerpos a la hemaglutinina de la influenza. Stephenson et al., informaron que al utilizar eritrocitos equinos y, por lo tanto, aumentar la proporción de enlaces α2,3Gal disponibles para la unión, se mejoró la sensibilidad del ensayo de hemaglutinación. Además, los títulos del ensayo de HI se correlacionaron bien con los títulos del ensayo de microneutralización. Los virus pseudotipificados se titulan primero usando hemaglutinación de eritrocitos de caballo como se describió. Se realizarán cribados iniciales de alto rendimiento usando suspensiones de eritrocitos de caballo y ensayando la capacidad de los anticuerpos del fago para inhibir el punto final de HI de los virus H5/N1 titulados. Se realizarán cribados secundarios más detallados para la inhibición de la entrada del virus informador H5N1 y HI usando estudios de respuesta a la dosis con proteínas de scFvFc solubles producidas por células 293T transfectadas transitoriamente y purificadas por perlas de proteína A.

Ensayo de inhibición de unión viral

Se incubaron 0,5x10⁶ células 293T con virus VIH seudotipados con H5-TH04 (~ 500 ng de p24) en presencia de mAb anti-H5, mAb de control o, en ausencia de anticuerpos, en un regulador de PBS que contiene 0,5 % de BSA y 0,02% de NaN₃ a 4°C. Después de una hora de incubación, se centrifugaron las células. Se recogieron los sobrenadantes y se analizaron los niveles de p24 utilizando el kit ELISA de captura p24^{CA} para VIH-1 (NCI, Frederick, NIH) para cuantificar los virus no unidos. Las células se lavaron luego una o dos veces y se lisaron para cuantificar el virus unido a la célula usando el mismo método.

Ensayo de inhibición de fusión celular

Se transfectaron células 293T, ~90% confluentes en placas de seis pozos, con plásmido pcADN3.1-H5-TH04 y pcADN 3.1-N1 en una relación de 4:1 (3 µg de ADN total/pozo) utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen). El medio de cultivo se complementó con 1 mL de mAb anti-H5, de control o de simulación a las 6 horas después de la transfección, y se cultivaron las células durante 36 horas. Se observaron células para la formación de sincitios con un microscopio de contraste de fase. Las fotomicrografías se tomaron con un aumento de 10x.

Expresión y preparación de diversas proteínas HA para barrido

HA1 es un fragmento del terminal N de HA de H5N1 A/Tailandia/2 (SP-33)/2004 (H5-TH04), residuos 11 a 325 (numeración H3). El gen era de codón optimizado y se expresó como proteína de fusión con una etiqueta de 9

aminoácidos en el terminal C (C9-etiqueta: GTETSQVAPA). La proteína de fusión HA1-C9 se expresó transitoriamente en células 293T y las proteínas secretadas en el sobrenadante se recogieron 48 horas después de la transfección y se purificaron del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad utilizando Proteína A Sefarosa acoplada covalentemente con anticuerpo anti-C9 1D4 (National Cell Culture Center) El método para producir la proteína HA0 de H5-VN04 es el mismo que se describe a continuación para la cristalización del complejo H5-F10 pero sin la coinfección por baculovirus para la escisión de furina.

ELISA

Se recubrieron 0,2 µg de proteínas HA de H5 puras en una placa de ELISA Maxisorb de 96 pozos (Nunc, NY) a razón de 2 µg/mL en PBS a 4°C durante la noche. La placa se lavó con PBS durante 3 veces para remover las proteínas no recubiertas. Para el ELISA regular, se usaron 1 µg/mL de scFv-Fc anti-H5 seguido por IgG1 de HRP-anti-humano para detectar la unión de scFv-Fc anti-H5 para proteínas HA de H5. Para el ELISA de competición, se mezclaron 50 µL (10¹² pfu) de fago-scFvs anti-H5 con 5 µg/mL de scFv-Fc anti-H5 y se aplicaron a la placa de ELISA recubierta con HA de H5-VN04. La competencia de scFv-Fc para la unión del fago-scFv a HA0 se determinó midiendo la unión restante del fago-scFv usando HRP-anti-M 13. La densidad óptica a 450 nm se midió después de incubación del sistema de sustrato de peroxidasa tetrametilbenzidina (TMB) (KPL, Gaithersburg MD).

Expresión, purificación y cristalización del complejo H5-F10

Se clonó el gen que codifica F10 de cadena sencilla (VH-enlazador-VL) (scFv) en el vector pSyn1 que contiene una señal de secreción periplásmica en el terminal N pelB, y una etiqueta de 6His en el terminal C. Se expresó scFv de F10 en células XL 10 en medio 2YT que contenía glucosa al 0,1% (p/v) a 25°C durante 15 horas con IPTG 0,5 mM. La proteína se purificó primero con Hisbind Ni-NTA (Novagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y luego con Superdex 200 (Amersham Biosciences) en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 M, pH 8.

El ectodominio del gen de HA de H5-VN04 se expresó en células de insecto como una proteína de fusión adaptando el protocolo descrito previamente⁶. Este constructo contiene una secuencia "foldón" de trimerización del terminal C de la fibrina del bacteriófago T4 para estabilizar la estructura trimérica, seguido de un sitio de trombina y una etiqueta His₆. El ADNc de la proteína de fusión se clonó en el vector de transferencia de baculovirus, pAcGP67A (BD Biosciences, Bedford, MA), para permitir la secreción eficaz de proteína recombinante. Para obtener HA completamente escindido (como trímeros de HA1-HA2), se coinfectaron células sf9 con reservas de baculovirus de HA0 y furina en una relación derivada empíricamente. El ADNc furina fue un obsequio del Dr. Robert Fuller (Universidad de Michigan). Tres días después de la infección, las células se centrifugaron y el sobrenadante se incubó con perlas de Ni-NTA (Qiagen Inc., Valencia, CA). Las perlas se lavaron con regulador TBS (Tris.HCl 10 mM, NaCl 80 mM, pH 8,0) con imidazol 10 mM, y se eluyeron con TBS con Imidazol 250 mM. La proteína H5 eluida se dializó frente a regulador TBS y se purificó adicionalmente mediante intercambio iónico usando la columna Mono Q HR10/10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). El H5 purificado se digirió mediante trombina durante la noche y se purificó adicionalmente mediante una columna Superdex 200 en regulador TBS.

Los complejos H5-F10 se formaron mezclando los dos componentes purificados, y se aislaron mediante Superdex 200 en regulador TBS. Las fracciones máximas se reunieron y se concentraron a ~11 mg/mL. La integridad del trímero H5 se examinó usando filtración en gel (columna Superdex 200) y SDS-PAGE. Los cristales crecieron por el método de difusión de vapor de gota colgante a 22°C. Se mezclaron 2 µL de H5 - F10 con un volumen igual de 12,5% de PEG 1K, 25% de etilenglicol, Tris 100 mM pH 8,5. Los cristales se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido antes de la recolección de datos.

Cocrystalización del complejo H5-F10

Para la cocrystalización del complejo H5-F10, F10 se expresó en *E. coli* y se purificó mediante Ni-NTA y filtración en gel. H5 se expresó mediante coinfección de H5 y reservas de furina de baculovirus en células sf9, y se purificó mediante Ni-NTA, intercambio iónico de aniones y cromatografía de filtración en gel. Se obtuvieron los complejos H5-F10 mezclando H5 con un exceso de F10 y se aislaron mediante filtración en gel. Los cristales se cultivaron mezclando 2 µL de complejo (~11 mg/mL) con un volumen igual de 12,5% de PEG 1K, 25% de etilenglicol, Tris 100 mM, pH 8,5 usando el método de difusión de vapor de gota colgante a 22°C. La estructura cristalina se determinó a una resolución de 3,2 Å por reemplazo molecular y se refinó a una R_{LIBRE} de 0,29 con una excelente geometría.

Recolección de datos, determinación de estructura y refinamiento

Se recogieron datos de difracción de rayos X en las líneas de haces 7,1 y 9,2 del Laboratorio de Radiación Sincrotrónica de Stanford (SSRL). Los datos se procesaron con XDS7 y el paquete HKL2000.

La estructura del complejo H5-F10 se determinó mediante reemplazo molecular con PHASER usando la estructura de H5 (A/Vietnam/1194/04; código PDB 2IBX) y la estructura de scFv de nAb 80R de SARS (código PDB 2GHW) como modelos de búsqueda. El modelo de homología de la estructura de scFv se compiló con WHATIF⁹. La unidad asimétrica contiene dos trímeros H5 y seis moléculas F10.

5 Las soluciones del reemplazo molecular se sometieron a varias rondas de refinamiento con el programa REFMAC5 con hibridación simulada en CNS y reconstrucción del modelo manual con Coot y Xtalview. El modelo final incluye los residuos 506/503/503/496/495/496 para 6 copias independientes de HA, respectivamente, 233 residuos para cada nAb10, 24 N-acetil-d-glucosamina y 6 β -d-manosa, 0 moléculas de agua. Los parámetros geométricos se evaluaron con PROCHECK y Rampage.

Protección de ratones con hMab contra H5

10 Todos los estudios en ratones se realizaron en instalaciones de animales de nivel de bioseguridad 3 (BSL3) acreditados por USDA y CDC de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de CDC. Se usaron ratones Balb/C hembra de 8-10 semanas de edad (5 por grupo) en todos los experimentos. Para todos los grupos, los ratones se observaron durante 2 semanas, se anotaron los pesos y las muertes diariamente.

15 Estudio profiláctico con ratón. Se administraron tres hMab (D8-IgG1, F10-IgG1 y A66-IgG1) o hMab de control 80R-IgG1 a 2 dosis de 10 mg/kg y 2,5 mg/kg⁵³ en ratones por vía intraperitoneal (i.p.). Veinticuatro horas después de la administración de hMab, todos los grupos de ratones fueron expuestos a A/Vietnam/1203/04 (H5N1) o A/HK/483/97 (H5N1) por vía intranasal (in) a una dosis de virus 10 MLD₅₀ (50% de dosis letal para el ratón) bajo anestesia ligera.

20 Estudio terapéutico de ratón. Los ratones se infectaron por primera vez en forma i.n. con 10 MLD₅₀ de A/Vietnam/1203/04 (H5N1) o A/HK/483/97 (H5N1). Tres hMab contra H5 o hMab de control a razón de 10 mg/kg fueron administrados en forma i.p. en ratones 24, 48 y 72 horas después de la infección con A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Para ratones infectados con A/HK/483/97 (H5N1), los hMab solo se inyectaron 24 horas después del desafío viral.

25 Identificación de anticuerpos anti-fago H5

30 Anticuerpos contra HA1. Se usó HA1 recombinante purificado para seleccionar anticuerpos de dos bibliotecas de scFv humanas no inmunes por separado. Después de dos rondas de selección en HA1, 58 de los 96 clones cribados por ELISA fueron clones positivos específicos de HA1. Se identificaron tres scFv anti-HA1 únicos (38B y 1C) por análisis de secuenciación de los 58 clones HA1 positivos. Se repitieron experimentos similares de selección y cribado; no se identificaron nuevos clones, pero se obtuvieron los mismos tres scFv como se describió anteriormente. La secuencia de aminoácidos de 2A se muestra en la Tabla 1B.

35 Anticuerpos contra el ectodominio de H5 (HA0). Se usó HA0 trimérico recombinante purificado para seleccionar las mismas bibliotecas de anticuerpos que las usadas para HA1. Después de dos rondas de selección en HA0, se cribó un total de 392 clones para la unión específica a HA0 mediante ELISA. 97 clones reconocieron la proteína HA0 específicamente. Diez únicos scFvs anti-HA0 (7, 8, 10, 17, 40, 66, 80, 88, 90 y 98) se identificaron por análisis de secuencia. Seis diferentes VH y 10 genes de VL diferentes se revelaron (algunos scFv comparten el mismo gen de VH). Cinco de las seis VH diferentes pertenecen a una familia de genes, IGHV1-69. Los genes de VL eran mucho más diversos que los genes de VH, tres de los 10 VL son de cadena Kappa. (Figura 3).

40 Establecimiento de un sistema confiable de virus informador de una ronda

45 Los virus informadores de luciferasa de VIH de una sola ronda de H5N1 o H1N1 pseudotipificados por H5-SP33, H1-SC/1918 o H1-PR/34 se elaboraron mediante cotransfección de células 293T con 4 plásmidos que son pcADN3.1-H5-SP33, vector de empaquetamiento de VIH pCMV Δ R 8.2 que codifica Gag-Pol de VIH-1, vector de transferencia pHIV-Luc que codifica el gen informador de luciferasa de luciérnaga bajo el control del LTR de VIH-1 y que expresa el plásmido pcADN3.1-N1. 36 horas después de la transfección, los sobrenadantes virales se recogieron y almacenaron a 4°C. El título de virus pseudotipificado con HA0 se midió infectando células 293T. La inclusión del plásmido que expresa N1 en la transfección de la elaboración de virus pseudotipificados puede aumentar drásticamente el título de virus pseudotipificados H5. Se examinó el comportamiento apropiado de los virus seudotipados H5 mediante el uso de suero inmune de hurón contra H5N1 (A/Vietnam/2004). Estos virus pueden ser neutralizados de forma potente por el antisuero, mientras que no por el suero de sangrado previo. Por lo tanto, se estableció un sistema de virus informador de alta eficiencia confiable de una sola ronda para el cribado eficiente de anticuerpos neutralizantes.

55 Ejemplo 2: Identificación de anticuerpos neutralizantes contra H5N1 usando virus pseudotipificado con H5-SP33 y ensayo de microneutralización. Resultados del ensayo de neutralización utilizando virus pseudotipificados.

60 Se produjeron scFvFc bivalentes de anticuerpos anti-H5 y se probaron para actividades de neutralización contra virus pseudotipificados con HA0. Se encontró que 2A es un anticuerpo neutralizante moderado, 38B y 1C son anticuerpos no neutralizantes (datos no mostrados). El anticuerpo 2A se ha usado como un reactivo anti-HA útil para otros ensayos (mapeo de epítomos) que se describen a continuación. Al usar el trímero HA0 como objetivo, se han identificado 10 nuevos anticuerpos únicos contra HA0. Estos Ab se cribaron para determinar la actividad de neutralización mediante el uso de un novedoso método de cribado de fago-scFvs de alto rendimiento que se ha establecido recientemente en el laboratorio. Brevemente, los fagos-scFv de clones individuales se usaron directamente en un ensayo de neutralización inmediatamente después de ser cribados por ELISA para clones positivos en placas de 96 pozos. En este esquema, la

actividad de neutralización se conocerá en 48 horas. Al hacer esto, se omiten los pasos de subclonación y expresión de Ab soluble que consumen mucho tiempo.

Como se muestra en la figura, los Ab neutralizantes que fueron indicados por los fagos-scFv resultaron ser potentes neutralizantes cuando se confirmaron con Ab scFvFc soluble. Todos los 10 anticuerpos cribados por fagos-scFv son potentes anticuerpos neutralizantes. También se convirtieron 3 de los 10 anticuerpos (D8, F10 y A66) en IgG1 humana de longitud completa, la actividad de neutralización potente se volvió a ver con los virus pseudotipificados H5-SP33. Los tres anticuerpos también neutralizaron de manera cruzada H1N1: tinción potencialmente neutralizada de H1-SC/1918 y cepa moderadamente neutralizada de H1-PR/34 (véanse las Figuras 4A-4C).

Resultados del ensayo de microneutralización. Como se muestra en las Figuras 4A-4C y 9B, los 10 anticuerpos anti-H5 exhibieron diferentes niveles de neutralización. F10-Fc, A66-Fc, E88-Fc y E90-Fc parecían ser los inhibidores más potentes, que neutralizan más del 95% del virus de 10,000 pfu a razón de 10 µg/mL y más del 50% a razón de 1 µg/mL. También se observó una reducción completa de placa cuando se usaron 100 pfu para estos cuatro anticuerpos a razón de 10 µg/mL o 1 µg/mL (datos no mostrados).

Se encontró que los 10 anticuerpos (scFv-Fc) neutralizaban pseudovirus H5 (partículas similares a virus con VIH-1 solo núcleos que muestran H5 en su superficie), en este caso del virus del clado 1, A/Tailandia/2-SP-33/2004 (H5N1) ("H5-TH04"). Los 10 anticuerpos también exhibieron niveles altos pero distintos de neutralización contra virus H5-VN04 (Clado 1) y A/Indonesia/5/2005 ("H5-IN05", Clado 2.1) en un ensayo de reducción de placa riguroso (Figura 9), sugiriendo que el epítipo o epítipos de neutralización se conservan en diferentes clados H5. Sin embargo, ninguno de los Ab neutralizó un virus del Grupo 2, la cepa HPAI H7N7, A/Los Países Bajos/219/03 (H7N7) (H7-NL03) (Figura 4A).

Los 10 nAb unidos a H5 trimérico y que compiten en forma cruzada entre sí (Figura 9) indican que reconocen un epítipo solapante. Con base en este hallazgo, así como la diversidad de secuencias de VH y la potencia de neutralización, se seleccionaron tres nAb (D8, F10 y A66) y se convirtieron en IgG1 humana de longitud completa. Las tres nAb IgG1 se unieron a H5 recombinante (H5-VN04) *in vitro* con alta afinidad ($K_d \sim 100\text{-}200$ pM) y velocidades de disociación muy lentas ($k_d \sim 10^{-4} \text{s}^{-1}$) (Figura 10).

Ejemplo 3: caracterización cinética de la unión de HA0 (el ectodominio de HA de A/Vietnam1203/04) a D8-IgG1, F10-IgG1 y A66-IgG1 mediante el uso de BIAcore T-100

Se capturaron Mab en un chip CM4 a través de IgG1 antihumana, y se inyectó HA0 trimérico a diversas concentraciones (20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 nM) sobre la superficie del chip. La cinética de unión se evaluó usando un modelo de unión Langmuir 1:1. Las curvas de unión registradas (restando el blanco de referencia) se muestran en negro y las curvas calculadas en rojo. Todos los k_a , k_d , KD representan la media y los errores estándar de tres experimentos. Usando Biacore T100 y el software de evaluación de Biacore T100, se determinó las velocidades cinéticas y las constantes de afinidad para los tres MAb anti-HA ajustado a un modelo de Langmuir 1:1. Como se muestra en la figura a continuación, se observaron k_a , k_d y KD similares de D8 y F10, y A66 tenía un KD 1,8 veces menor que 8 y 10 debido a la velocidad de disociación relativamente más rápida que los otros dos anticuerpos. Los complejos entre Mab y HA0 fueron estables como se ilustra mediante una velocidad de disociación muy lenta ($8,8 \pm 1,1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1} \sim 1,8 \pm 0,3 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$) y una unión de alta afinidad con el trímero H5 a nivel de pM. (Figuras 10A y 10B)

Ejemplo 4: efecto profiláctico y terapéutico de anticuerpos anti-H5

La eficacia protectora de nAb humano frente a la infección por el virus H5N1 y H1N1 se evaluó en un modelo de ratón BALB/c. Los ratones se trataron con diferentes dosis de nAb ya sea antes o después de la exposición viral letal.

Eficacia profiláctica (Figura 7a, b, g y h). Los ratones se trataron con nAb anti-H5 o mAb de control 24 horas antes de exposición letal por vía intranasal (i.n.) con 10 dosis letales medianas (MLD_{50}) de los H5N1 o H1N1. La inyección intraperitoneal (i.p.) de 10 mg/kg de cualquiera de los tres nAb proporcionó protección completa a los ratones expuestos a H5-VN04 (A/Vietnam/1203/04 (H5N1), Clado 1). Una dosis menor de anticuerpos (2,5 mg/kg) también fue altamente protectora (Figura 7a). Se observó protección profiláctica contra el virus H5-HK97 (A/HongKong/483/97 (H5N1), Clado 0) en 80-100% de los ratones tratados con 10 mg/kg de cualquiera de los tres nAb (Figura 7b). Cualquiera de los tres nAb (con 10 mg/kg de inyección única) proporcionó una protección completa de los ratones expuestos a virus H1-WSN33 (A/WSN/1933 (H1N1)) (Figura 7g). D8 y F10 protegieron completamente a los ratones expuestos a H1-PR34 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) cuando se les administró a razón de 10 mg/kg de inyección única. A66 proporcionó protección completa de ratones cuando se administraron 25 mg/kg de anticuerpo como una única inyección (Figura 7h). Eficacia terapéutica (Figura 7c-f). Los ratones se inocularon con H5-VN04 y se inyectaron con nAb a 24, 48, 72 hpi (Figura 7c, e y f) o con H5-HK97 a 24 hpi (Figura 7d). El tratamiento i.p. con 15 mg/kg (una dosis terapéuticamente alcanzable en humanos) de cualquiera de los 3 nAb a las 24 horas después de la inoculación (hpi) protegió al 80-100% de los ratones expuestos con 10 veces la MLD_{50} ya sea del virus H5-VN04 o H5-Virus HK97 (Figura 7c-d). Los ratones tratados con la misma dosis de nAb a 48 o 72 hpi con H5-VN04 mostraron niveles de protección similares o superiores (Figura 7 2e-f). Los ratones que sobrevivieron en todos los grupos de tratamiento con nAb anti-H5 se mantuvieron sanos y mostraron una pérdida de peso corporal mínima durante el período de observación de 2 semanas (datos no mostrados).

Ejemplo 5: Supresión del título viral en tejidos por anticuerpos anti-H5 en un estudio terapéutico con animales

El efecto antiviral de nAb utilizado terapéuticamente se investigó adicionalmente midiendo el título del virus 4 días después de la exposición ya sea en los pulmones, como un indicador de inhibición de la replicación local, o en el bazo y el cerebro, indicativo de la propagación sistémica que es característica de la infección con H5N1. Los nAb mediaban una supresión significativa de la replicación viral en los pulmones de ratones tratados con nAb H5 en comparación con los controles cuando se administraron dentro de las 48 horas de la exposición (Figura 12). Notablemente, dos de los nAb, D8 y F10, también mostraron un efecto antiviral cuando se administraron a 72 hpi. La diseminación del virus sistémico al cerebro fue baja en los animales de control, ocultando cualquier efecto del tratamiento con nAb. Sin embargo, el impacto de la terapia con nAb en la diseminación sistémica se demostró de manera espectacular por la supresión ≥ 1000 veces de la diseminación del virus al bazo incluso cuando los tres nAb se administraron en 72 hpi.

Ejemplo 6: mapeo inicial del epítipo del anticuerpo D8, F10 y A66.

Se transfectaron transitoriamente mutantes HA y HA de tipo silvestre de longitud completa que expresan plásmidos para H5-SP33 en células 293T. 48 horas después de la transfección, se incubaron anticuerpos anti-H5 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con células 293T transfectadas a 4°C durante 1 hora. Después, las células se lavaron tres veces con PBS que contenía 0,5% de BSA y 0,1% de NaN_3 . Para la detección de la unión de anticuerpos anti-H5 a células transfectadas con HA, se utilizó IgG de cabra antihumana marcada con FITC (Pierce) como anticuerpo secundario y se incubó con células a 4°C durante 30 minutos. El anticuerpo 2A se usó como un anticuerpo de control para indicar la expresión de cada mutante. Como se puede ver en la tabla a continuación, los epítipos para Mab D8, F10 y A66 son similares y están ubicados en posiciones de 307 en HA1 y 52, 59, 65, 93 en HA2. La posición de estos aminoácidos se destacó en la estructura cristalina de H5 (A/Vietnam/1203/04 (H5N1)).

Ejemplo 7: Unión y neutralización de virus del agrupamiento H1.

La neutralización cruzada del clado de virus H5N1 (Figura 4) motivó la prueba de la neutralización de otros subtipos de HA dentro del agrupamiento H1 del Grupo 1 (Figura 11). Los tres nAb unidos a las células que expresan H1 de longitud completa ((A/Carolina del Sur/1/1918 (H1N1)) ("H1-SC1918") y A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) ("H1-PR34"), H2 (A/Japón/305/57 (H2N2)) ("H2-JP57"), H6 (A/pollo/Nueva York/14677-13/1998 (H6N2)) (H6-NY98), pero no un subtipo del Grupo 2, H7 ((A/FPV/Rostock/34 (H7N1)) ("H7-FP34")) (Figura 4). También neutralizaron la infección por el virus pseudotipificado H1-SC1918 y H1-PR34 (Figura 4); y además, F10 neutralizó la infección por PR34 (H1N1), A/Ohio/83 (H1N1)) ("H1-OH83") y A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) (Figura 4). Estos resultados sugieren que estos nAb reconocen un epítipo en HA que no solo está altamente conservado entre los clados H5, sino que también está presente en los subtipos H1, H2 y H6, y potencialmente subtipos dentro de otros agrupamientos. Por lo tanto, se decidió investigar el mecanismo de neutralización del virus en detalle.

Ejemplo 8: nAb inhibe la fusión celular pero no la unión al virus.

Dos formas en las que Ab anti-HA pueden mediar en la neutralización están bloqueando la unión de HA a su receptor celular, y la inhibición de la fusión de la membrana huésped-virus al interferir con los cambios conformacionales de HA inducidos por pH bajo. Se encontró que los tres nAb no afectaban al virus que se unía a las células ni inhibían la hemaglutinación (unión y entrecruzamiento de los glóbulos rojos), mientras que un nAb anti-H5 de ratón, 17A2.1.2 y suero anti-H5N1 de hurón ambos inhibían la hemaglutinación, redujeron la unión hasta niveles basales.

Posteriormente, se probó la capacidad de los nAb para inhibir la fusión de membranas de células huésped usando un sistema modelo en el que se cotransfectaron células 293T a alta densidad con plásmidos que expresan H5 y N1 de H5-TH04. Las proteínas virales expresadas en la superficie provocan que las células se fusionen y formen sincitios, lo que ocurre espontáneamente dentro de las 36-48 horas posteriores a la transfección y se observaron 36 horas después, se observó la inhibición completa de la formación de sincitios en los 3 casos. En ausencia de nAb, las células expuestas brevemente (3-4 minutos) a un medio ácido (pH 5) 30 horas después de la transfección forman sincitios extensos. Los nAb (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) también bloquearon completamente la formación de sincitios bajo estas condiciones (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados indican que los tres nAb inhiben la fusión a la membrana que interfiere con la unión al receptor.

Ejemplo 9: Caracterización estructural del epítipo nAb

A continuación, se determinó el epítipo y el modo de unión de uno de los nAb, F10, resolviendo la estructura cristalina de su fragmento scFv en complejo con HA (H5-VN04) a una resolución de 3,2 Å, y mediante mutagénesis. (Fig. 6 y Tabla 4).

En el complejo, cada trímero H5 se une a tres moléculas de F10, en sitios relacionados con simetría, enterrando -1500 Å² de superficie de proteína por anticuerpo; la estructura de H5 en sí misma no se ve significativamente alterada por la unión de F10. HA se sintetiza como una cadena sencilla, HA0, que se activa por escisión proteolítica en dos subunidades, HA1 y HA2. La escisión conduce al entierro del "péptido de fusión" (que comprende los primeros ~ 21

residuos de HA2) en el vástago proximal a la membrana. La unión de F10 ocurre exclusivamente en esta región (Fig. 6), estableciendo contactos íntimos con el péptido de fusión, elementos de HA1 y HA2 (los cuales son parte integral de la estructura de esta región) que bloquean al péptido en su lugar en la conformación de pH neutro, así como la horquilla helicoidal grande de HA2 que experimenta un cambio de conformación masivo a pH ácido para propulsar el péptido de fusión desde su bolsillo viral de la membrana proximal a la superficie distal del virus, donde puede desencadenar la fusión con la membrana endosómica.

La cadena pesada de F10 juega el papel principal en la unión de H5, utilizando las puntas de sus tres regiones determinantes de complementariedad (CDR). Cada molécula F10 establece contactos con las subunidades HA1 y HA2 dentro de un solo monómero del trímero HA (Fig. 6). La región de contacto comprende un bolsillo formado por parte del péptido de fusión de HA2, con elementos de HA1 en un lado y una cara expuesta de hélice α A de HA2 en el otro (Figura 6). Una triada de residuos de anticuerpos - F55 y M54 de CDR H2, e Y102 de CDR H3 - forman puntos de contacto principales. El anillo de fenilo de F55 se extiende a través de una superficie plana formada por un bucle prominente del bucle peptídico de fusión (residuos de HA2 DGW 19₂-21₂ (esquema de numeración H3; los subíndices 1 y 2 se refieren a cadenas HA1 y HA2)) y las cadenas laterales aromáticas de dos histidinas flanqueantes (residuos 18₁ y 38₁) y un triptófano, W21₂, que forma la parte posterior del bolsillo. La cadena lateral de M54 también entra en contacto con los anillos aromáticos de W21₂ y H38₁, así como con la cadena lateral de I45₂ de la hélice α A, mientras que su cadena principal de carbonilo oxígeno hidrógeno se une con la cadena lateral de H38₁. Y102 inserta su cadena lateral en una grieta hidrófoba creada por cuatro cadenas laterales de la hélice α A, y también enlaces de hidrógeno con un carbonilo de cadena principal (D19₂) del péptido de fusión. El bucle H1 de CDR hace múltiples contactos con el extremo terminal C de la hélice α A y un bucle de HA1 en la base de la región de la cabeza (Figura 6).

En paralelo, los experimentos de mutagénesis se llevaron a cabo en la hélice α A para ayudar a definir el epítipo (Fig. 6). Las mutaciones en 3 residuos que entran directamente en contacto con el anticuerpo: V52A/E, N53A e I56A, redujeron significativamente o suprimieron la unión del anticuerpo, mientras que la mutación conservadora, V52L, no tuvo ningún efecto. Como controles, las mutaciones en una cara expuesta diferente de la hélice, que no entra en contacto con el anticuerpo, no tuvieron ningún efecto sobre la unión del anticuerpo. Por lo tanto, la mutagénesis de la hélice α A es completamente coherente con el epítipo definido cristalográficamente para F10. Además, los otros dos nAb, para los cuales no existen datos estructurales, mostraron un perfil de unión mutante-nAb casi idéntico, indicativo de un epítipo estrechamente coincidente y consistente con la unión competitiva (Figura 6, Figura 9). Tomados en conjunto, concluimos que los tres nAb neutralizan virus estabilizando la conformación de pH neutro de HA en una región que proporciona el desencadenante (la liberación más probable del péptido de fusión de su bolsillo) para cambios conformacionales que conducen al estado fusogénico.

Ejemplo 10: Base estructural de la neutralización de amplio espectro

La región de HA definida por el epítipo F10 está altamente conservada entre los 16 subtipos de HA (Fig. 6 y Tabla 5). El péptido de fusión debe adoptar una estructura bien definida, tanto en la conformación de pH neutro como durante el proceso de fusión de la membrana, y los estudios de mutagénesis han demostrado que se toleran pocos cambios de secuencia. La cara helicoidal expuesta de HA2 α A también es casi invariante en ambos grupos, presumiblemente porque debe reorganizarse para formar la superficie interna de la bobina enrollada trimérica larga en el estado fusogénico. Por lo tanto, la exigencia de que estos segmentos adopten dos estructuras muy diferentes en dos ambientes distintos presumiblemente imparte fuertes restricciones evolutivas en las secuencias, proporcionando una lógica clara para su conservación a través de los 16 subtipos de HA.

Las estructuras cristalinas se han determinado para los subtipos H1, H5 y H9 del Grupo 1 y H3 y H7 del Grupo 2, y las estructuras se dividen en dos clases distintas, coincidentes con los dos grupos definidos por análisis filogenético. Comparaciones adicionales muestran que las dos clases también se pueden distinguir fácilmente en el nivel tridimensional detallado dentro de la región definida por el epítipo F10. Las diferencias de secuencia en unos pocos aminoácidos clave incrustados en el núcleo que son característicos de cada clase (por ejemplo, en 17₁ y 111₂) conducen a diferencias consistentes en la orientación de varias cadenas laterales dentro del epítipo, así como a la disposición del bolsillo con respecto a la hélice α A.

Dentro de cada grupo/clase, la región epitópica está altamente conservada, con muy pocas diferencias en un agrupamiento dado, y solo unos pocos cambios, generalmente conservadores, entre agrupamientos (por ejemplo, en las posiciones 18₁ y 38₁, Figura 6D). Nuestra observación de que los 3 nAb pueden reconocer los 4 miembros del agrupamiento H1 demuestra que las diferencias de aminoácidos en la periferia del epítipo (como en el residuo 40₁, que es K, Q o V en este agrupamiento) pueden no ser críticas para la unión.

Los 10 anticuerpos que se han seleccionado tienen 5 conjuntos diferentes de CDR1-3 de VH, que varían sustancialmente en secuencia y longitud. Sin embargo, los tres residuos clave en CDR2 (M54, F55) y CDR3 (Y102) que se insertan en el bolsillo se conservan. La conservación de residuos clave dentro de un contexto variado de CDR puede expandir el intervalo de reconocimiento de subtipo/grupo de HA por este agrupamiento de nAb más allá de los analizados aquí. Sin embargo, debe observarse que 4 de 6 subtipos del Grupo 2 están glicosilados en la posición 38₁, que se encuentra en la periferia del epítipo F10. Los estudios de modelado predicen los enfrentamientos estéricos (pero solo con el bucle H1 de CDR), lo que probablemente contribuye a la falta observada de unión/neutralización de los

virus H7.

Ejemplo 11: nAb anti-H5 se unen a una amplia gama de subtipos de HA del Grupo 1

5 Los virus del Grupo 1 contienen 10 de los 16 subtipos totales del virus de influenza A, y se clasifican además en 3 "agrupamientos", H1a, H1b y H9. Probamos nuestros nAb para la unión a los siete subtipos de HA de los agrupamientos H1a y H1b, que incluyen el virus H5 aviar y los subtipos de influenza humana más comunes, con la excepción del subtipo del Grupo 2, H3. Además de H5, encontramos que las tres nAb IgG1 se unieron a las células que expresaban H1 de longitud completa de 2 cepas diferentes de H1N1, incluida la "influenza española" de 1918; H2 de H2N2; y H6 de H6N2; así como los subtipos del agrupamiento 1b: H11 de H11N9; H13 de H13N6; y H16 de H16N3. Sin embargo, ninguno de ellos se unió a un subtipo del Grupo 2, H7 de H7N1 (Fig. 13). Más detalles acerca de la Fig. 13 son los siguientes. Análisis FACS de nAb anti-H5 que se une a H1, H2, H5, H6 (agrupamiento H1a) y H11, H13 y H16 (agrupamiento H1b). Las células 293T se transfectaron transitoriamente con diferentes plásmidos que expresan HA. La unión de nAb a las células se analizó mediante FACS. El anticuerpo específico para H5 2A y 80R son controles negativos. También se muestra la falta de unión a un Grupo 2 HA, H7. Los detalles sobre las cepas virales son: H1-SC1918 (A/Carolina del Sur/1/1918 (H1N1)), H1-PR34 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)), H2-JP57 (A/Japón/305/57 (H2N2)), H5-TH04 (A/Tailandia/2-SP-33/2004 (H5N1)), H6-NY98 (A/Pollo/Nueva York/14677-13/1998 (H6N2)), H7-FP34 (A/FPV/Rostock/34 (H7N1)), H11-MP74 (A/Pato/Menfis/546/74 (H11N9)), H13-MD77 (A/Gaviota/MD/704/77 (H13N6)) y H16-DE06 (A/Ave del litoral/DE/172/06 (H16N3)).

20 Referencias

25 1. W.H.O. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/>. World Health Organization factsheet 211: influenza (2003).

2. Webster, R. G. 1918 Spanish influenza: the secrets remain elusive. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1164-6 (1999).

3. de Wit, E. & Fouchier, R. A. Emerging influenza. *J Clin Virol* 41, 1-6 (2008).

30 4. Wright, P., Neumann, G. & Kawakami, Y. en *Fields Virology* (eds. Knipe, D., Howley, P., Griffin, D., Lamb, R. & Martin, M.) 1692-1740 (Lippincott Williams & Wilkins 2006).

5. Fauci, A. S. Pandemic influenza threat and preparedness. *Emerg Infect Dis* 12, 73-7 (2006).

35 6. Fouchier, R. A. et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79, 2814-22 (2005).

7. Ha, Y., Stevens, D. J., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes. *Embo J* 21, 865-75 (2002).

40 8. Russell, R. J. et al. H1 and H7 influenza haemagglutinin structures extend a structural classification of haemagglutinin subtypes. *Virology* 325, 287-96 (2004).

9. W.H.O. (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/summaryH520070403.pdf, 2007).

45 10. W.H.O. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerg Infect Dis* 11, 1515-21 (2005).

11. Subbarao, K. et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279, 393-6 (1998).

50 12. de Jong, J. C., Claas, E. C., Osterhaus, A. D., Webster, R. G. & Lim, W. L. A pandemic warning? *Nature* 389, 554 (1997).

13. W.H.O. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/. (2008).

55 14. Nicholson, K. G. et al. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapur/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. *Lancet* 357, 1937-43 (2001).

60 15. Stephenson, I. et al. Cross-reactivity to highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses after vaccination with nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapur/97 (H5N3) vaccine: a potential priming strategy. *J Infect Dis* 191, 1210-5 (2005).

16. Stephenson, I. et al. Boosting immunity to influenza H5N1 with MF59-adjuvanted H5N3 A/Duck/Singapore/97 vaccine in a primed human population. *Vaccine* 21, 1687-93 (2003).

65 17. Treanor, J. J., Campbell, J. D., Zangwill, K. M., Rowe, T. & Wolff, M. Safety and immunogenicity of an inactivated

- subvirion influenza A (H5N1) vaccine. *N Engl J Med* 354, 1343-51 (2006).
- 5 18. Treanor, J. J. et al. Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans. *Vaccine* 19, 1732-7 (2001).
19. Bresson, J. L. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated split-virion influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine: phase I randomised trial. *Lancet* 367, 1657-64 (2006).
- 10 20. Lin, J. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1) vaccine: a phase I randomised controlled trial. *Lancet* 368, 991-7 (2006).
21. W.H.O. <http://www.who.int/csr/disease/influenza/influenzanetwork/en/index.html>. (2008).
- 15 22. Carrat, F. & Flahault, A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine* 25, 6852-62 (2007).
23. Cinatl, J., Jr., Michaelis, M. & Doerr, H. W. The threat of avian influenza A (H5N1). Part IV: Development of vaccines. *Med Microbiol Immunol* 196, 213-25 (2007).
- 20 24. Subbarao, K. & Luke, C. H5N1 viruses and vaccines. *PLoS Pathog* 3, e40 (2007).
- 25 25. Leroux-Roels, I. et al. Broad Clado 2 Cross-Reactive Immunity Induced by an Adjuvanted Clado 1 rH5N1 Pandemic Influenza Vaccine. *PLoS ONE* 3, e1665 (2008).
26. Baras, B. et al. Cross-Protection against Lethal H5N1 Challenge in Ferrets with an Adjuvanted Pandemic Influenza Vaccine. *PLoS ONE* 3, e1401 (2008).
27. Marasco, W. A. & Sui, J. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat Biotechnol* 25, 1421-34 (2007).
- 30 28. Stevens, J. et al. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312, 404-10 (2006).
29. Sui, J. et al. Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2536-41 (2004).
- 35 30. Huang, C. C. et al. Structural basis of tyrosine sulfation and VH-gene usage in antibodies that recognize the HIV type 1 coreceptor-binding site on gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2706-11 (2004).
- 40 31. Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69, 531-69 (2000).
32. Kida, H., Yoden, S., Kuwabara, M. & Yanagawa, R. Interference with a conformational change in the haemagglutinin molecule of influenza virus by antibodies as a possible neutralization mechanism. *Vaccine* 3, 219-22 (1985).
- 45 33. Vanlandschoot, P. et al. An antibody which binds to the membrane-proximal end of influenza virus haemagglutinin (H3 subtype) inhibits the low-pH-induced conformational change and cell-cell fusion but does not neutralize virus. *J Gen Virol* 79 (Pt 7), 1781-91 (1998).
- 50 34. Su, Y., Zhu, X., Wang, Y., Mu, M. & Tien, P. Evaluation of Glu11 and Gly8 of the H5N1 influenza hemagglutinin fusion peptide in membrane fusion using pseudotype virus and reverse genetics. *Acta Virol* 153, 247-257 (2008).
35. Yamada, S. et al. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 444, 378-82 (2006).
- 55 36. Stevens, J. et al. Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science* 303, 1866-70 (2004).
37. Daniels, R. S. et al. Fusion mutants of the influenza virus hemagglutinin glycoprotein. *Cell* 40, 431-9 (1985).
- 60 38. Thoennes, S. et al. Analysis of residues near the fusion peptide in the influenza hemagglutinin structure for roles in triggering membrane fusion. *Virology* 370, 403-14 (2008).
39. Earp, L. J., Delos, S. E., Park, H. E. & White, J. M. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 285, 25-66 (2005).
- 65 40. Godley, L. et al. Introduction of intersubunit disulfide bonds in the membrane-distal region of the influenza

hemagglutinin abolishes membrane fusion activity. *Cell* 68, 635-45 (1992).

- 5 41. Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 371, 37-43 (1994).
42. Ha, Y., Stevens, D. J., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11181-6 (2001).
- 10 43. Wilson, I. A., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 289, 366-73 (1981).
44. Kashyap, A. K. et al. Combinatorial antibody libraries from survivors of the Turkish H5N1 avian influenza outbreak reveal virus neutralization strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* Early edition (2008).
- 15 45. Huang, I. C. et al. Influenza A virus neuraminidase limits viral superinfection. *J Virol* (2008).
46. Glaser, L. et al. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity. *J Virol* 79, 11533-6 (2005).
- 20 47. Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D. & Verma, I. M. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11382-8 (1996).
- 25 48. Rowe, T. et al. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J Clin Microbiol* 37, 937-43 (1999).

Tabla 3. Residuos de contacto en la interfaz de H5-F10

| | FRH1 | CDRH1 | | | CDRH2 | | | CDRH3 | | | | | |
|-----|------|-----------|---------|-----|---------|---------|-----------------|-------|------|------|---------------------|---------|------|
| F10 | S25 | V27 | I28 | S30 | S31 | M54 | F55 | T57 | P100 | S101 | Y102 | I103 | S105 |
| HA1 | S291 | S291 M292 | | Q40 | | H38 | H18 H38 | | | | | | |
| HA2 | | I56 | V52 N53 | | I45 T49 | W21 145 | V18 D19 G20 W21 | V18 | Q42 | Q42 | D19 K38 T41 Q42 I45 | D19 K38 | K38 |

5

Los residuos de contacto se definen por tener una distancia interatómica de $<4.5 \text{ \AA}$. El subrayado, la *cursiva* y la **negrita** indican las contribuciones de los residuos individuales a la energía libre de enlace: muy favorable (doble subrayado (V27, T28, I45, D19, W21)), favorable (subrayado único (S25, S291, M292, I56, V52, N53, T49, H18, V18, G20, T57, T41)), insignificante (sin subrayado (S30, S31, Q40, H38)), desfavorable (*cursiva*), muy desfavorable (***cursiva en negrita***). De acuerdo con los cálculos de energía utilizando el servidor en <http://structure.pitt.edu/servers/fastcontact>¹.

Tabla 4. Estadísticas de recopilación y refinamiento de datos.

| | H5-F10 |
|--|--|
| Recolección de datos | |
| Parámetros de la celda | a = 205,3, b = 118,5, c = 338,9 $\beta = 99,6^\circ$ |
| Grupo espacial | C2 |
| Resolución (\AA)* | 3,2(3,28-3,20) |
| Reflexiones totales | 509.705 |
| Reflexiones únicas | 112.570 |
| Integridad (%)* | 85,0 (68,4) |
| I/ σ promedio (I)* | 9,5 (2,0) |
| R _{FUSIÓN} (%)* | 12,8 (81,0) |
| Redundancia * | 4,5 (4,5) |
| corte σ | -3 |
| Refinamiento | |
| Resolución | 50-3,2(3,28-3,20) |
| R _{TRABAJO} * | 0,23 (0,32) |
| R _{LIBRE} (5% de los datos) * | 0,29 (0,38) |
| Distancia de unión RMSD (\AA) | 0,01 |
| Ángulo de unión RMSD ($^\circ$) | 1,31 |
| Valor B promedio | 75,7 |
| Átomos de solvente | 0 |
| corte σ | Ninguno |
| Gráfico de Ramachandran | |
| Residuos en regiones favorecidas (%) | 90,0 |
| Residuos en regiones permitidas (%) | 9,5 |
| Residuos en regiones atípicas (%) | 0,5 |

* Los números entre paréntesis corresponden a la capa de resolución más alta

Tabla 5* Comparación de secuencias de subtipos HA entre 16 subtipos HA

| Grupo | Clúster | Subtipo | HA1 | | | | | | | | | | | | | | | | HA2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---------|---------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 | 426 | 427 | 428 | 429 | 430 | 431 | 432 | 433 | 434 | 435 | 436 | 437 | 438 | 439 | 440 | 441 | 442 | 443 | 444 | 445 | 446 | 447 | 448 | 449 | 450 | 451 | 452 | 453 | 454 | 455 | 456 | 457 | 458 | 459 | 460 | 461 | 462 | 463 | 464 | 465 | 466 | 467 | 468 | 469 | 470 | 471 | 472 | 473 | 474 | 475 | 476 | 477 | 478 | 479 | 480 | 481 | 482 | 483 | 484 | 485 | 486 | 487 | 488 | 489 | 490 | 491 | 492 | 493 | 494 | 495 | 496 | 497 | 498 | 499 | 500 | 501 | 502 | 503 | 504 | 505 | 506 | 507 | 508 | 509 | 510 | 511 | 512 | 513 | 514 | 515 | 516 | 517 | 518 | 519 | 520 | 521 | 522 | 523 | 524 | 525 | 526 | 527 | 528 | 529 | 530 | 531 | 532 | 533 | 534 | 535 | 536 | 537 | 538 | 539 | 540 | 541 | 542 | 543 | 544 | 545 | 546 | 547 | 548 | 549 | 550 | 551 | 552 | 553 | 554 | 555 | 556 | 557 | 558 | 559 | 560 | 561 | 562 | 563 | 564 | 565 | 566 | 567 | 568 | 569 | 570 | 571 | 572 | 573 | 574 | 575 | 576 | 577 | 578 | 579 | 580 | 581 | 582 | 583 | 584 | 585 | 586 | 587 | 588 | 589 | 590 | 591 | 592 | 593 | 594 | 595 | 596 | 597 | 598 | 599 | 600 | 601 | 602 | 603 | 604 | 605 | 606 | 607 | 608 | 609 | 610 | 611 | 612 | 613 | 614 | 615 | 616 | 617 | 618 | 619 | 620 | 621 | 622 | 623 | 624 | 625 | 626 | 627 | 628 | 629 | 630 | 631 | 632 | 633 | 634 | 635 | 636 | 637 | 638 | 639 | 640 | 641 | 642 | 643 | 644 | 645 | 646 | 647 | 648 | 649 | 650 | 651 | 652 | 653 | 654 | 655 | 656 | 657 | 658 | 659 | 660 | 661 | 662 | 663 | 664 | 665 | 666 | 667 | 668 | 669 | 670 | 671 | 672 | 673 | 674 | 675 | 676 | 677 | 678 | 679 | 680 | 681 | 682 | 683 | 684 | 685 | 686 | 687 | 688 | 689 | 690 | 691 | 692 | 693 | 694 | 695 | 696 | 697 | 698 | 699 | 700 | 701 | 702 | 703 | 704 | 705 | 706 | 707 | 708 | 709 | 710 | 711 | 712 | 713 | 714 | 715 | 716 | 717 | 718 | 719 | 720 | 721 | 722 | 723 | 724 | 725 | 726 | 727 | 728 | 729 | 730 | 731 | 732 | 733 | 734 | 735 | 736 | 737 | 738 | 739 | 740 | 741 | 742 | 743 | 744 | 745 | 746 | 747 | 748 | 749 | 750 | 751 | 752 | 753 | 754 | 755 | 756 | 757 | 758 | 759 | 760 | 761 | 762 | 763 | 764 | 765 | 766 | 767 | 768 | 769 | 770 | 771 | 772 | 773 | 774 | 775 | 776 | 777 | 778 | 779 | 780 | 781 | 782 | 783 | 784 | 785 | 786 | 787 | 788 | 789 | 790 | 791 | 792 | 793 | 794 | 795 | 796 | 797 | 798 | 799 | 800 | 801 | 802 | 803 | 804 | 805 | 806 | 807 | 808 | 809 | 810 | 811 | 812 | 813 | 814 | 815 | 816 | 817 | 818 | 819 | 820 | 821 | 822 | 823 | 824 | 825 | 826 | 827 | 828 | 829 | 830 | 831 | 832 | 833 | 834 | 835 | 836 | 837 | 838 | 839 | 840 | 841 | 842 | 843 | 844 | 845 | 846 | 847 | 848 | 849 | 850 | 851 | 852 | 853 | 854 | 855 | 856 | 857 | 858 | 859 | 860 | 861 | 862 | 863 | 864 | 865 | 866 | 867 | 868 | 869 | 870 | 871 | 872 | 873 | 874 | 875 | 876 | 877 | 878 | 879 | 880 | 881 | 882 | 883 | 884 | 885 | 886 | 887 | 888 | 889 | 890 | 891 | 892 | 893 | 894 | 895 | 896 | 897 | 898 | 899 | 900 | 901 | 902 | 903 | 904 | 905 | 906 | 907 | 908 | 909 | 910 | 911 | 912 | 913 | 914 | 915 | 916 | 917 | 918 | 919 | 920 | 921 | 922 | 923 | 924 | 925 | 926 | 927 | 928 | 929 | 930 | 931 | 932 | 933 | 934 | 935 | 936 | 937 | 938 | 939 | 940 | 941 | 942 | 943 | 944 | 945 | 946 | 947 | 948 | 949 | 950 | 951 | 952 | 953 | 954 | 955 | 956 | 957 | 958 | 959 | 960 | 961 | 962 | 963 | 964 | 965 | 966 | 967 | 968 | 969 | 970 | 971 | 972 | 973 | 974 | 975 | 976 | 977 | 978 | 979 | 980 | 981 | 982 | 983 | 984 | 985 | 986 | 987 | 988 | 989 | 990 | 991 | 992 | 993 | 994 | 995 | 996 | 997 | 998 | 999 | 1000 | 1001 | 1002 | 1003 | 1004 | 1005 | 1006 | 1007 | 1008 | 1009 | 1010 | 1011 | 1012 | 1013 | 1014 | 1015 | 1016 | 1017 | 1018 | 1019 | 1020 | 1021 | 1022 | 1023 | 1024 | 1025 | 1026 | 1027 | 1028 | 1029 | 1030 | 1031 | 1032 | 1033 | 1034 | 1035 | 1036 | 1037 | 1038 | 1039 | 1040 | 1041 | 1042 | 1043 | 1044 | 1045 | 1046 | 1047 | 1048 | 1049 | 1050 | 1051 | 1052 | 1053 | 1054 | 1055 | 1056 | 1057 | 1058 | 1059 | 1060 | 1061 | 1062 | 1063 | 1064 | 1065 | 1066 | 1067 | 1068 | 1069 | 1070 | 1071 | 1072 | 1073 | 1074 | 1075 | 1076 | 1077 | 1078 | 1079 | 1080 | 1081 | 1082 | 1083 | 1084 | 1085 | 1086 | 1087 | 1088 | 1089 | 1090 | 1091 | 1092 | 1093 | 1094 | 1095 | 1096 | 1097 | 1098 | 1099 | 1100 | 1101 | 1102 | 1103 | 1104 | 1105 | 1106 | 1107 | 1108 | 1109 | 1110 | 1111 | 1112 | 1113 | 1114 | 1115 | 1116 | 1117 | 1118 | 1119 | 1120 | 1121 | 1122 | 1123 | 1124 | 1125 | 1126 | 1127 | 1128 | 1129 | 1130 | 1131 | 1132 | 1133 | 1134 | 1135 | 1136 | 1137 | 1138 | 1139 | 1140 | 1141 | 1142 | 1143 | 1144 | 1145 | 1146 | 1147 | 1148 | 1149 | 1150 | 1151 | 1152 | 1153 | 1154 | 1155 | 1156 | 1157 | 1158 | 1159 | 1160 | 1161 | 1162 | 1163 | 1164 | 1165 | 1166 | 1167 | 1168 | 1169 | 1170 | 1171 | 1172 | 1173 | 1174 | 1175 | 1176 | 1177 | 1178 | 1179 | 1180 | 1181 | 1182 | 1183 | 1184 | 1185 | 1186 | 1187 | 1188 | 1189 | 1190 | 1191 | 1192 | 1193 | 1194 | 1195 | 1196 | 1197 | 1198 | 1199 | 1200 | 1201 | 1202 | 1203 | 1204 | 1205 | 1206 | 1207 | 1208 | 1209 | 1210 | 1211 | 1212 | 1213 | 1214 | 1215 | 1216 | 1217 | 1218 | 1219 | 1220 | 1221 | 1222 | 1223 | 1224 | 1225 | 1226 | 1227 | 1228 | 1229 | 1230 | 1231 | 1232 | 1233 | 1234 | 1235 | 1236 | 1237 | 1238 | 1239 | 1240 | 1241 | 1242 | 1243 | 1244 | 1245 | 1246 | 1247 | 1248 | 1249 | 1250 | 1251 | 1252 | 1253 | 1254 | 1255 | 1256 | 1257 | 1258 | 1259 | 1260 | 1261 | 1262 | 1263 | 1264 | 1265 | 1266 | 1267 | 1268 | 1269 | 1270 | 1271 | 1272 | 1273 | 1274 | 1275 | 1276 | 1277 | 1278 | 1279 | 1280 | 1281 | 1282 | 1283 | 1284 | 1285 | 1286 | 1287 | 1288 | 1289 | 1290 | 1291 | 1292 | 1293 | 1294 | 1295 | 1296 | 1297 | 1298 | 1299 | 1300 | 1301 | 1302 | 1303 | 1304 | 1305 | 1306 | 1307 | 1308 | 1309 | 1310 | 1311 | 1312 | 1313 | 1314 | 1315 | 1316 | 1317 | 1318 | 1319 | 1320 | 1321 | 1322 | 1323 | 1324 | 1325 | 1326 | 1327 | 1328 | 1329 | 1330 | 1331 | 1332 | 1333 | 1334 | 1335 | 1336 | 1337 | 1338 | 1339 | 1340 | 1341 | 1342 | 1343 | 1344 | 1345 | 1346 | 1347 | 1348 | 1349 | 1350 | 1351 | 1352 | 1353 | 1354 | 1355 | 1356 | 1357 | 1358 | 1359 | 1360 | 1361 | 1362 | 1363 | 1364 | 1365 | 1366 | 1367 | 1368 | 1369 | 1370 | 1371 | 1372 | 1373 | 1374 | 1375 | 1376 | 1377 | 1378 | 1379 | 1380 | 1381 | 1382 | 1383 | 1384 | 1385 | 1386 | 1387 | 1388 | 1389 | 1390 | 1391 | 1392 | 1393 | 1394 | 1395 | 1396 | 1397 | 1398 | 1399 | 1400 | 1401 | 1402 | 1403 | 1404 | 1405 | 1406 | 1407 | 1408 | 1409 | 1410 | 1411 | 1412 | 1413 | 1414 | 1415 | 1416 | 1417 | 1418 | 1419 | 1420 | 1421 | 1422 | 1423 | 1424 | 1425 | 1426 | 1427 | 1428 | 1429 | 1430 | 1431 | 1432 | 1433 | 1434 | 1435 | 1436 | 1437 | 1438 | 1439 | 1440 | 1441 | 1442 | 1443 | 1444 | 1445 | 1446 | 1447 | 1448 | 1449 | 1450 | 1451 | 1452 | 1453 | 1454 | 1455 | 1456 | 1457 | 1458 | 1459 | 1460 | 1461 | 1462 | 1463 | 1464 | 1465 | 1466 | 1467 | 1468 | 1469 | 1470 | 1471 | 1472 | 1473 | 1474 | 1475 | 1476 | 1477 | 1478 | 1479 | 1480 | 1481 | 1482 | 1483 | 1484 |

Otras realizaciones

Aunque se han descrito en detalle en la presente memoria realizaciones particulares, esto se ha realizado a modo de ejemplo solo con fines de ilustración, y no se pretende que sea limitativo con respecto al alcance de las reivindicaciones adjuntas, que siguen.

5

REIVINDICACIONES

5 1. Un anticuerpo monoclonal aislado o anticuerpo scFv, en el que dicho anticuerpo se une a un epítipo en la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de la influenza y neutraliza el virus de la influenza A, donde las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada consisten en

```
FR1      QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCTSS
CDR1     EVTFSSFA
FR2      ISWVRQAPGQGLEWLGG
CDR2     ISPMFGTP
FR3      NYAQKFQGRVTITADQSTRTAYMDLRSLRSEDTAVYYC
CDR3     ARSPSYICSGGTCVFDH
FR4      WGQGLTVTVSS
```

10 y las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera consisten en

```
FR1      QPGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGN
CDR1     SNNVGNQG
FR2      AAWLQQHQGHPPKLLSY
CDR2     RNN
FR3      DRPSGISERFSASRSGNTASLTITGLQPEDEADYYC
CDR3     STWDSSLSAVV
FR4      FGGGTKLTVL
```

15 2. Un anticuerpo monoclonal aislado o anticuerpo scFv, en el que dicho anticuerpo se une a un epítipo en la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de la influenza y neutraliza el virus de la influenza A, donde las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada consisten en

```
FR1      QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS
CDR1     GGTFSAYA
FR2      FTWVRQAPGQGLEWMGG
CDR2     IIGMFGTA
FR3      NYAQKFQGRVTITADELTSTAYMELSSLTSEDALYYC
CDR3     ARGLYYYESSFDY
FR4      WGQGLTVTVSS
```

20 y las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera consisten en

```
FR1      QSVLTQPPSASGSPGQSVTISCTGT
CDR1     SSDVGGYNS
FR2      VSWYQQHPGKAPKLMY
CDR2     EVT
FR3      KRPSGVPDRFSASKSGNTASLTVSGLQAEDEADYFC
CDR3     CSYAGHSAYV
FR4      FGTGTKVTVL
```

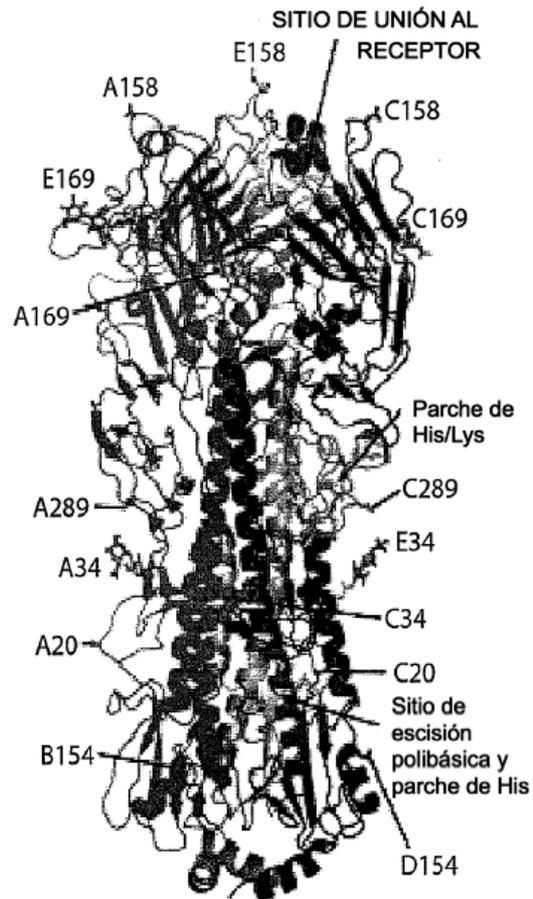
25 3. Un anticuerpo monoclonal aislado o anticuerpo scFv, en el que dicho anticuerpo se une a un epítipo en la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de la influenza y neutraliza el virus de la influenza A, donde las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada consisten en

```
FR1      QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS
CDR1     GGPFSMTA
FR2      FTWLRQAPGQGLEWMGG
CDR2     ISPIFRT
FR3      KYAQKFQGRVTITADESTNTANMELTSLKSEDTAVYYC
CDR3     ARTLSSYQPNDAFAI
FR4      WGQGMTVTVSS
```

30 y las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera consisten en

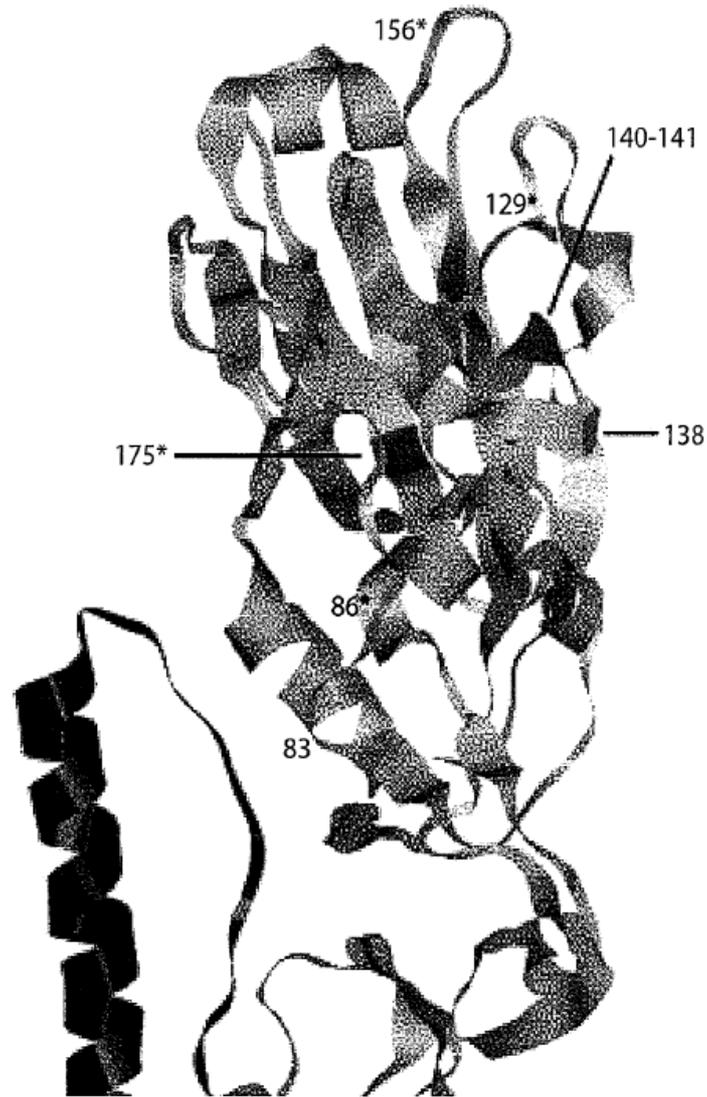
| | |
|------|--------------------------------------|
| FR1 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS |
| CDR1 | QSVSSY |
| FR2 | LAWYQQKPGQAPRLLIY |
| CDR2 | DAS |
| FR3 | NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFC |
| CDR3 | QQYGSSPQ |
| FR4 | FGQGTRLEIK |

4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que inhibe la fusión viral y de la membrana celular.
- 5 5. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se une a HA con una afinidad que varía de 1 pM a 200 mM, opcionalmente con una afinidad de 100 a 200 pM.
6. El anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un anticuerpo completamente humano.
- 10 7. Una composición que comprende el anticuerpo de cualquier reivindicación precedente y un vehículo.
8. El anticuerpo o la composición de cualquier reivindicación precedente, para uso en un método terapéutico o profiláctico.
- 15 9. El anticuerpo o la composición de la reivindicación 8, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno provocado por un virus de la influenza.
- 20 10. Uso del anticuerpo o composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno provocado por un virus de la influenza.
11. El anticuerpo o composición para el uso de la reivindicación 9 o el uso del anticuerpo o composición de la reivindicación 10, en donde el tratamiento comprende además la administración de:
- 25 a) un fármaco antiviral, en el que dicho antiviral es opcionalmente (i) un inhibidor de neuraminidasa, en donde dicho inhibidor de neuraminidasa es opcionalmente zanamivir o fosfato de oseltamivir; (ii) un inhibidor de HA; (iii) un inhibidor de ácido siálico; o (iv) un inhibidor del canal iónico M2, en donde dicho inhibidor del canal iónico M2 es opcionalmente amantadina o rimantadina;
- 30 b) un inhibidor de entrada viral; o
- c) un inhibidor de unión viral.
- 35 12. El anticuerpo o composición para el uso de la reivindicación 9 u 11 o el uso del anticuerpo o composición de las reivindicaciones 10 u 11, donde el tratamiento comprende la administración de dos o más anticuerpos específicos para un virus de influenza del Grupo I o comprende además la administración de un anticuerpo específico para un virus de influenza del Grupo II.
- 40 13. El anticuerpo o composición para el uso de la reivindicación 9, 11 o 12 o el uso del anticuerpo o composición de la reivindicación 10, 11 o 12, en donde el tratamiento comprende administrar el anticuerpo antes o después de la exposición al virus de la influenza.
- 45 14. El anticuerpo o composición para el uso de la reivindicación 9, 11, 12 o 13 o el uso del anticuerpo o composición de la reivindicación 10, 11, 12 o 13, en donde el tratamiento comprende administrar el anticuerpo en una dosis suficiente para neutralizar dicho virus de la influenza.
15. Un método para detectar la presencia de un virus de influenza en una muestra, comprendiendo el método:
- 50 a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, y
- b) detectar la presencia o ausencia de un complejo anticuerpo-antígeno, detectando de ese modo la presencia de un virus de influenza en una muestra.



Vista general de la estructura del trómero A/Vietnam 1203/04, sitio de unión del receptor y los sitios de variación antigénica están resaltados en el monómero (citado de Stevens, 2006).

Fig. 1A



Ubicación de los residuos de aminoácidos en la HA de virus de influenza H5N1 que están bajo selección positiva (citado de Smith, 2006).

Fig. 1B

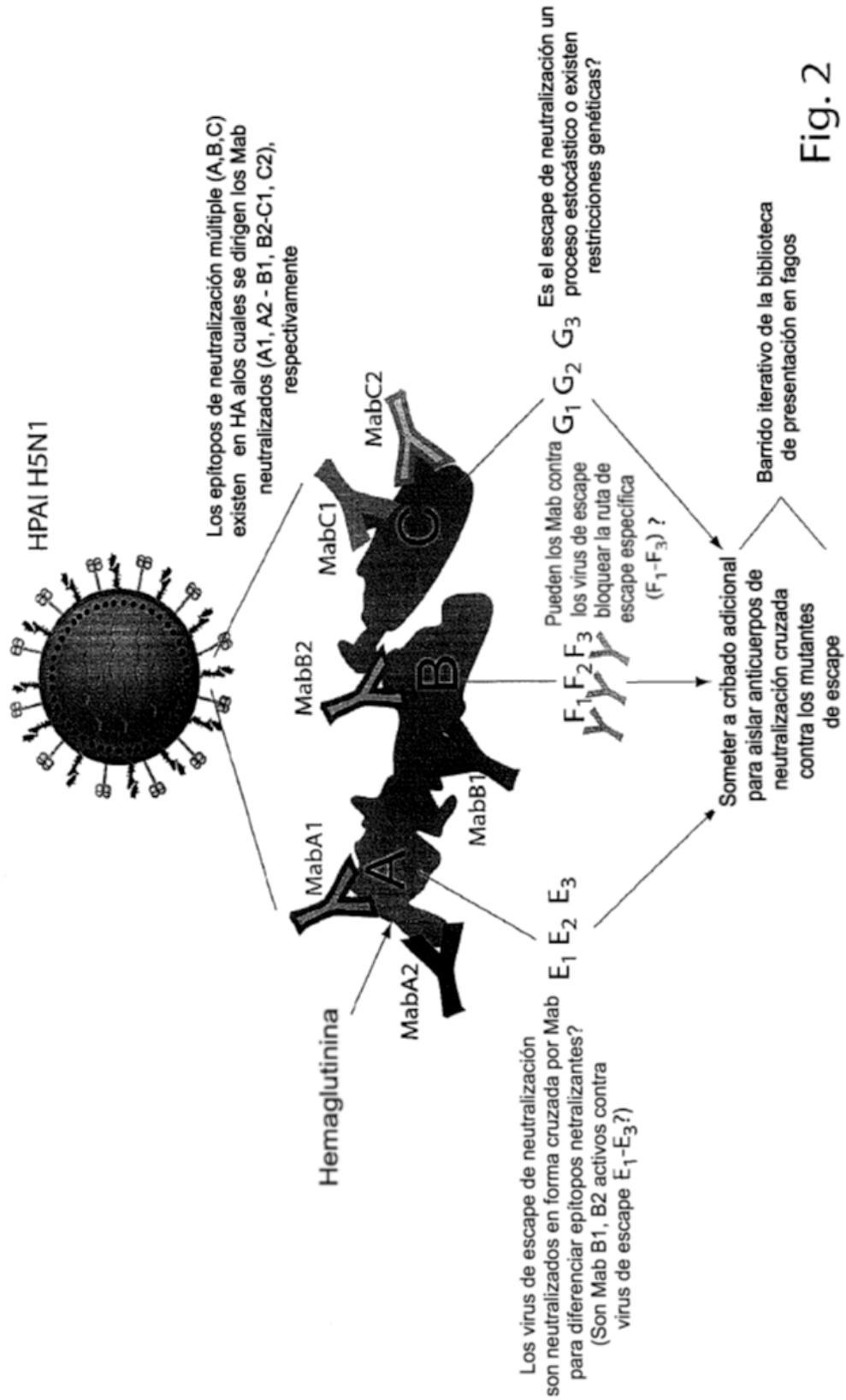


Fig. 2

Secuencias de aminoácidos de regiones variables de mAb anti-H5

| VH | FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | CDR3 | FR4 | Gen |
|---------|---------------|---------|---------------|---------|------------------------------------|-------|--------|------|
| Cons. | KRFGSSVIVCKAS | GEVSSZA | ISWYRQPGLEKGG | IIRVHNP | NYAKFGKRVITADSESTAYMELSSLESEDTAVTC | AR | WGQGTL | |
| IGRV | | | | | | | | 1-69 |
| F10/E90 | | | | | | | | 1-69 |
| D8/D80 | | | | | | | | 1-69 |
| A66/E88 | | | | | | | | 1-69 |
| G17 | | | | | | | | 1-69 |
| D7/H98 | | | | | | | | 1-69 |
| E40 | | | | | | | | 1-2 |

| VL | FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | CDR3 | FR4 | Gen |
|-------|-------------------------|---------|-----------------|---------------------|---------------------------------------|----------|-----------|---------|
| Cons. | QPVLRPPS-AGSGFQRYTICTGS | SGRTAMV | Q...R...S...TVV | EDD R...V...IDR.SNS | DRPSGIPDFSGSR--SGTASLISLIGLQPEDEADYTC | QTDTNRAV | FGGCKLTVL | |
| D7VA | | | | | | | | LV6-57 |
| D8VA | | | | | | | | VL2-11 |
| F10VA | | | | | | | | LV10-54 |
| G17VA | | | | | | | | LV10-54 |
| H40VA | | | | | | | | VL3-21 |
| A66VK | | | | | | | | KV3-20 |
| D80VK | | | | | | | | KV3-20 |
| E88VA | | | | | | | | LV1-44 |
| E90VK | | | | | | | | KV1-39 |
| E98VA | | | | | | | | LV1-44 |

Se muestran regiones marco 1-4 (FR1-4) y regiones determinantes de complementariedad 1-3 (CDR1-3) para VH y VL. Los nombres de FR, CDR y el gen se definen usando la base de datos IMGT. Para VH, los primeros 11 residuos de FR1 (QVQLQSGAEV) y los últimos 5 residuos de FR4 (VTYSS) son invariantes y no se muestran. Los puntos denotan identidad con la secuencia consenso, los guiones denotan espacios. Se encontraron 6 genes diferentes de VH y 10 diferentes de VL. 4 de los 6 anticuerpos comparan el mismo gen de VH. 5 de 6 VH a una familia de genes, IGHV1-69-01. Los genes de VL son mucho más diversos que los genes de VH, consistente con la carencia de contactos observados entre F10 y H5; tres de los 10 VL son cadena k. Las 3 cadenas de VH usadas para elaborar IgG1 se muestran con paréntesis rizados (). Los residuos de contacto de H5 con F10 están resaltados junto con los correspondientes residuos en otros VH, con eclosión cruzada (los residuos críticos como se definen por cálculos de energía de contacto rápida) y con cajones (otros contactos <45 Å).

Fig. 3

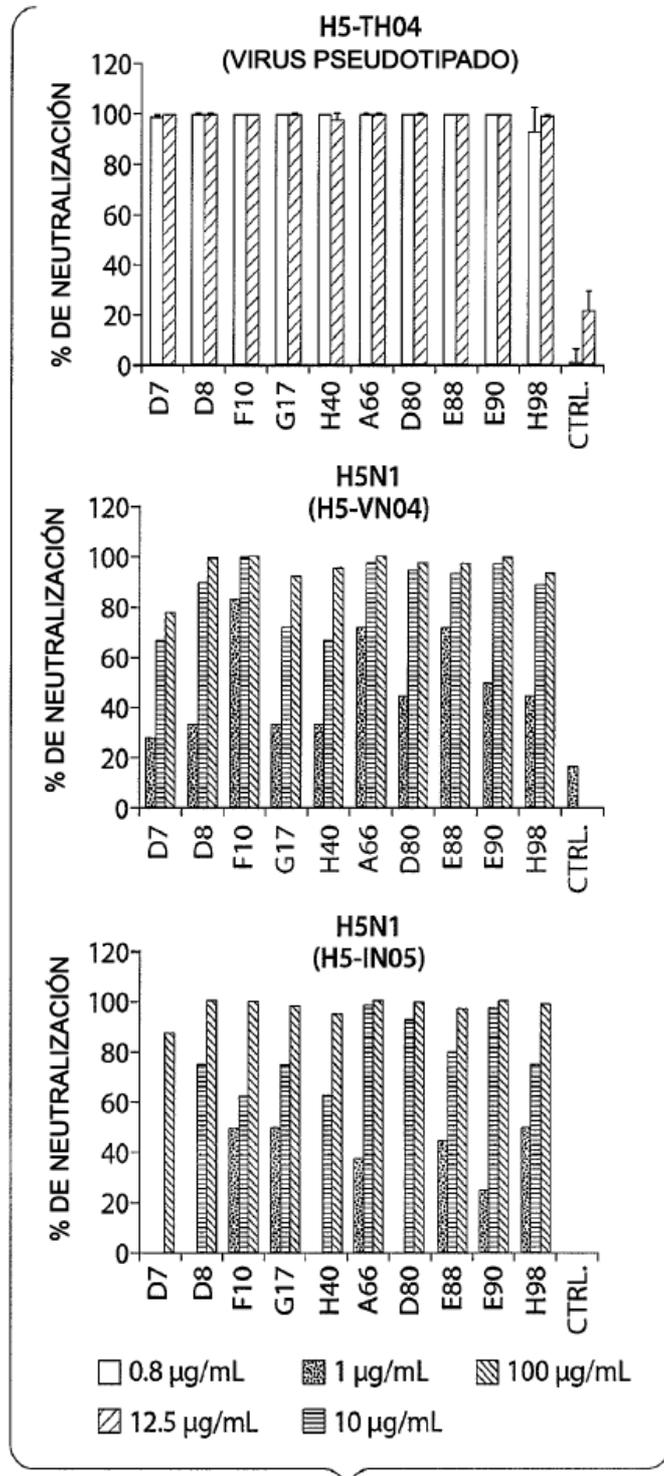


Fig. 4A

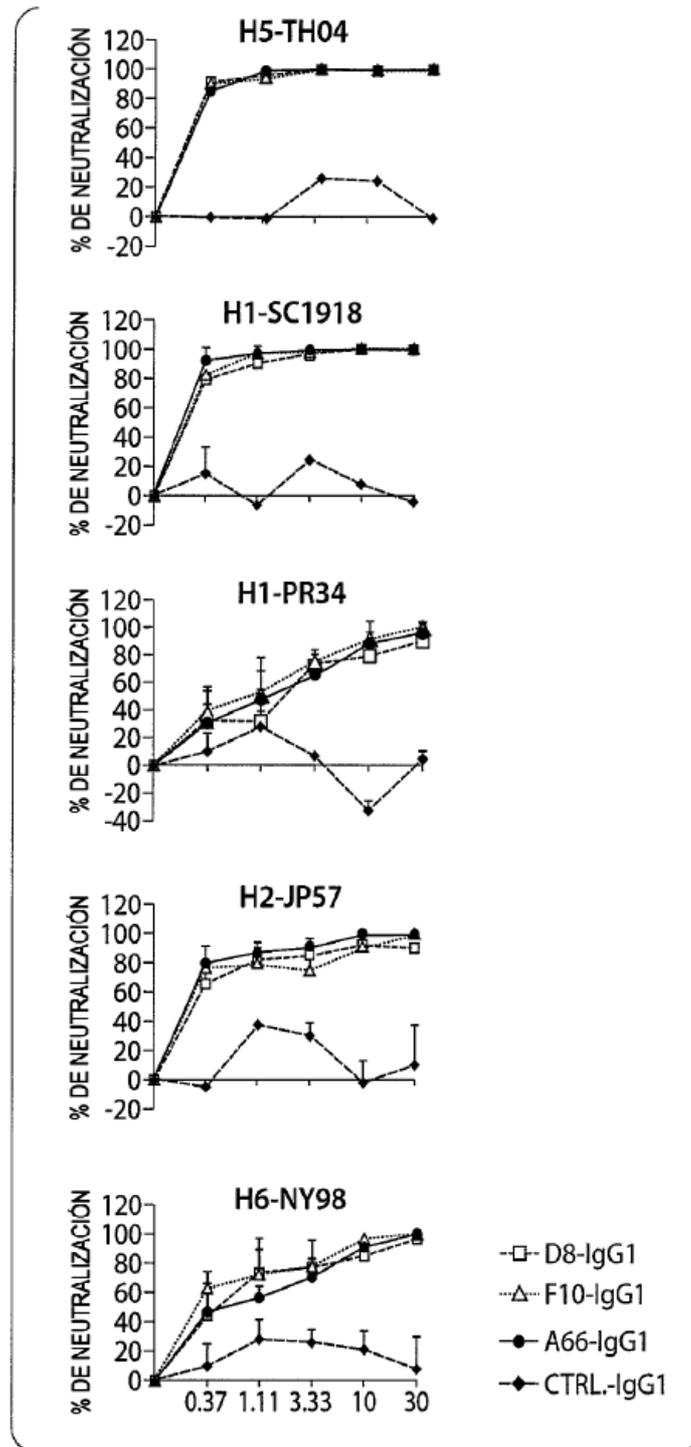


Fig. 4B

| VIRUS | mAb HUMANO F10 | mAb MURINO 21G8.6 | CTRL. 80R |
|----------------|----------------------|-------------------------|--------------|
| H5-TH04 (H5N1) | 40 | 40 | < |
| H5-HK97 (H5N1) | 160 | 40 | < |
| H1-OH83 (H1N1) | 40 | < | < |
| H1-PR34 (H1N1) | 320 | < | < |
| H2-AA60 (H2N2) | 20 | < | < |

Fig. 4C

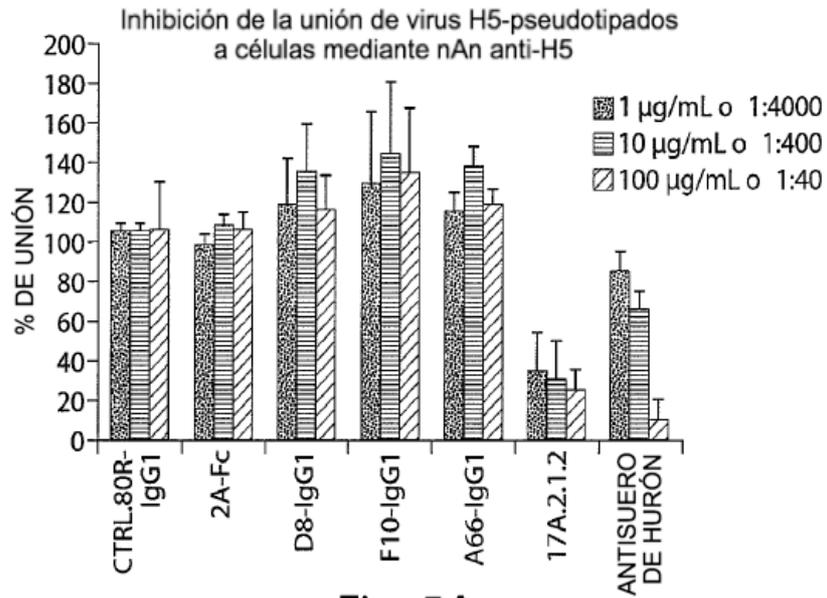


Fig. 5A

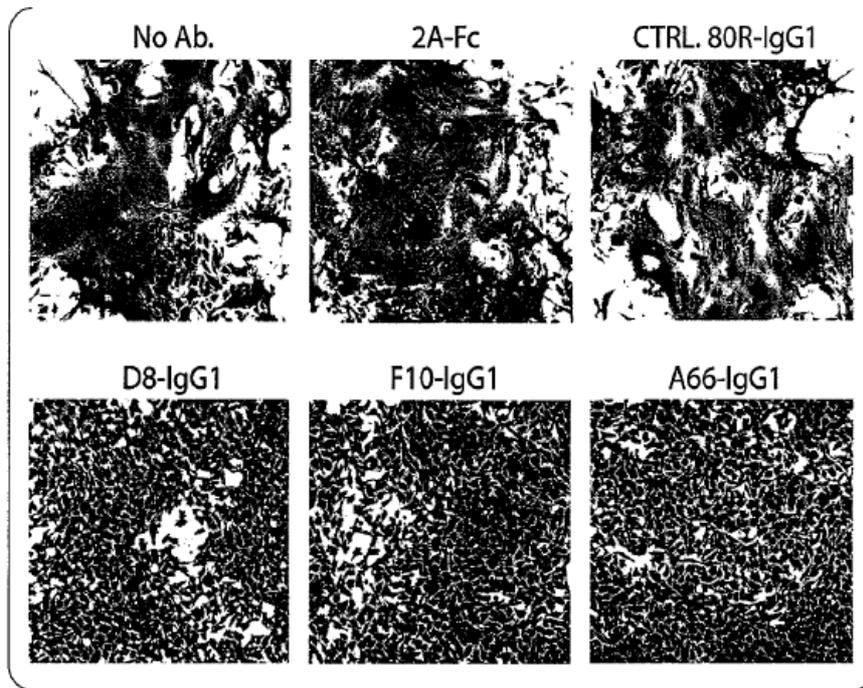


Fig. 5B

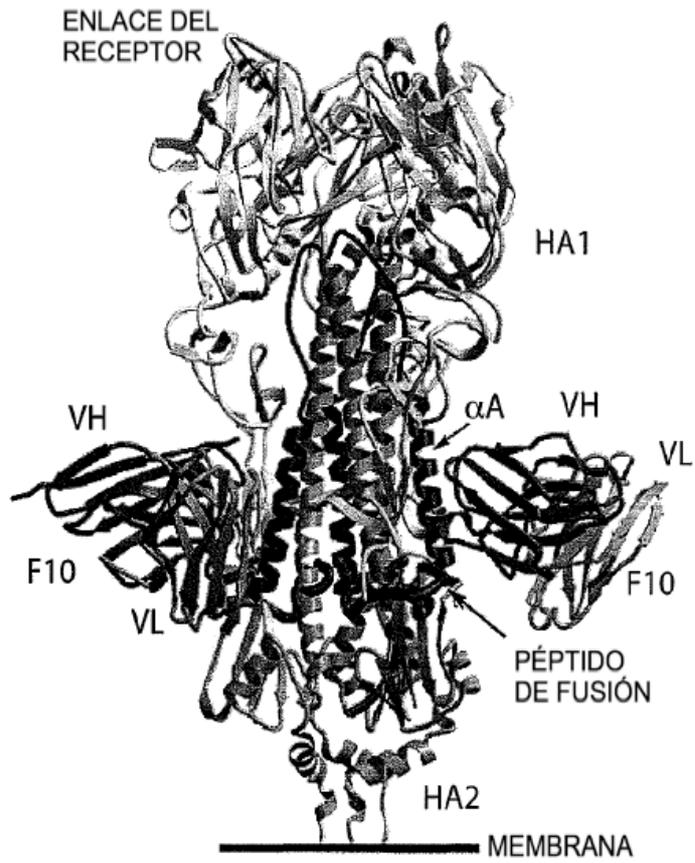


Fig. 6A

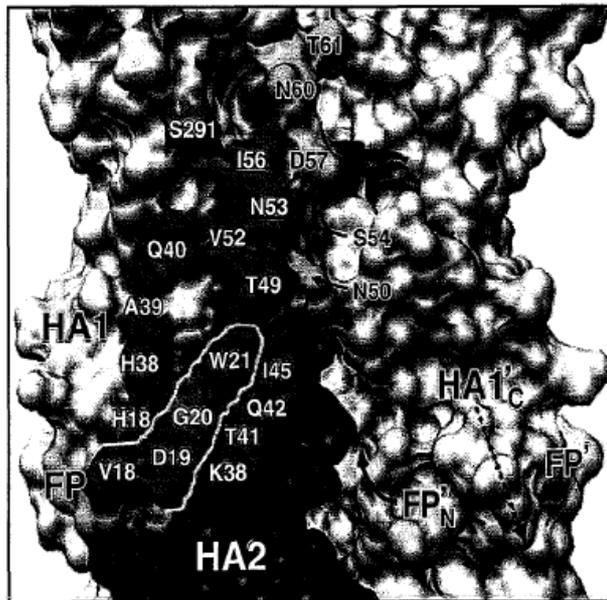


Fig. 6B

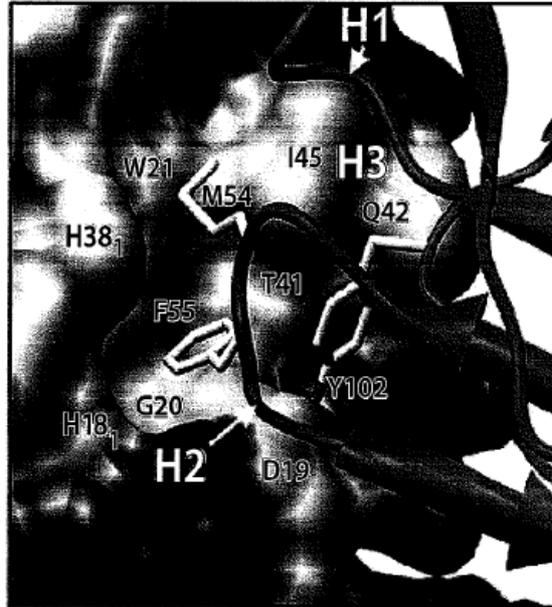


Fig. 6C

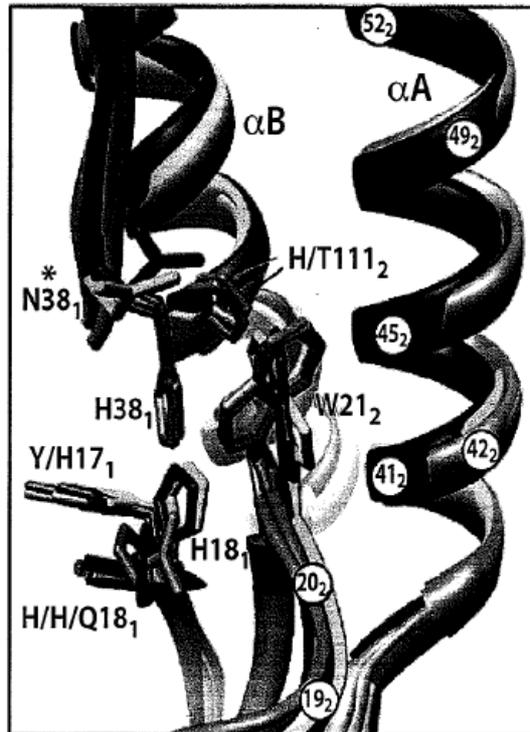


Fig. 6D

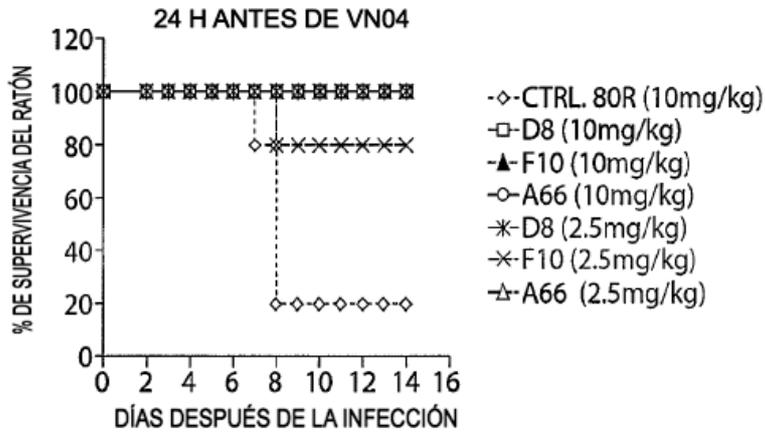


Fig. 7A

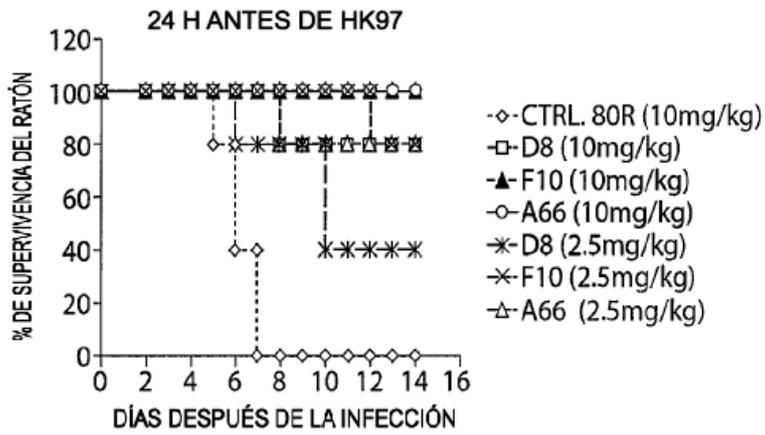


Fig. 7B

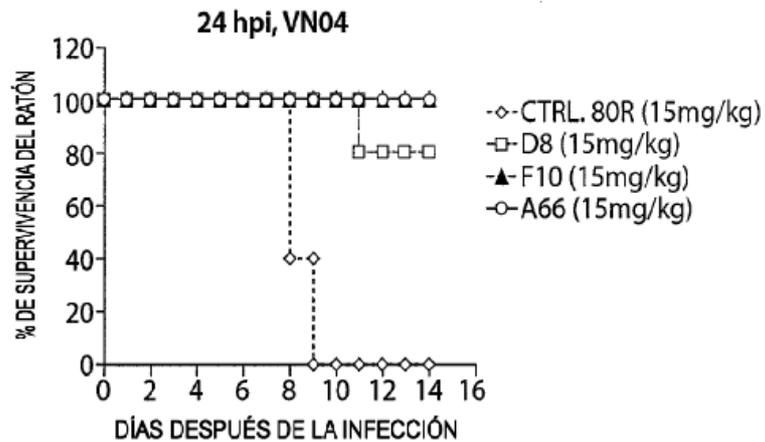


Fig. 7C

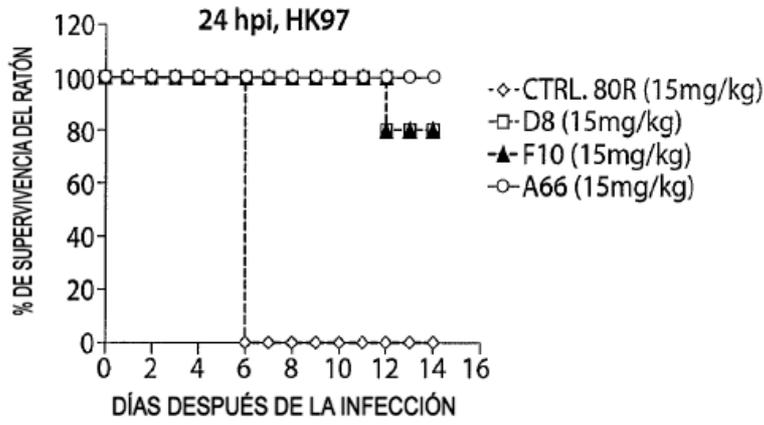


Fig. 7D

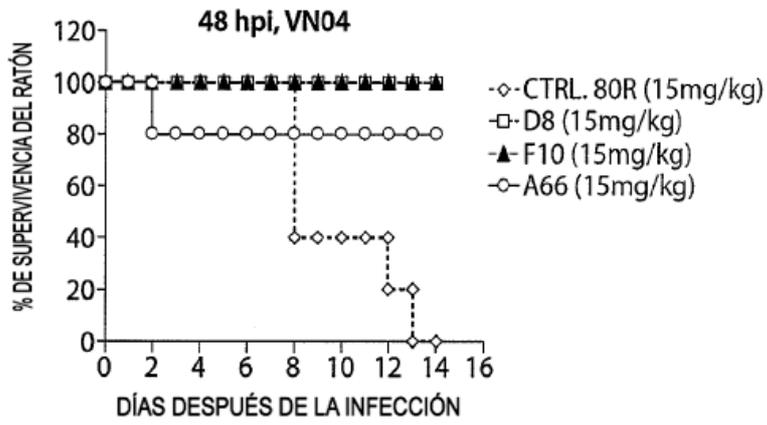


Fig. 7E

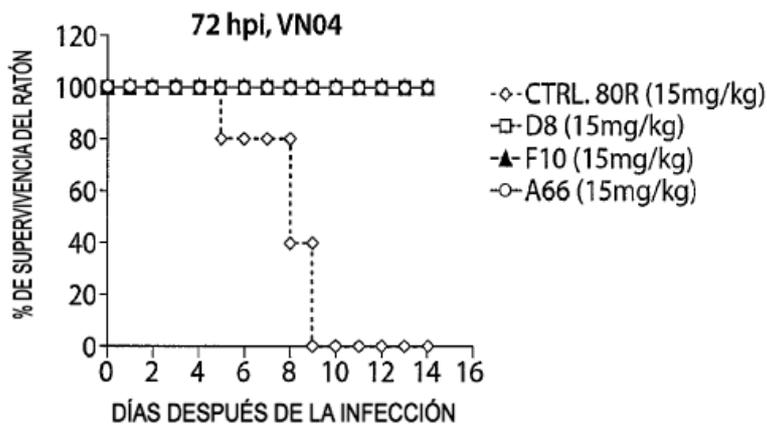


Fig. 7F

Fig. 7G

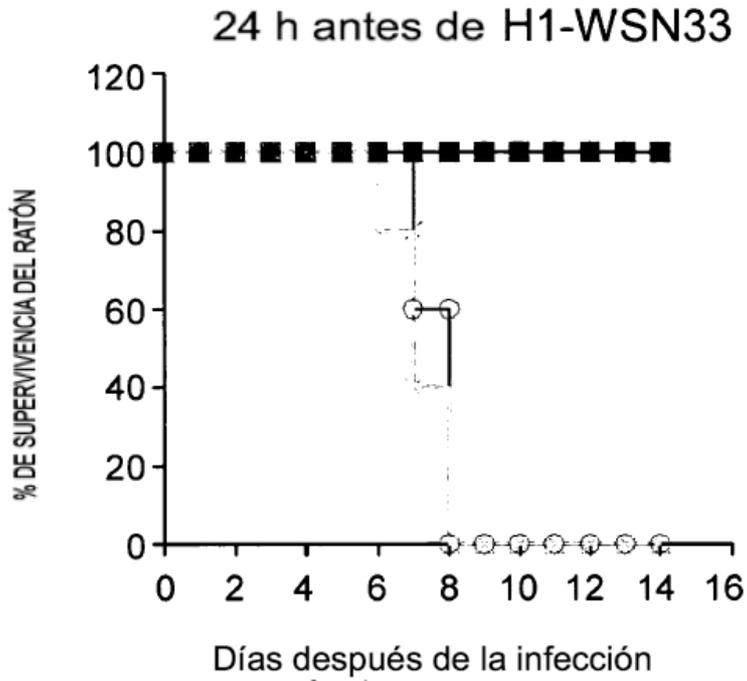
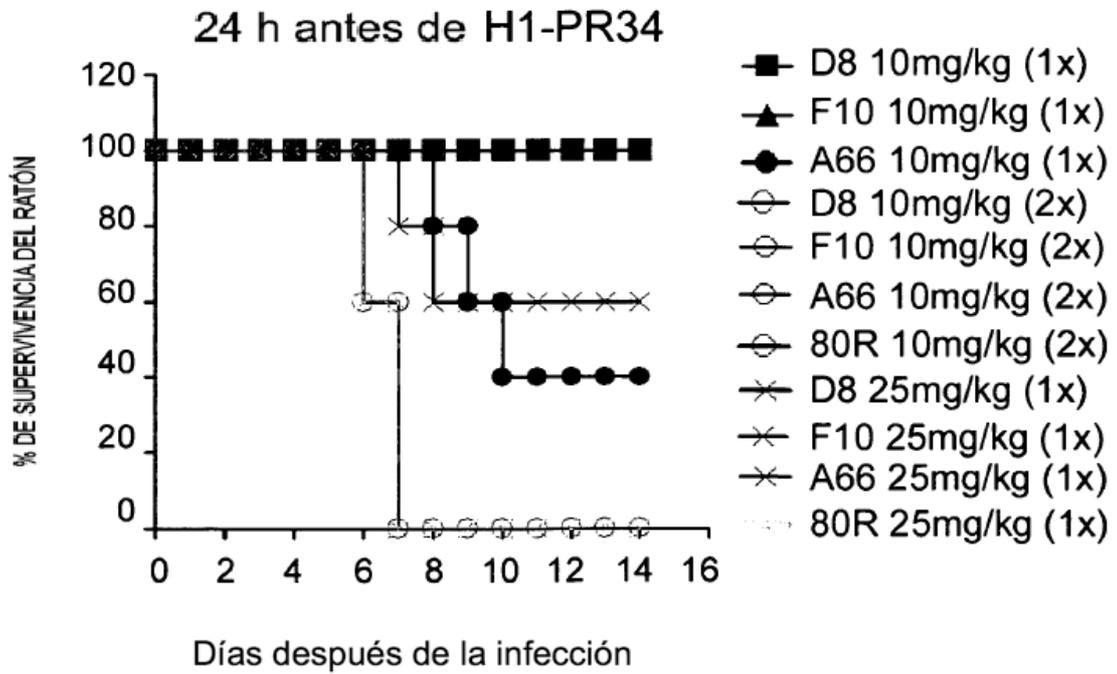


Fig. 7H



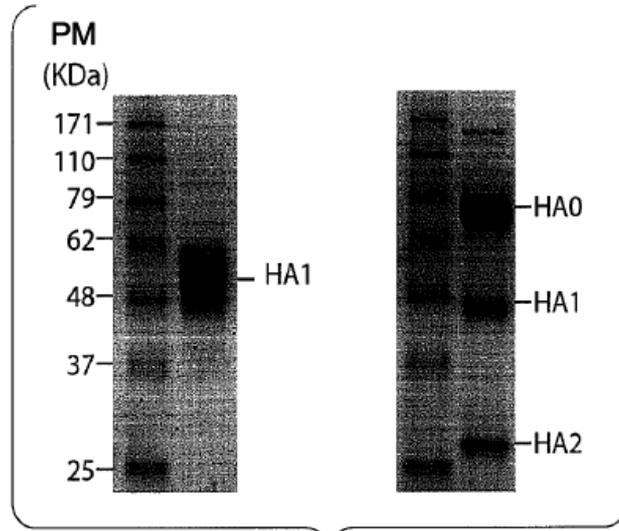


Fig. 8A

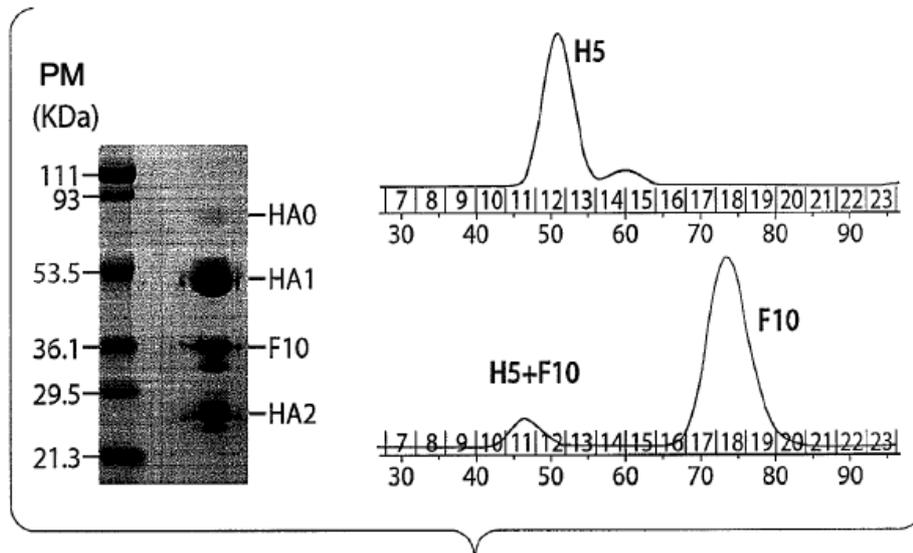


Fig. 8B

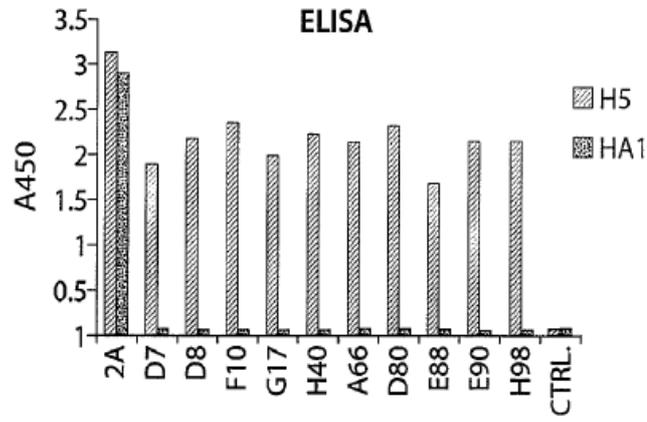


Fig. 9A

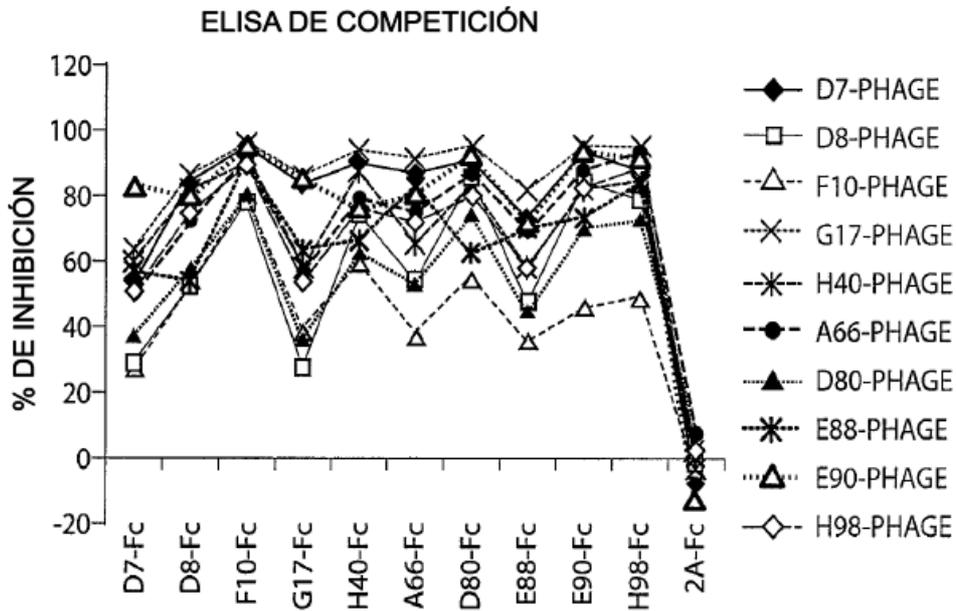


Fig. 9B

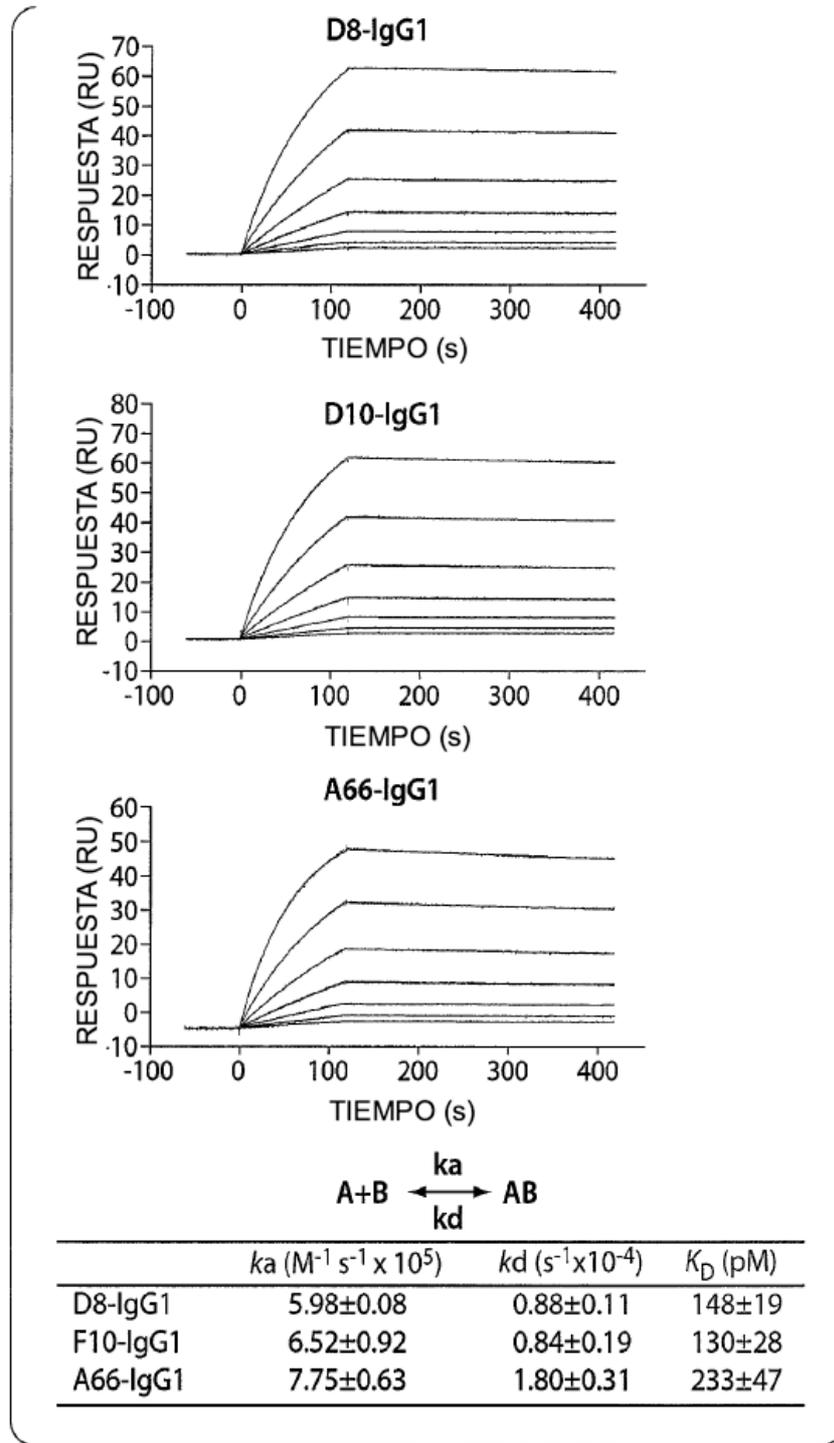


Fig. 10

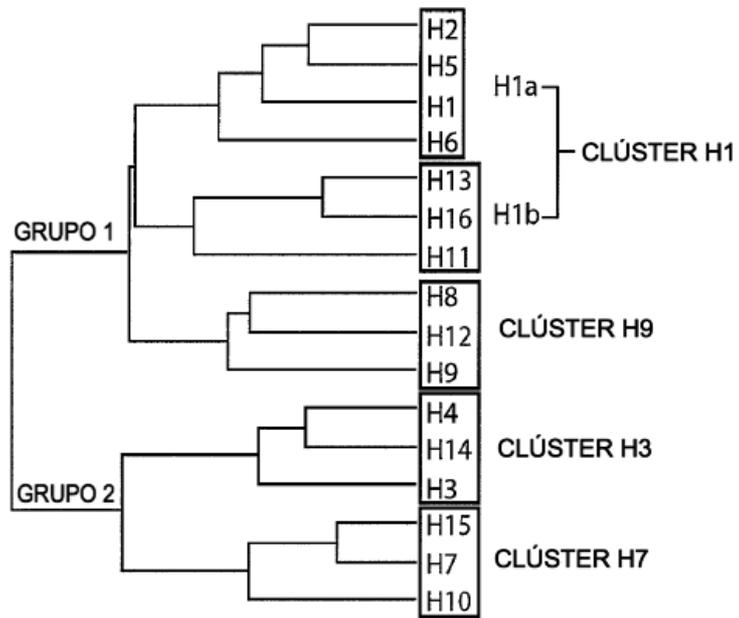
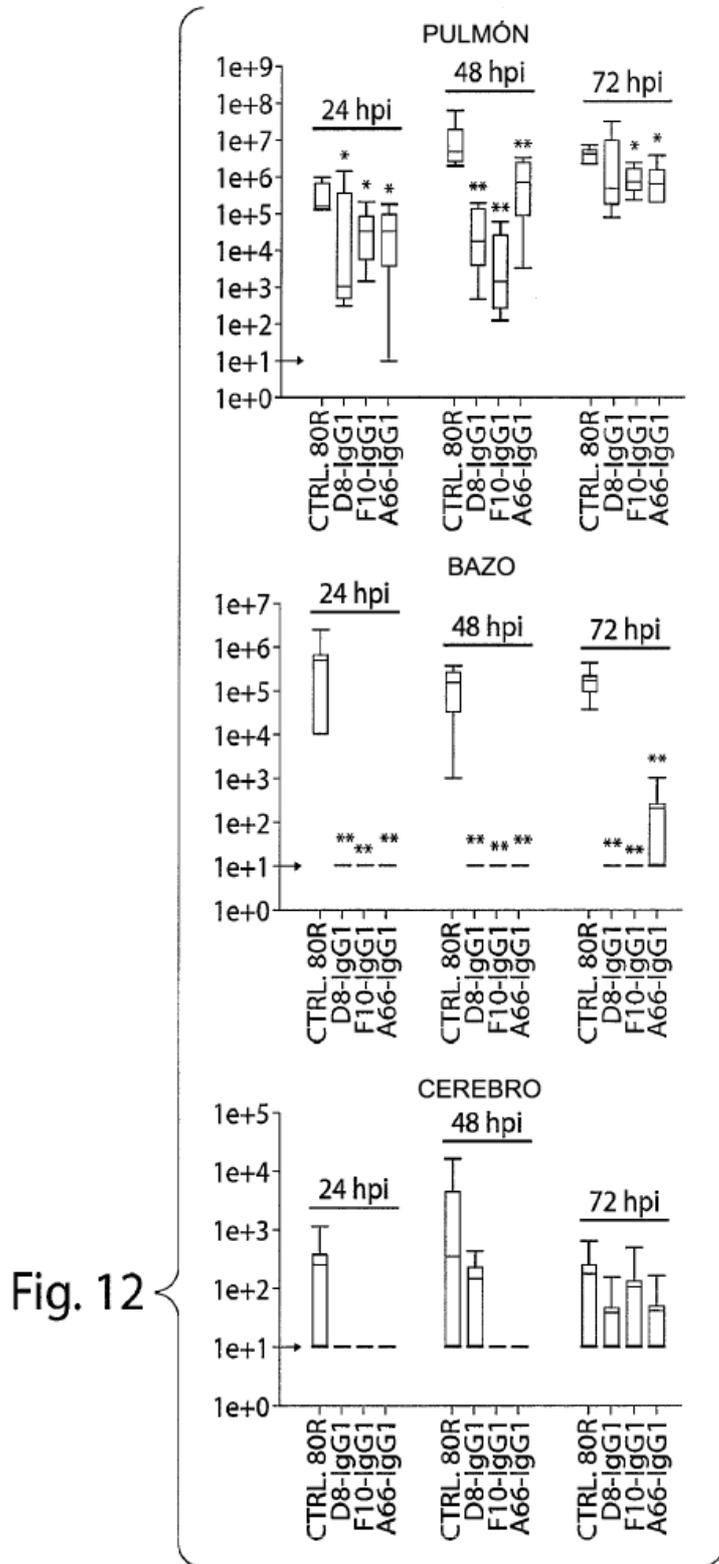


Fig. 11



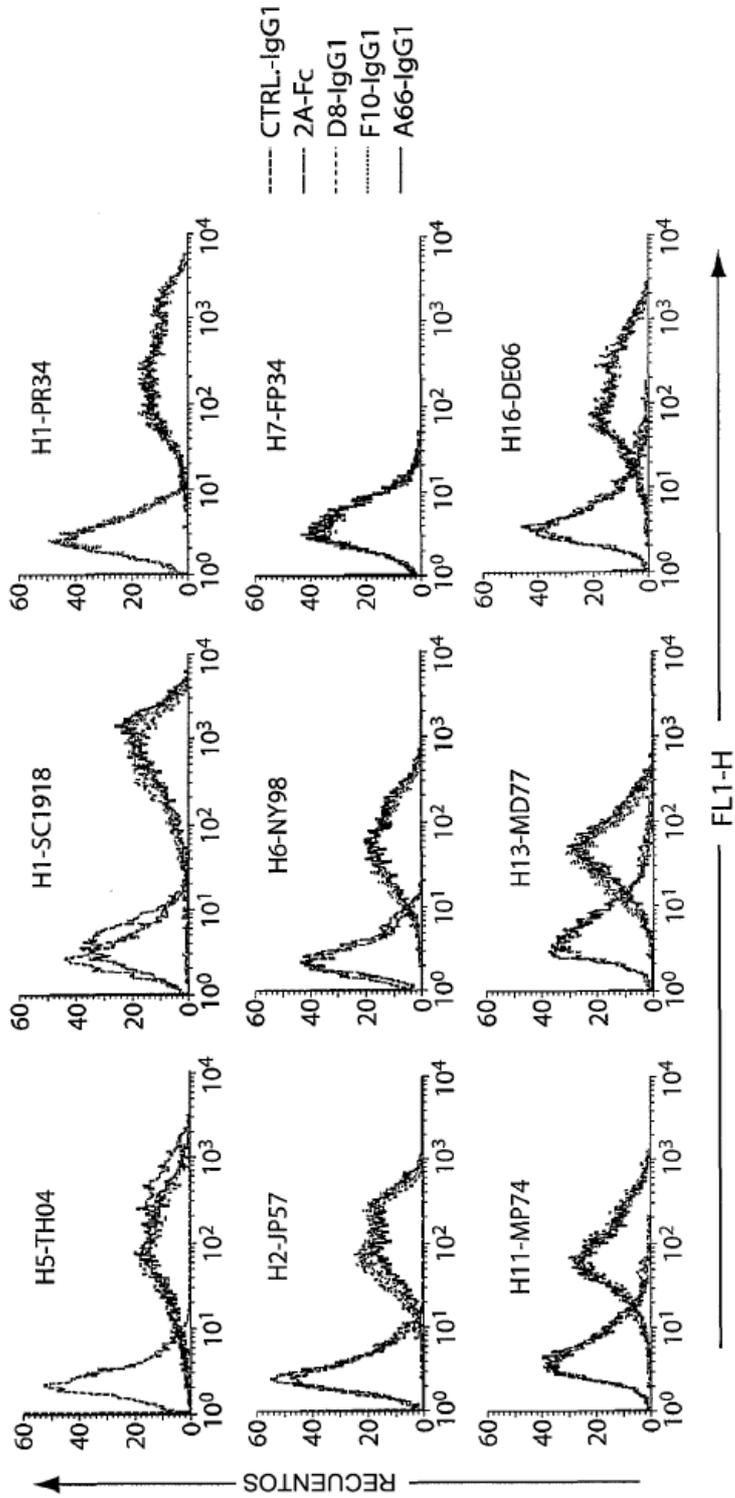


Fig. 13