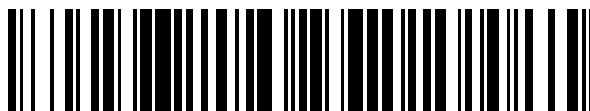


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 519**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2009** **PCT/IB2009/006616**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2010** **WO10010466**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2009** **E 09745097 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017** **EP 2313112**

54 Título: **Anticuerpos neutralizantes contra el virus de la gripe A y usos de estos**

30 Prioridad:

27.05.2009 US 181582 P

25.07.2008 US 83838 P

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

06.04.2018

73 Titular/es:

INSTITUTE FOR RESEARCH IN BIOMEDICINE

(100.0%)

Via Vela 6

6500 Bellinzona, CH

72 Inventor/es:

LANZAVECCHIA, ANTONIO

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 662 519 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 neutralizantes contra el virus de la gripe A y usos de estos

ANTECEDENTES

Se cree que la respuesta con anticuerpos neutralizantes frente al virus de la gripe A es específica para un subtipo viral concreto. Existen 16 subtipos de la gripe A definidos por sus hemaglutininas (HA). Las 16 HA, H1 - H16, se pueden clasificar en dos grupos. El grupo 1 está constituido por los subtipos H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 y H16, y el grupo 2 incluye los subtipos H3, H4, H7, H10, H14 y H15. Aunque todos los subtipos están presentes en las aves, principalmente los subtipos H1, H2 y H3 causan enfermedades en seres humanos. Los subtipos H5, H7 y H9 provocan infecciones graves esporádicas en seres humanos y pueden generar una nueva pandemia. Los virus H1 y H3 evolucionan continuamente y generan nuevas variantes, un fenómeno denominado deriva antigénica. Como consecuencia, los anticuerpos producidos como respuesta a virus anteriores no protegen o lo hacen de manera deficiente frente a nuevos virus que han experimentado deriva. Una consecuencia es que se ha de producir una nueva vacuna cada año contra los virus H1 y H3 que se predice que van a aparecer, un proceso que es muy costoso, así como no siempre eficaz. Lo mismo es válido para la producción de una vacuna contra la gripe H5. Ciertamente, no está claro si las vacunas H5 actuales basadas en los aislados del virus de la gripe A de Vietnam o Indonesia protegerán contra un futuro virus H5 pandémico.

Por estas razones, sería sumamente deseable disponer de una vacuna que induzca anticuerpos ampliamente neutralizantes capaces de neutralizar todos los subtipos del virus de la gripe A, así como también sus variantes anuales (revisado por Gerhard *et al.*, 2006). Además, los anticuerpos heterosubtípicos ampliamente neutralizantes se podrían utilizar en contextos preventivos o terapéuticos.

Se han caracterizado anticuerpos que reconocen el virus de la gripe A. Los anticuerpos contra M2 (una pequeña proteína invariante expresada en las células infectadas pero no en los virus infecciosos) han demostrado un cierto efecto protector *in vivo*, posiblemente al convertir las células infectadas en dianas de la destrucción por parte de las células NK o linfocitos T citotóxicos. Sin embargo, la HA es la principal diana de los anticuerpos neutralizantes. Esta comprende un gran ectodominio de ≈500 aminoácidos que es escindido por las enzimas derivadas del hospedador para generar 2 polipéptidos que siguen estando unidos por un enlace disulfuro. El fragmento N-terminal más grande (HA1, 320-330 aminoácidos) forma un dominio globular distal respecto a la membrana que contiene el sitio de unión al receptor y la mayoría de los determinantes reconocidos por los anticuerpos neutralizantes del virus. La porción C-terminal más pequeña (HA2, ≈180 aminoácidos) forma una estructura de tipo tallo que ancla el dominio globular a la membrana viral o celular. El grado de homología secuencial entre los subtipos es menor en los polipéptidos HA1 (34%-59% de homología entre subtipos) que en el polipéptido HA2 (51%-80% de homología). La región más conservada es la secuencia alrededor del sitio de escisión, especialmente los 11 aminoácidos N-terminales de HA2, denominada péptido de fusión, que está conservada entre todos los subtipos del virus de la gripe A. Parte de esta región está expuesta como un bucle superficial en la molécula precursora de HA (HA0) pero se vuelve inaccesible cuando se escinde HA0 para obtener HA1/HA2. Resumiendo, estas son regiones conservadas entre diferentes subtipos de HA, especialmente en la región de unión HA1-HA2 y en la región HA2. Sin embargo, estas regiones no son muy accesibles para los anticuerpos neutralizantes.

Tan sólo ha habido un éxito limitado en la identificación de anticuerpos que neutralizan más de un subtipo de virus de la gripe A y su amplitud de neutralización es reducida y su potencia es baja. Okuno *et al.*, inmunizaron ratones con el virus de la gripe A/Okuda/57 (H2N2) y aislaron un anticuerpo monoclonal (C179) que se une a un epítipo conformacional conservado en HA2 y neutraliza virus de la gripe A del subtipo H2, H1 y H5 del grupo 1 *in vitro* e *in vivo* en modelos animales (Okuno *et al.*, 1993; Smirnov *et al.*, 1999; Smirnov *et al.*, 2000).

Recientemente Gioia *et al.* describieron la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus H5N1 en el suero de algunos individuos que recibieron una vacuna contra la gripe estacional convencional. (Gioia *et al.*, 2008). Los autores sugieren que la actividad neutralizante puede deberse a anticuerpos contra la neuraminidasa (N1). Sin embargo, no se aislaron los anticuerpos monoclonales y no se caracterizaron los epítopos diana. No está claro si los anticuerpos del suero neutralizan otros subtipos del virus de la gripe A.

A pesar de décadas de investigación, no se dispone de anticuerpos comercializados que neutralicen o inhiban ampliamente la infección por el virus de la gripe A o atenúen la enfermedad provocada por el virus de la gripe A. Por tanto, se necesita identificar nuevos anticuerpos que protejan frente a múltiples subtipos del virus de la gripe A.

El documento WO2008/028946A2 describe moléculas de unión tales como los anticuerpos monoclonales Schumann que se unen al virus de la gripe H5N1 y tienen actividad neutralizante contra el virus de la gripe H5N1.

El documento EP1264885 A1 describe una colección de anticuerpos que se prepara seleccionando una región variable de la cadena ligera capaz de unirse a la región sepultada de la cadena pesada para reproducir una conformación activa utilizando esta.

El documento WO 2007 1343 27A2 describe métodos y medios para identificar, producir y modificar anticuerpos neutralizantes contra virus de la gripe A y para los anticuerpos neutralizantes producidos.

El documento EP1925318 A1 describe el uso del virus de la variolovacuna de Ankara modificado (MVA, por sus siglas en inglés) recombinante que comprende un ácido nucleico heterólogo para la producción de un medicamento, en particular, una vacuna, cuando la secuencia del ácido nucleico heterólogo procede de un antígeno HV de la clase de virus de la gripe A.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La invención se basa, en parte, en el aislamiento a partir de individuos vacunados con la vacuna contra la gripe estacional de anticuerpos monoclonales humanos de origen natural que se unen a HA y neutralizan la infección de más de un subtipo de virus de la gripe A, así como también de epítomos novedosos a los cuales se unen los anticuerpos de la invención. En consecuencia, en un aspecto de la invención, la invención comprende un anticuerpo y fragmentos de unión al antígeno de este que neutralizan la infección de más de un subtipo de virus de la gripe A, seleccionados entre subtipos del grupo 1 y grupo 2.

En consecuencia, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) 1, 2 y 3 de la cadena pesada que tienen una identidad secuencial de al menos un 75% con las SEQ ID NOS: 1, 2 y 3, respectivamente, y secuencias de CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera que tienen una identidad secuencial de al menos un 75% con las SEQ ID NOS: 4, 5 y 6, respectivamente, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 37, 38, 39 y 40 y donde el anticuerpo neutraliza la infección de un subtipo del grupo uno y el subtipo del grupo 2 del virus de la gripe A.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno de este, que neutraliza la infección de un subtipo del grupo 1 y un subtipo del grupo 2 del virus de la gripe A donde el polinucleótido comprende una secuencia de las a) SEQ ID NOS: 7-12, b) SEQ ID NOS: 15 y 16, o c) SEQ ID NOS 34 y 16.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona una célula que expresa un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con el segundo o tercer aspecto de la presente invención o la célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con el segundo o tercer aspecto de la presente invención, la célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con el quinto aspecto de la presente invención en la producción de un medicamento para el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A.

De acuerdo con el séptimo aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un polipéptido aislado o inmunógeno purificado que comprende un epítomo que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 37, 38, 39 y 40, donde el polipéptido inmunógeno se une al anticuerpo o fragmento de unión al anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención en un método *in vitro* de cribado para detectar ligandos capaces de neutralizar la infección por el virus de la gripe A.

De acuerdo con un octavo aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con el segundo o tercer aspecto de la presente invención, la célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con el quinto aspecto de la presente invención en un método *in vitro* de diagnóstico de la infección por el virus de la gripe A.

De acuerdo con un noveno aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, ácido nucleico de acuerdo con el segundo o tercer aspecto de la presente invención, la célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con el quinto aspecto de la presente invención en un método *in vitro* de

monitorización de la calidad de las vacunas contra el virus de la gripe A comprobando que el antígeno de dicha vacuna contenga el epítipo específico en la conformación correcta.

De acuerdo con un décimo aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con el segundo o tercer aspecto de la presente invención, la célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención, la composición farmacéutica de acuerdo con el quinto aspecto de la presente invención o un polipéptido inmunógeno aislado o purificado que comprende un epítipo que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 37, 38, 39 y 40, donde el polipéptido inmunógeno se une al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención para su uso en el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A.

La invención comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, que neutraliza la infección de un subtipo del grupo 1 y un subtipo del grupo 2 del virus de la gripe A según se define en el primer aspecto de la presente invención. En otra realización, la invención comprende un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 de la cadena pesada que tienen una identidad secuencial de al menos un 95% con las SEQ ID NOs: 1, 2 y 3, respectivamente, y secuencias de CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera que tienen una identidad secuencial de al menos un 95% con las SEQ ID NOs: 4, 5 y 6, respectivamente.

En otra realización más, la invención comprende un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende (i) una región variable de la cadena pesada que tiene una identidad secuencial de al menos un 95% con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 13 o 33; y (ii) una región variable de la cadena ligera que tiene una identidad secuencial de al menos un 95% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14. La invención comprende además un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, donde el anticuerpo es la variante 1 de FI6 o la variante 2 de FI6.

Opcionalmente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, de la invención es expresado por un clon de linfocitos B inmortalizados.

En un aspecto, la invención comprende una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención. También se divulga un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención o una célula que expresa un anticuerpo de la invención o un fragmento de unión al antígeno de este. También se divulga un polipéptido inmunógeno aislado o purificado que comprende un epítipo que se une a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención.

También se divulga una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención o un fragmento de unión al antígeno de este, una molécula de ácido nucleico de la invención, un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención, una célula que expresa un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención, o un polipéptido inmunógeno y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. También se divulga una composición farmacéutica que comprende un primer anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, y un segundo anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, donde el primer anticuerpo es un anticuerpo de la invención y el segundo anticuerpo es un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, que neutraliza la infección por el virus de la gripe A.

También se divulga el uso de un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión al antígeno de este, un ácido nucleico de la invención, un vector que comprende un ácido nucleico de la invención, una célula que expresa un vector de la invención, un polipéptido inmunógeno aislado o purificado que comprende un epítipo que se une a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, o una composición farmacéutica de la invención (i) en la producción de un medicamento para el tratamiento de la infección por virus de la gripe A, (ii) en una vacuna o (iii) en el diagnóstico de la infección por el virus de la gripe A. Además, también se divulga el uso de un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión al antígeno de este, para monitorizar la calidad de las vacunas contra el virus de la gripe A comprobando que el antígeno de dicha vacuna contenga el epítipo específico en la conformación correcta.

También se divulga un método para reducir la infección por el virus de la gripe A o para reducir el riesgo de infección por el virus de la gripe A que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno de la invención.

También se divulga un epítipo que se une específicamente a un anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión al antígeno de este, para su uso (i) en la terapia, (ii) en la producción de un medicamento para tratar la infección por el virus de la gripe A, (iii) como una vacuna o (iv) en el cribado para detectar ligandos capaces de neutralizar la infección por el virus de la gripe A.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento y aislamiento a partir de individuos que fueron vacunados con la vacuna contra la gripe A estacional, de anticuerpos humanos de origen natural que neutralizan de manera amplia

- 5 diferentes subtipos del virus de la gripe A, así como también de epítomos novedosos a los cuales se unen los anticuerpos de la invención. Tales anticuerpos son atractivos, ya que se necesitan únicamente uno o unos pocos anticuerpos para neutralizar diferentes subtipos del virus de la gripe A. Además, los epítomos reconocidos por tales anticuerpos pueden ser parte de una vacuna capaz de inducir protección amplia contra aislados pandémicos candidatos y estacionales de diferentes subtipos.
- En consecuencia, en una realización la invención proporciona un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, que neutraliza la infección de un subtipo del grupo 1 y un subtipo del grupo 2 del virus de la gripe A según se define en el primer aspecto de la invención.
- 10 Los anticuerpos, y fragmento de unión al antígeno de estos, de la invención tienen una amplia especificidad contra HA de diferentes subtipos del virus de la gripe A. El anticuerpo, o fragmentos de unión al antígeno de la invención, se puede unir específicamente a un epítomo en la región tallo de HA que está conservada entre dos o más subtipos del virus de la gripe A seleccionados a partir del grupo 1 y grupo 2. El anticuerpo, o fragmentos de unión al antígeno de la invención, se une específicamente a un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 37, 38, 39 y 40.
- 15 También se divulgan anticuerpos monoclonales humanos, los clones de linfocitos B inmortalizados o las células hospedadoras transfectadas que secretan anticuerpos de la invención, y el ácido nucleico que codifica los anticuerpos de la invención.
- 20 Las expresiones “fragmento de unión al antígeno”, “fragmento” y “fragmento de anticuerpo”, tal como se utilizan en la presente, se utilizan indistintamente para referirse a cualquier fragmento de un anticuerpo de la invención que mantiene la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo ejemplares incluyen, sin carácter limitante, un anticuerpo monocaténario, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv. El término “anticuerpo”, tal como se utiliza en la presente incluye tanto los anticuerpos como los fragmentos de unión al antígeno de estos.
- 25 La expresión “especificidad amplia”, tal como se utiliza en la presente, se utiliza para referirse a un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la invención que se puede unir y/o neutralizar uno o más subtipos del grupo 1 y uno o más subtipos del grupo 2 del virus de la gripe A.
- 30 Un “anticuerpo neutralizante”, tal como se utiliza en la presente, es uno que puede neutralizar, es decir, prevenir, inhibir, reducir, impedir o interferir con la capacidad de un patógeno para iniciar y/o perpetuar una infección en un hospedador. Las expresiones “anticuerpo neutralizante” y “un anticuerpo que neutraliza” o “anticuerpos que neutralizan” se utilizan indistintamente en la presente. Los anticuerpos se pueden utilizar, solos o combinados, como agentes profilácticos o terapéuticos tras la formulación apropiada, asociados con la vacunación activa, como una herramienta diagnóstica, o como una herramienta de producción tal como se describe en la presente.
- 35 El anticuerpo, o fragmentos de unión al antígeno, de la invención neutraliza uno o más subtipos del grupo 1 del virus de la gripe A (H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 y H16 y sus variantes) y uno o más subtipos del grupo 2 del virus de la gripe A (H3, H4, H7, H10, H14 y H15 y sus variantes). Los subtipos ejemplares del grupo 1 incluyen H1, H2, H5, H6 y H9 y los subtipos ejemplares del grupo 2 incluyen H3 y H7.
- El anticuerpo y el fragmento de anticuerpo de la invención son capaces de neutralizar varias combinaciones de subtipos del virus de la gripe A. Opcionalmente, el anticuerpo puede neutralizar los subtipos H1 y H3, o los subtipos H2 y H3, o los subtipos H3 y H5, o los subtipos H3 y H9, o los subtipos H1 y H7, o los subtipos H2 y H7, o los subtipos H5 y H7, o los subtipos H7 y H9 del virus de la gripe A.
- 40 El anticuerpo y el fragmento de anticuerpo de la invención pueden neutralizar los subtipos H1, H2 y H3, o los subtipos H1, H3 y H5, o los subtipos H1, H3 y H9, o los subtipos H2, H3 y H5, o los subtipos H2, H3 y H9, o los subtipos H3, H5 y H9, o los subtipos H1, H2 y H7, o los subtipos H1, H5 y H7, o los subtipos H1, H7 y H9, o los subtipos H2, H5 y H7, o los subtipos H2, H7 y H9, o los subtipos H5, H7 y H9, o los subtipos H1, H3 y H7, o los subtipos H2, H3 y H7, o los subtipos H3, H5 y H7, o los subtipos H3, H7 y H9 del virus de la gripe A.
- 45 El anticuerpo puede neutralizar los subtipos H1, H2, H3 y H7, o los subtipos H1, H3, H5 y H7, o los subtipos H1, H3, H7 y H9, o los subtipos H2, H3, H5 y H7, o los subtipos H2, H3, H7 y H9, o los subtipos H3, H5, H7 y H9 o los subtipos H1, H2, H3 y H5, o los subtipos H1, H2, H3 y H9, o los subtipos H1, H3, H5 y H9, o los subtipos H2, H3, H5 y H9, o los subtipos H1, H2, H5 y H7, o los subtipos H1, H2, H7 y H9, o los subtipos H1, H5, H7 y H9, o los subtipos H2, H5, H7 y H9 del virus de la gripe A.
- 50 El anticuerpo de la invención puede neutralizar los subtipos H1, H2, H3, H5 y H7, o los subtipos H1, H2, H3, H7 y H9, o los subtipos H1, H3, H5, H7 y H9, o los subtipos H2, H3, H5, H7 y H9, o los subtipos H1, H2, H3, H5 y H9, o los subtipos H1, H2, H5, H7 y H9, o los subtipos H1, H2, H3, H5, H7 y H9 del virus de la gripe A. Opcionalmente, el anticuerpo y los fragmentos de unión al antígeno de la invención neutralizan una o más de las combinaciones anteriores además de neutralizar el subtipo H6 del virus de la gripe A.

El anticuerpo y el fragmento de unión al antígeno de la invención tienen una potencia neutralizante elevada. La concentración del anticuerpo de la invención requerida para una neutralización de un 50% del virus de la gripe A puede, por ejemplo, ser de aproximadamente 50 µg/mL o menos. Opcionalmente, la concentración del anticuerpo de la invención requerida para una neutralización de un 50% del virus de la gripe A es de aproximadamente 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 17.5, 15, 12.5, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4.5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5 o aproximadamente 1 µg/mL o menos. De manera alternativa, la concentración del anticuerpo de la invención requerida para una neutralización de un 50% del virus de la gripe A es de aproximadamente 0.9, 0.8, 0.75, 0.7, 0.65, 0.6, 0.55, 0.5, 0.45, 0.4, 0.35, 0.3, 0.25, 0.2, 0.15, 0.1, 0.075, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.008, 0.006, 0.004, 0.003, 0.002 o aproximadamente 0.001 µg/mL o menos. Esto significa que sólo se requieren concentraciones bajas del anticuerpo para una neutralización de un 50% del virus de la gripe A. La especificidad y la potencia se pueden medir utilizando un ensayo de neutralización estándar conocido por el experto en la técnica.

Anticuerpos de la invención

Los anticuerpos de la invención tienen una especificidad especialmente amplia respecto a HA y neutralizan uno o más subtipos del grupo 1 del virus de la gripe A y uno o más subtipos del grupo 2 del virus de la gripe A. El anticuerpo de la invención se une a un epítipo tal como se define en el primer aspecto de la invención en una región de HA que está conservada entre dos o más subtipos del virus de la gripe A seleccionados a partir del grupo 1 y grupo 2, es decir, un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 37, 38, 39 y 40.

Sin desear ceñirse a ninguna teoría, el anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de la invención se puede unir a un epítipo conservado en la región tallo del virus de la gripe A e inhibir la entrada del virus en una célula interfiriendo con la etapa de fusión. Un epítipo o determinante antigénico de una proteína corresponde a esas partes de la molécula que son reconocidas de manera específica por el sitio de unión (o paratopo) de un anticuerpo. Por lo tanto, los epítopos son entidades relacionales que requieren paratopos complementarios para su reconocimiento operativo. Un epítipo que esté conservado entre diferentes variantes de una proteína significa que el mismo paratopo puede reconocer de manera específica estas diferentes variantes al entrar en contacto con las mismas partes de las moléculas.

Los anticuerpos de la invención pueden ser monoclonales, por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, o anticuerpos recombinantes. La invención también proporciona fragmentos de los anticuerpos de la invención, especialmente fragmentos que mantienen la actividad de los anticuerpos de unión al antígeno. Aunque la memoria descriptiva, incluidas las reivindicaciones, puede, en algunos puntos, referirse de manera explícita a fragmento(s) de unión al antígeno, fragmento(s) de anticuerpos, variante(s) y/o derivado(s) de anticuerpos, se entiende que el término "anticuerpo" o la expresión "anticuerpo de la invención" incluye todas las categorías de anticuerpos, concretamente, fragmento(s) de unión al antígeno, fragmento(s) de anticuerpo, variante(s) y derivado(s) de anticuerpos.

Opcionalmente, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención neutralizan una combinación de dos o más subtipos del grupo 1 y grupo 2 del virus de la gripe A. Los subtipos ejemplares del virus de la gripe A incluyen, sin carácter limitante, H5N1 (A/Vietnam/1203/04), H1N1 (A/Nueva Caledonia/20/99), H1N1 (A/islas Salomón/3/2006), H3N2 (A/Wyoming/3/03) y H9N2 (A/pollo/Hong Kong/G9/97). Como alternativa, los anticuerpos neutralizan y/o son específicos para una combinación de 3, 4, 5, 6, 7 o más subtipos del grupo 1 y grupo 2 del virus de la gripe A.

Opcionalmente, la invención comprende un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de este, que es específico para los subtipos H1 y H3 (por ejemplo, H1N1 y H3N2); o H1, H3, H5 y H9 (por ejemplo, H1N1, H3N2, H5N1 y H9N2) del virus de la gripe A. Como alternativa, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo de este son específicos para H1, H3, H5, H7 y H9 (por ejemplo, H1N1, H3N2, H5N1, H7N1, H7N7, H9N2). Se han proporcionado otras combinaciones ejemplares de subtipos del virus de la gripe A anteriormente en la solicitud.

Los números ID de SEQ de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) y la región variable de la cadena ligera (V_L) de anticuerpos ejemplares de la invención, así como también los números ID de SEQ de las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Números ID de SEQ de los polipéptidos y polinucleótidos de V_H y V_L de anticuerpos neutralizantes del virus de la gripe A ejemplares.

	SEQ ID Nos. de polipéptidos y polinucleótidos de V _H y V _L			
	Polipéptido de V _H	Polipéptido de V _L	Polinucleótido de V _H	Polinucleótido de V _L
Variante 1 de FI6	13	14	15	16
Variante 2 de FI6	33	14	34	16

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 95%, 97%, 98%, 99% o un 100% a la secuencia enunciada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 13 o 33. Como alternativa, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en aproximadamente un 95%, 97%, 98%, 99% o un 100% a la secuencia enunciada en la SEQ ID NO: 14.

La región variable de la cadena pesada de un anticuerpo de la invención puede estar codificada por un ácido nucleico que tiene una secuencia que es idéntica en aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o un 100% a la secuencia enunciada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 15 o 34 y la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo de la invención puede estar codificada por un ácido nucleico que tiene una secuencia que es idéntica en aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o un 100% a la secuencia enunciada en la SEQ ID NO: 16.

Los CDR de las cadenas pesadas de anticuerpo se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente. De manera similar, las CDR de las cadenas ligeras se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente. Las posiciones de los aminoácidos de CDR se definen de acuerdo con el sistema de numeración IMGT como: CDR1 - posiciones IMGT 27 a 38, CDR2 - posiciones IMGT 56 a 65 y CDR3 - posiciones IMGT 105 a 117.

La Tabla 2 proporciona los números ID de SEQ de las secuencias de aminoácidos de las seis CDR de las cadenas pesada y ligera, respectivamente, de los anticuerpos ejemplares de la invención.

Tabla 2. Números ID de SEQ de los polipéptidos de CDR de anticuerpos neutralizantes del virus de la gripe A ejemplares.

	SEQ ID NOs. de los polipéptidos de CDR					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
Variante 1 de FI6	1	2	3	4	5	6
Variante 2 de FI6	1	2	3	4	5	6

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención puede comprender al menos una CDR con una secuencia que tiene una identidad secuencial de al menos un 95% con cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-6.

Opcionalmente, un anticuerpo de la invención, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende todas las CDR de la variante 1 del anticuerpo FI6 tal como se enumeran en la Tabla 2, y neutraliza la infección por el virus de la gripe A. Como alternativa, un anticuerpo de la invención, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende todas las CDR de la variante 2 del anticuerpo FI6 tal como se enumeran en la Tabla 2, y neutraliza la infección por el virus de la gripe A.

Los anticuerpos ejemplares de la invención incluyen la variante 1 de FI6 y la variante 2 de FI6.

También se divulga un anticuerpo, o fragmento de este, que se une al mismo epítipo que un anticuerpo de la invención, o un anticuerpo que compite con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención.

También se divulgan moléculas de anticuerpos híbridos que comprenden una o más CDR de un anticuerpo de la invención y una o más CDR de otro anticuerpo para el mismo epítipo. Tales anticuerpos híbridos pueden comprender tres CDR de un anticuerpo de la invención y tres CDR de otro anticuerpo para el mismo epítipo. Los anticuerpos híbridos ejemplares comprenden i) las tres CDR de la cadena ligera de un anticuerpo de la invención y las tres CDR de la cadena pesada de otro anticuerpo para el mismo epítipo, o ii) las tres CDR de la cadena pesada de un anticuerpo de la invención y las tres CDR de la cadena ligera de otro anticuerpo para el mismo epítipo.

También están incluidos en el alcance de la invención los anticuerpos variantes. Por lo tanto, las variantes de las secuencias enunciadas en la solicitud también están incluidas en el alcance de la invención. Tales variantes incluyen variantes naturales generadas por mutación somática *in vivo* durante la respuesta inmunitaria o *in vitro* tras el cultivo de clones de linfocitos B inmortalizados. Como alternativa, se pueden generar las variantes debido a la degeneración del código genético, tal como se ha mencionado anteriormente, o se pueden producir debido a errores en la transcripción o traducción.

Se pueden obtener variantes adicionales de las secuencias de anticuerpo con una mejora en la afinidad y/o potencia utilizando métodos conocidos en la técnica y estas están incluidas en el alcance de la invención. Por ejemplo, se pueden utilizar sustituciones de aminoácidos para obtener anticuerpos con una mejora adicional de la afinidad. Como alternativa, se puede utilizar la optimización de codones de la secuencia de nucleótidos para mejorar la eficacia de la

traducción en los sistemas de expresión para la producción del anticuerpo. Además, los polinucleótidos que comprenden una secuencia optimizada para la especificidad del anticuerpo o la actividad neutralizante mediante la aplicación de un método de evolución dirigida en cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de la invención también están comprendidos en el alcance de la invención.

Opcionalmente, las secuencias de anticuerpos variantes pueden compartir una identidad secuencial de aminoácidos de un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más con las secuencias enunciadas en la solicitud. Tal identidad secuencial se puede calcular respecto a la longitud total de la secuencia de referencia (es decir, la secuencia enunciada en la solicitud). En algunas opciones, la identidad porcentual, tal como se denomina en la presente, es tal como se determina utilizando la versión 2.1.3 de BLAST, utilizando los parámetros por defecto especificados por NCBI (el Centro Nacional para la Información Biotecnológica; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [matriz Blosom 62; penalización por apertura del hueco = 11 y penalización por extensión del hueco = 1].

También se divulgan secuencias de ácido nucleico que codifican parte o la totalidad de las cadenas ligera y pesada y CDR de los anticuerpos de la presente invención. En la presente se proporcionan secuencias de ácido nucleico que codifican parte o la totalidad de las cadenas ligera y pesada y CDR de los anticuerpos ejemplares de la invención. La Tabla 1 proporciona los números ID de SEQ de las secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de los anticuerpos ejemplares de la invención. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en la presente incluyen la SEQ ID NO: 15 (que codifica la región variable de la cadena pesada de la variante 1 de FI6), SEQ ID NO: 34 (que codifica la región variable de la cadena pesada de la variante 2 de FI6) y SEQ ID NO: 16 (que codifica la región variable de la cadena ligera de la variante 1 de FI6 y la variante 2 de FI6).

La Tabla 3 proporciona los números ID de SEQ de las secuencias de ácido nucleico que codifican las CDR de los anticuerpos ejemplares de la invención. Debido a la redundancia del código genético, existirán variantes de estas secuencias que codifican las mismas secuencias de aminoácidos.

Tabla 3. Números ID de SEQ de los polinucleótidos de CDR de anticuerpos neutralizantes del virus de la gripe A ejemplares.

	SEQ ID NOs. de los polinucleótidos de CDR					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
Variante 1 de FI6	7	8	9	10	11	12
Variante 2 de FI6	7	8	9	10	11	12

Las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención incluyen secuencias de ácido nucleico que tienen una identidad de al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% con el ácido nucleico que codifica la cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención. Opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico de la invención tiene la secuencia de un ácido nucleico que codifica una CDR de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención comprende una secuencia que es idéntica en al menos un 75% a la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NOs: 7-12, 15, 16 o 34.

Además, se divulgan vectores, por ejemplo, vectores de expresión, que comprenden una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Las células transformadas con los vectores de este tipo también están incluidas en el alcance de la invención. Los ejemplos de las células de este tipo incluyen, sin carácter limitante, células eucariotas, por ejemplo, células de levadura, células animales o células vegetales. Opcionalmente, las células son células de mamífero, por ejemplo, humanas, CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, de mieloma o hibridoma.

La invención también se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen a un epítipo capaz de unirse a los anticuerpos de la invención incluido, sin carácter limitante, un anticuerpo monoclonal seleccionado a partir del grupo constituido por la variante 1 de FI6 y la variante 2 de FI6.

Los anticuerpos monoclonales y recombinantes son especialmente útiles en la identificación y purificación de los polipéptidos individuales u otros antígenos contra los cuales están dirigidos. Los anticuerpos de la invención tienen una utilidad adicional ya que se pueden emplear como reactivos en inmunoensayos, radioinmunoensayos (RIA) o ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA). En esas aplicaciones, los anticuerpos se pueden marcar con un reactivo detectable por medios analíticos tal como un radioisótopo, una molécula fluorescente o una enzima. Los anticuerpos también se pueden utilizar para la identificación y caracterización molecular (mapeo de epítipo) de antígenos.

Los anticuerpos de la invención se pueden acoplar a un fármaco para el suministro a un sitio de tratamiento o acoplar a una marca detectable para facilitar la obtención de imágenes de un sitio que comprende células de interés, tales como células infectadas con el virus de la gripe A. En la técnica existe constancia de métodos para acoplar anticuerpos a fármacos y marcas detectables, así como también de métodos para obtener imágenes utilizando marcas detectables.

Los anticuerpos marcados se pueden emplear en una amplia variedad de ensayos, empleando una amplia variedad de marcas. La detección de la formación de un complejo anticuerpo-antígeno entre un anticuerpo de la invención y un epítipo de interés (un epítipo del virus de la gripe A) se puede facilitar incorporando una sustancia detectable al anticuerpo. Los medios de detección adecuados incluyen el uso de marcas tales como radionúclidos, enzimas, coenzimas, sustancias fluorescentes, sustancias quimioluminiscentes, cromógenos, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, complejos de grupos prostéticos, radicales libres, partículas, tintes y similares. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen la peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los 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 es luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de material radiactivo adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , o ^3H . Tales reactivos marcados se pueden utilizar en varios ensayos muy conocidos, tales como radioinmunoensayos, enzoinmunoensayos, por ejemplo, ELISA, inmunoensayos fluorescentes y similares. (Remítase a los documentos US 3 766 162; US 3 791 932; US 3 817 837; y US 4 233 402, por ejemplo).

Se puede conjugar un anticuerpo de acuerdo con la invención con un resto terapéutico tal como una citotoxina, un agente terapéutico o un ion metálico radioactivo o radioisótopo. Los ejemplos de radioisótopos incluyen, sin carácter limitante, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111 y similares. Tales conjugados de anticuerpo se pueden utilizar para modificar una respuesta biológica concreta; no se debe interpretar que el resto farmacológico se limita a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de la difteria.

Las técnicas para conjugar tales restos terapéuticos con anticuerpos son muy conocidas. Remítase, por ejemplo, a Arnon *et al.* (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld *et al.* (Alan R. Liss, Inc.), págs. 243-256; ed. Hellstrom *et al.* (1987) "Antibodies for Drug Delivery," en *Controlled Drug Delivery*, ed. Robinson *et al.* (2.^a ed; Marcel Dekker, Inc.), págs. 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, ed. Pinchera *et al.* págs. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italia, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, ed. Baldwin *et al.* (Academic Press, New York, 1985), págs. 303-316; y Thorpe *et al.* (1982) *Immunol. Rev.* 62:119-158.

Como alternativa, se puede conjugar un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de este, con un segundo anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de este, para formar un heteroconjugado de anticuerpos tal como se describe en el documento US 4 676 980. Además, se pueden utilizar conectores entre las marcas y los anticuerpos de la invención (por ejemplo, US 4 831 175). Los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de estos, se pueden marcar directamente con yodo, indio, itrio radioactivo u otra partícula radioactiva conocida en la técnica (por ejemplo, US 5 595 721). El tratamiento puede consistir en una combinación de tratamiento con anticuerpos conjugados y no conjugados administrados simultánea o posteriormente (por ejemplo, WO00/52031; WO00/52473).

Los anticuerpos de la invención también se pueden incorporar a un soporte sólido. Adicionalmente, los anticuerpos de la invención, o fragmentos de anticuerpo funcionales de estos, se pueden modificar químicamente mediante la conjugación covalente con un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida circulante. Los ejemplos de polímeros, y métodos para unirlos a péptidos, se muestran en los documentos US 4 766 106; US 4 179 337; US 4 495 285 y US 4 609 546. Opcionalmente, los polímeros se pueden seleccionar entre polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG). PEG es soluble en agua a temperatura ambiente y tienen la fórmula general: $\text{R}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n$ O--R donde R puede ser hidrógeno o un grupo protector tal como un grupo alquilo o alcanol. El grupo protector puede tener entre 1 y 8 carbonos. Opcionalmente, el grupo protector es metilo. El símbolo n es un número entero positivo. Opcionalmente, n está comprendido entre 1 y 1000. Opcionalmente, n está comprendido entre 2 y 500.

El PEG puede tener un peso molecular promedio comprendido entre 1000 y 40 000. Como alternativa, el PEG puede tener un peso molecular comprendido entre 2000 y 20 000. En una opción adicional, el PEG puede tener un peso molecular comprendido entre 3000 y 12 000. En una opción, PEG tiene al menos un grupo hidroxilo. Como alternativa, el PEG puede tener un grupo hidroxilo terminal. Opcionalmente, es el grupo hidroxilo terminal el que se activa para reaccionar con un grupo amino libre en el inhibidor. Sin embargo, se entenderá que el tipo y cantidad de grupos reactivos puede variar para conseguir un PEG/anticuerpo conjugado covalentemente de la presente invención.

Los polioles polioxietilados hidrosolubles también son útiles en la presente invención. Estos incluyen sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG) y similares. Opcionalmente, se utiliza POG. Sin

desea ceñirse a ninguna teoría, debido a que el esqueleto de glicerol del glicerol polioxietilado es el mismo esqueleto presente de manera natural en, por ejemplo, animales y seres humanos en los mono-, di- y triglicéridos, esta ramificación no se consideraría necesariamente como un agente extraño en el cuerpo. En algunas opciones, el POG tiene un peso molecular en el mismo intervalo que el PEG. Otro sistema de suministro farmacológico que se puede utilizar para aumentar la semivida circulatoria es el liposoma. Los métodos para preparar sistemas de suministro con liposomas se analizan en Gabizon *et al.* (1982), Cafiso (1981) y Szoka (1980). En la técnica existe constancia de otros sistemas de suministro farmacológicos y estos se describen en, por ejemplo, referenciados en Poznansky *et al.* (1980) y Poznansky (1984).

Los anticuerpos de la invención se pueden proporcionar en forma purificada. Normalmente, el anticuerpo estará presente en una composición que está sustancialmente exenta de otros polipéptidos, por ejemplo, donde menos de un 90% (en peso), habitualmente menos de un 60% y más habitualmente menos de un 50% de la composición está constituida por otros polipéptidos.

Los anticuerpos de la invención pueden ser inmunógenos en hospedadores no humanos (o heterólogos), por ejemplo, en ratones. En particular, los anticuerpos pueden tener un idiotipo que es inmunógeno en hospedadores no humanos pero no en un hospedador humano. Los anticuerpos de la invención para uso en seres humanos incluyen aquellos que no se pueden aislar fácilmente de hospedadores tales como ratones, cabras, conejos, ratas, mamíferos que no son primates, etc. y, por lo general, no se pueden obtener por humanización o a partir de xeno-ratones.

Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgA, IgG, IgM, es decir, una cadena pesada α , γ o μ), pero por lo general serán IgG. Dentro del isotipo IgG, los anticuerpos pueden ser de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los anticuerpos de la invención pueden tener una cadena ligera κ o λ .

Producción de anticuerpos

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden generar mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la metodología general para preparar anticuerpos monoclonales utilizando la tecnología de hibridomas es muy conocida (Kohler, G. y Milstein, C., 1975; Kozbar *et al.* 1983). Opcionalmente, se utiliza el método alternativo de immortalización con EBV descrito en el documento WO2004/076677.

Utilizando el método descrito en el documento WO2004/076677, se pueden transformar linfocitos B que producen anticuerpos de la invención con EBV en presencia de un activador de linfocitos B policlonales. La transformación con EBV es una técnica estándar y se puede adaptar fácilmente para incluir activadores de linfocitos B policlonales.

Opcionalmente, se pueden añadir estimulantes adicionales del crecimiento y diferenciación celulares durante la etapa de transformación para potenciar aún más la eficacia. Estos estimulantes pueden ser citocinas tales como IL-2 e IL-15. En un aspecto, se añade IL-2 durante la etapa de immortalización para mejorar aún más la eficacia de la immortalización, pero su uso no es esencial. Los linfocitos B immortalizados producidos utilizando estos métodos se pueden cultivar a continuación utilizando métodos conocidos en la técnica y aislar a partir de ellos los anticuerpos.

Se pueden cultivar células plasmáticas únicas en placas de cultivo con micropocillos. Los anticuerpos se pueden aislar a partir de cultivos de células plasmáticas únicas. Además, se puede extraer ARN a partir de cultivos de células plasmáticas únicas y se puede realizar PCR de células únicas utilizando métodos conocidos en la técnica. Las regiones de VH y VL de los anticuerpos se pueden amplificar mediante RT-PCR, secuenciar y clonar en un vector de expresión con el que se transfectan a continuación células HEK293T u otras células hospedadoras. La clonación de ácido nucleico en vectores de expresión, la transfección de células hospedadoras, el cultivo de las células hospedadoras transfectadas y el aislamiento del anticuerpo producido se puede realizar utilizando cualesquiera métodos conocidos por el experto en la técnica.

Si se desea, los anticuerpos se pueden purificar posteriormente utilizando filtración, centrifugación y diversos métodos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de afinidad. Las técnicas para la purificación de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, incluidas técnicas para producir anticuerpos de grado farmacéutico, son muy conocidas en la técnica.

Se pueden obtener fragmentos de los anticuerpos de la invención a partir de los anticuerpos mediante métodos que incluyen la digestión con enzimas, tales como pepsina o papaína, y/o mediante la escisión de los enlaces disulfuro mediante reducción química. Como alternativa, los fragmentos de los anticuerpos se pueden obtener clonando y expresando parte de las secuencias de las cadenas ligera o pesada. Los "fragmentos" de anticuerpos pueden incluir fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. La invención también engloba fragmentos Fv monocatenarios (scFv) derivados de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de la invención, por ejemplo, la invención incluye un scFv que comprende las CDR de un anticuerpo de la invención. También se incluyen monómeros y dímeros de la cadena pesada o ligera, anticuerpos de cadena pesada con un dominio único, anticuerpos de cadena ligera con un dominio único, así como también anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, Fv monocatenario en el cual los dominios variables de la cadena pesada y ligera están unidos mediante un conector peptídico.

Los fragmentos de anticuerpo de la invención pueden conferir interacciones monovalentes o multivalentes y se pueden combinar en diversas estructuras tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, se pueden sintetizar moléculas scFv para crear un "triacuerpo" trivalente o un "tetracuerpo" tetravalente. Las moléculas scFv pueden incluir un dominio de la región Fc lo que da como resultado minicuerpos bivalentes. Además, las secuencias de la invención pueden ser un componente de moléculas multiespecíficas en las que las secuencias de la invención tienen como diana los epítomos de la invención y otras regiones de la molécula se unen a otras dianas. Las moléculas ejemplares incluyen, sin carácter limitante, Fab2 biespecífico, Fab3 trispecífico, scFv biespecífico y diacuerpos (Holliger y Hudson, 2005, *Nature Biotechnology* 9: 1126-1136).

Se pueden utilizar técnicas estándar de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar completamente o en parte utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Se pueden utilizar técnicas de mutagénesis dirigida y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según proceda.

Se puede utilizar cualquier sistema de célula hospedadora/vector adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican las moléculas de anticuerpo de la presente invención o fragmentos de este. Se pueden utilizar, en parte, sistemas bacterianos, por ejemplo, *E. coli*, y microbianos de otro tipo para la expresión de fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab y F(ab')₂ y especialmente fragmentos Fv y fragmentos de anticuerpo monocatenarios, por ejemplo, Fv monocatenarios. Se pueden utilizar sistemas de expresión en células hospedadoras eucariotas, por ejemplo, de mamífero, para producir moléculas de anticuerpo más grandes, incluidas moléculas de anticuerpo completas. Las células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen, sin carácter limitante, células CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, de mieloma o hibridoma.

También se divulga un proceso para producir una molécula anticuerpo de acuerdo con la presente invención que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un vector que codifica un ácido nucleico de la presente invención en condiciones adecuadas para dar lugar a la expresión de la proteína a partir del ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.

Para la producción de productos que comprenden las cadenas ligera y pesada, la línea celular se puede transfectar con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de la cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de la cadena pesada. Como alternativa, se puede utilizar un vector único incluyendo el vector secuencias que codifican polipéptidos de la cadena ligera y de la cadena pesada.

Como alternativa, se pueden producir anticuerpos de acuerdo con la invención i) expresando una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula hospedadora y ii) aislar el producto de tipo anticuerpo expresado. Adicionalmente, el método puede incluir iii) purificar el anticuerpo.

Cribado de linfocitos B transformados, células plasmáticas únicas cultivadas y células HEK293T transfectadas

Los linfocitos B transformados y las células plasmáticas únicas cultivadas se pueden cribar para identificar los que producen anticuerpos con la especificidad o función deseada.

La etapa de cribado se puede llevar a cabo mediante cualquier inmunoensayo, por ejemplo, ELISA, mediante tinción de tejidos o células (incluidas las células transfectadas), mediante un ensayo de neutralización o mediante uno de varios métodos diferentes conocidos en la técnica para identificar la especificidad o función deseada. El ensayo se puede seleccionar en función del simple reconocimiento de uno o más antígenos, o se puede seleccionar en función además de una función deseada, por ejemplo, seleccionar anticuerpos neutralizantes en lugar de simplemente anticuerpos que se unen al antígeno, seleccionar anticuerpos que pueden cambiar las características de las células diana, tales como sus cascadas de señalización, su forma, su velocidad de crecimiento, su capacidad de influenciar otras células, su respuesta a la influencia de otras células o de otros reactivos o de un cambio en las condiciones, su estado de diferenciación, etc.

A continuación, se pueden producir clones de linfocitos B transformados individuales a partir del cultivo de linfocitos B transformado positivo. La etapa de clonación para separar clones individuales a partir de la mezcla de células positivas se puede llevar a cabo utilizando dilución limitante, micromanipulación, depósito de célula única mediante clasificación celular u otro método conocido en la técnica.

El ácido nucleico se puede aislar a partir de las células plasmáticas únicas cultivadas, clonar y expresar en células HEK293T u otras células hospedadoras utilizando métodos conocidos en la técnica.

Los clones de linfocitos B inmortalizados o las células HEK293T transfectadas de la invención se pueden utilizar de diversas maneras, por ejemplo, como una fuente de anticuerpos monoclonales, como una fuente de ácido nucleico (ADN o ARNm) que codifica un anticuerpo monoclonal de interés, para investigación, etc.

También se divulga una composición que comprende linfocitos B de memoria inmortalizados o células hospedadoras transfectadas que producen anticuerpos que neutralizan al menos dos subtipos diferentes del virus de la gripe A seleccionados a partir de los subtipos del grupo 1 y del grupo 2.

Epítomos

- 5 Tal como se ha mencionado anteriormente, se pueden utilizar los anticuerpos de la invención para cartografiar los epítomos a los cuales se unen. Los inventores han descubierto que los anticuerpos que neutralizan la infección por el virus de la gripe A se dirigen a los epítomos detectados en HA. Los anticuerpos se pueden dirigir a uno o más epítomos en la región tallo de HA que están conservados entre uno o más subtipos del grupo 1 y el grupo 2 del virus de la gripe A. Los epítomos a los cuales se unen los anticuerpos de la invención pueden ser lineales (continuos) o conformacionales (discontinuos). Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención se unen a una región del polipéptido que comprende las SEQ ID NOs: 37, 38, 39 y 40, tal como se analiza en la presente.

- 15 Los epítomos reconocidos por los anticuerpos de la presente invención pueden tener varios usos. Se pueden utilizar el epítomo y mimótopos de este en forma purificada o sintética para generar respuestas inmunitarias (es decir, como una vacuna o para la producción de anticuerpos para otros usos) o para cribar sueros para detectar anticuerpos que reaccionan inmunológicamente con el epítomo o mimótopos de este. Opcionalmente, se puede utilizar un epítomo o mimótopo de este tipo, o un antígeno que comprende un epítomo o mimótopo como una vacuna para generar una respuesta inmunitaria. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención también se pueden utilizar en un método para monitorizar la calidad de las vacunas. Los anticuerpos se pueden utilizar en particular para comprobar que el antígeno en una vacuna contiene el epítomo inmunógeno correcto en la conformación correcta.

- 20 El epítomo también puede ser útil en el cribado para detectar ligandos que se unen a dicho epítomo. Tales ligandos incluyen sin carácter limitante, anticuerpos; incluidos los de camellos, tiburones y otras especies, fragmentos de anticuerpos, péptidos, productos de la tecnología de presentación en fagos, aptámeros, adnectinas o fragmentos de otras proteínas virales o celulares, y pueden bloquear el epítomo y de esta manera prevenir la infección. Tales ligandos están englobados en el alcance de la invención.

25 Expresión recombinante

También se puede utilizar un clon de linfocitos B inmortalizados o una célula plasmática cultivada de la invención como una fuente de ácido nucleico para la clonación de genes de anticuerpos para la posterior expresión recombinante. La expresión a partir de fuentes recombinantes es más común a efectos farmacéuticos que la expresión a partir de linfocitos B o hibridomas, por ejemplo, por razones de estabilidad, reproducibilidad, facilidad del cultivo, etc.

- 30 Por lo tanto, se divulga un método para preparar una célula recombinante, que comprende las etapas de: (i) obtener uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm de la cadena pesada y/o ligera) a partir del clon de linfocitos B o la célula plasmática única cultivada que codifica el anticuerpo de interés; (ii) insertar el ácido nucleico en un vector de expresión y (iii) transfectar con el vector una célula hospedadora con el fin de permitir la expresión del anticuerpo de interés en esa célula hospedadora.

- 35 De manera similar, se divulga un método para preparar una célula recombinante, que comprende las etapas de: (i) secuenciar ácido(s) nucleico(s) a partir del clon de linfocitos B o la célula plasmática única cultivada que codifica el anticuerpo de interés; y (ii) utilizar la información de la secuencia de la etapa (i) para preparar ácido(s) nucleico(s) para su inserción en una célula hospedadora con el fin de permitir la expresión del anticuerpo de interés en esa célula hospedadora. Se puede manipular el ácido nucleico, aunque no es necesario, entre las etapas (i) y (ii) para introducir sitios de restricción, para cambiar la utilización de codones y/o para optimizar las secuencias reguladoras de la transcripción y/o regulación.

- 45 También se divulga un método para preparar una célula hospedadora transfectada, que comprende la etapa de transfectar una célula hospedadora con uno o más ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de interés, donde los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos que se derivaron de un clon de linfocitos B inmortalizados o una célula plasmática única cultivada de la invención. Por lo tanto, los procedimientos para preparar en primer lugar el(los) ácido(s) nucleico(s) y a continuación utilizarlo(s) para transfectar una célula hospedadora pueden ser realizados en momentos diferentes, por personas diferentes, en lugares diferentes (por ejemplo, en países diferentes).

- Estas células recombinantes de la invención se pueden utilizar a continuación con un propósito de expresión y cultivo. Son particularmente útiles para la expresión de anticuerpos en la producción farmacéutica a gran escala. También se puede utilizar como el principio activo de una composición farmacéutica. Se puede utilizar cualquier técnica de cultivo adecuada incluidos, sin carácter limitante, el cultivo estático, cultivo de botella con rodillos, líquido ascítico, cartucho de biorreactor de tipo de fibra hueca, minifermentador modular, tanque agitado, cultivo con microportador, perfusión con núcleo cerámico, etc.

- 55 Los métodos para obtener y secuenciar genes de inmunoglobulina de linfocitos B o células plasmáticas son muy conocidos en la técnica (por ejemplo, remítase al capítulo 4 de Kuby Immunology, 4.^a edición, 2000).

La célula hospedadora transfectada puede ser una célula eucariota, incluidas células de levadura y animales, especialmente células de mamífero (por ejemplo, células CHO, células NS0, células humanas tales como células PER.C6 (Jones *et al.*, 2003) o HKB-11 (Cho *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2003), células de mieloma (US 5 807 715; US 6 300 104, etc.)), así como también células vegetales. Los hospedadores de expresión preferidos pueden glucosilar al anticuerpo de la invención, especialmente con estructuras de carbohidratos que no son propiamente inmunógenas en seres humanos. Opcionalmente, la célula hospedadora transfectada puede ser capaz de crecer en medio exento de suero. Opcionalmente, la célula hospedadora transfectada puede ser capaz de crecer en un cultivo sin la presencia de productos derivados de animales. La célula hospedadora transfectada también se puede cultivar para obtener una línea celular.

Se divulga un método para preparar una o más moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, genes de la cadena pesada y ligera) que codifican un anticuerpo de interés, que comprende las etapas de: (i) preparar un clon de linfocitos B inmortalizados o cultivar una célula plasmática de acuerdo con la invención; (ii) obtener el clon de linfocitos B o de la célula plasmática única cultivada ácido nucleico que codifica el anticuerpo de interés. También se divulga un método para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de interés, comprendiendo las etapas de: (i) preparar un clon de linfocitos B inmortalizados o cultivar una célula plasmática única de acuerdo con la invención; (ii) secuenciar el ácido nucleico del clon de linfocitos B o de la célula plasmática cultivada que codifica el anticuerpo de interés.

También se divulga un método para preparar molécula(s) de ácido nucleico que codifica(n) un anticuerpo de interés, que comprende las etapas de obtener el ácido nucleico que se obtuvo de un clon de linfocitos B transformados o una célula plasmática cultivada de la invención. Por lo tanto, los procedimientos para obtener en primer lugar el clon de linfocitos B o la célula plasmática cultivada y obtener a continuación ácido(s) nucleico(s) del clon de linfocitos B o la célula plasmática cultivada pueden ser realizados en momentos diferentes, por personas diferentes, en lugares diferentes (por ejemplo, en países diferentes).

También se divulga un método para preparar un anticuerpo (por ejemplo, para uso farmacéutico) que comprende las etapas de: (i) obtener y/o secuenciar uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, genes de la cadena pesada y ligera) del clon de linfocitos B o la célula plasmática cultivada seleccionados que expresan el anticuerpo de interés; (ii) insertar el(los) ácido(s) nucleico(s) en un vector de expresión o utilizar la(s) secuencia(s) de ácido(s) nucleico(s) para preparar un vector de expresión; (iii) transfectar una célula hospedadora que puede expresar el anticuerpo de interés; (iv) cultivar o subcultivar las células hospedadoras transfectadas en condiciones en las que se expresa el anticuerpo de interés; y, opcionalmente, (v) purificar el anticuerpo de interés.

También se divulga un método para preparar un anticuerpo que comprende las etapas de: cultivar o subcultivar una población de células hospedadoras transfectadas en condiciones en las que se expresa el anticuerpo de interés y, opcionalmente, purificar el anticuerpo de interés, donde dicha población de células hospedadoras transfectadas se ha preparado (i) proporcionando ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) un anticuerpo seleccionado de interés que es producido por un clon de linfocitos B o una célula plasmática cultivada preparados tal como se ha descrito anteriormente, (ii) insertar el(los) ácido(s) nucleico(s) en un vector de expresión, (iii) transfectar con el vector una célula hospedadora que puede expresar el anticuerpo de interés y (iv) cultivar o subcultivar la célula hospedadora transfectada que comprende los ácidos nucleicos insertados para producir el anticuerpo de interés. Por lo tanto, los procedimientos para preparar en primer lugar la célula hospedadora recombinante y cultivarla a continuación para expresar el anticuerpo pueden ser realizados en momentos muy diferentes, por personas diferentes, en lugares diferentes (por ejemplo, en países diferentes).

Composiciones farmacéuticas

La invención proporciona una composición farmacéutica que contiene los anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo de la invención y/o ácido nucleico que codifica tales anticuerpos y/o los epítopos reconocidos por los anticuerpos de la invención. Una composición farmacéutica también puede contener un portador farmacéuticamente aceptable para posibilitar la administración. El portador no deberá inducir en sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y no deberá ser tóxico. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas grandes que se metabolizan lentamente tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas virales inactivas.

Se pueden utilizar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. En tales composiciones pueden estar presentes sustancias auxiliares adicionales tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias para tamponar el pH. Tales portadores posibilitan formular las composiciones farmacéuticas que se van a formular como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas y suspensiones para la ingesta por parte del sujeto.

Las formas de administración pueden incluir aquellas formas adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión, por ejemplo, mediante inyección intravenosa rápida o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede adoptar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, la molécula del anticuerpo puede estar en forma seca, para su reconstitución antes del uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Opcionalmente, las composiciones se adaptan para la administración a sujetos humanos.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar mediante cualquier número de vías incluidas, sin carácter limitante, las vías oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea, tópica, subcutánea, intranasal, enteral, sublingual, intravaginal o rectal. También se puede utilizar hipoesprays para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Normalmente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para su solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.

El suministro directo de las composiciones se conseguirá por lo general mediante inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular o se suministrará al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar a una lesión. El tratamiento posológico puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples. Los agentes farmacéuticos con anticuerpos conocidos proporcionan una guía respecto a la frecuencia de administración, por ejemplo, sobre si un agente farmacéutico se debería suministrar a diario, semanalmente, mensualmente, etc. La frecuencia y dosificación también pueden depender de la gravedad de los síntomas.

Las composiciones de la invención se pueden proporcionar en varias formas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para su solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección (por ejemplo, una composición liofilizada como Synagis™ y Herceptin™, para su reconstitución con agua estéril que contiene un conservante). Se puede preparar la composición para la administración tópica, por ejemplo, como una pomada, crema o polvo. Se puede preparar la composición para la administración oral, por ejemplo, como un comprimido o cápsula, como un spray o como un jarabe (opcionalmente con sabores).

Se puede preparar la composición para la administración pulmonar, por ejemplo, como un inhalador, utilizando un polvo fino o un spray. Se puede preparar la composición como un supositorio o un pesario. Se puede preparar la composición para la administración nasal, ocular o en el oído, por ejemplo, como gotas. La composición puede estar en forma de kit, diseñada de manera que se reconstituya una composición combinada justo antes de la administración a un sujeto. Por ejemplo, se puede proporcionar un anticuerpo liofilizado en forma de kit con agua estéril o tampón estéril.

Se comprenderá que el principio activo en la composición será una molécula de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o variantes y derivados de estos. Por tanto, será susceptible de degradarse en el tubo gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición se va a administrar mediante una ruta que utiliza el tubo gastrointestinal, será necesario que la composición contenga agentes que protegen el anticuerpo de la degradación pero que liberan el anticuerpo una vez que ha sido absorbido en el tubo gastrointestinal.

Se puede consultar un análisis exhaustivo de portadores farmacéuticamente aceptables en Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20.^a edición, ISBN: 0683306472.

Las composiciones farmacéuticas de la invención tienen por lo general un pH de entre 5.5 y 8.5, y este puede estar entre 6 y 8 y puede ser de aproximadamente 7. Se puede mantener el pH mediante el uso de un tampón. La composición puede ser estéril y/o exenta de pirógenos. La composición puede ser isotónica respecto a los seres humanos. Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden suministrar en recipientes sellados herméticamente.

Las composiciones farmacéuticas incluirán una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la invención y/o un polipéptido que comprende un epítipo que se une a un anticuerpo de la invención, es decir, una cantidad que es suficiente para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección deseada, o para exhibir un efecto terapéutico detectable. Los efectos terapéuticos también incluirán la reducción de los síntomas físicos. La cantidad eficaz exacta para un sujeto concreto dependerá de su tamaño y salud, la naturaleza y avance de la afección y los agentes terapéuticos o combinación de agentes terapéuticos seleccionados para la administración. La cantidad eficaz para una situación concreta se determina mediante la experimentación habitual y según el criterio del facultativo. A efectos de la presente invención, una dosis eficaz será generalmente de aproximadamente 0.01mg/kg a aproximadamente 50mg/kg, o de aproximadamente 0.05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de las composiciones de la presente invención en el individuo al cual se va a administrar. Los agentes farmacéuticos con anticuerpos conocidos

proporcionan una guía a este respecto, por ejemplo, Herceptin™ se administra mediante infusión intravenosa de una solución de 21 mg/mL, con una dosis de administración inicial de 4 mg/kg de peso corporal y una dosis de mantenimiento semanal de 2 mg/kg de peso corporal; Rituxan™ se administra semanalmente en una dosis de 375 mg/m²; etc.

- 5 Las composiciones pueden incluir más de un (por ejemplo, 2, 3, etc.) anticuerpo de la invención para proporcionar un efecto terapéutico aditivo o sinérgico. Como alternativa, la composición puede comprender uno o más (por ejemplo, 2, 3, etc.) anticuerpos de la invención y uno o más (por ejemplo, 2, 3, etc.) anticuerpos adicionales contra el virus de la gripe A. Por ejemplo, un anticuerpo se puede unir a un epítipo de HA, a la vez que otro se puede unir a un epítipo diferente de HA o a un epítipo de neuraminidasa y/o proteínas matriciales. Además, la administración de anticuerpos de la invención junto con una vacuna de la gripe A o con anticuerpos con especificidades que no son las del virus de la gripe A está comprendida en el alcance de la invención. Los anticuerpos de la invención se pueden administrar combinados/simultáneamente o en momentos independientes con la vacuna de la gripe o con anticuerpos con especificidades que no son las del virus de la gripe A.

- 15 Opcionalmente, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos, donde el primer anticuerpo es un anticuerpo de la invención y el segundo anticuerpo es específico para un epítipo de neuraminidasa, un segundo epítipo de HA y/o un epítipo matricial. Por ejemplo, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos, donde el primer anticuerpo es según el primer aspecto de la invención y el segundo anticuerpo es específico para un epítipo de neuraminidasa, un segundo epítipo de HA (por ejemplo, un epítipo en la cabeza globular de HA, un segundo epítipo en el tallo de HA) y/o un epítipo matricial. El segundo epítipo en el tallo o el epítipo en la cabeza globular de HA del virus de la gripe A puede estar conservado, aunque no es necesario, entre uno o más subtipos del virus de la gripe A.

También se divulga una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos, donde el primer anticuerpo es específico para un epítipo de neuraminidasa, y el segundo anticuerpo es específico para un segundo epítipo de neuraminidasa, un epítipo de HA y/o un epítipo matricial.

- 25 También se divulga una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos, donde el primer anticuerpo es específico para un epítipo matricial, y el segundo anticuerpo es específico para un segundo epítipo matricial, un epítipo de HA y/o neuraminidasa.

Los anticuerpos ejemplares de la invención específicos para una proteína diana del virus de la gripe A incluyen, sin carácter limitante, la variante 1 de FI6 y la variante 2 de FI6.

- 30 Opcionalmente, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la variante 1 del anticuerpo FI6 o un fragmento de unión al antígeno de este y un portador farmacéuticamente aceptable. Como alternativa, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la variante 2 del anticuerpo FI6 o un fragmento de unión al antígeno de este y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 35 Los anticuerpos de la invención se pueden administrar (ya sea combinados o por separado) con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, con compuestos quimioterápicos, con radioterapia, etc. Los compuestos terapéuticos pueden incluir compuestos antivirales tales como Tamiflu™. Una terapia combinada de este tipo proporciona una mejora aditiva o sinérgica en la eficacia terapéutica respecto a los agentes terapéuticos individuales cuando se administran solos. El término "sinergia" se utiliza para describir un efecto combinado de dos o más agentes activos que es superior a la suma de los efectos individuales de cada agente activo respectivo. Por lo tanto, cuando el efecto combinado de dos o más agentes da como resultado una "inhibición sinérgica" de una actividad o proceso, se pretende que la inhibición de la actividad o proceso sea superior a la suma de los efectos inhibidores de cada agente activo respectivo. La expresión "efecto terapéutico sinérgico" se refiere a un efecto terapéutico observado con una combinación de dos o más terapias cuando el efecto terapéutico (según se mide mediante uno cualquiera de varios parámetros) es superior a la suma de los efectos terapéuticos individuales observados con las terapias individuales respectivas.

Se pueden administrar anticuerpos a aquellos sujetos que no han mostrado previamente respuesta al tratamiento para la infección del virus de la gripe A, es decir, que han mostrado ser resistentes a un tratamiento contra la gripe. Tal tratamiento puede incluir tratamiento previo con un agente antiviral. Esto se puede deber, por ejemplo, a la infección con una cepa del virus de la gripe A resistente a antivirales.

- 50 Una composición de la invención puede incluir anticuerpos de la invención, donde los anticuerpos constituyen al menos un 50% en peso (por ejemplo, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más) de la proteína total en la composición. En una composición de este tipo, los anticuerpos están en forma purificada.

También se divulga un método para preparar un agente farmacéutico, que comprende las etapas de: (i) preparar un anticuerpo de la invención; y (ii) mezclar el anticuerpo purificado con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

55

También se divulga un método para preparar un agente farmacéutico que comprende la etapa de mezclar un anticuerpo con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se ha obtenido a partir de un linfocito B transformado o una célula plasmática cultivada de la invención. Por lo tanto, los procedimientos para obtener primero el anticuerpo monoclonal y preparar a continuación el agente farmacéutico pueden ser realizados en momentos muy diferentes, por personas diferentes, en lugares diferentes (por ejemplo, en países diferentes).

Como una alternativa para suministrar anticuerpos o linfocitos B con objetivos terapéuticos, es posible suministrar el ácido nucleico (normalmente ADN) que codifica el anticuerpo monoclonal (o fragmento activo de este) de interés derivado del linfocito B o la célula plasmática cultivada a un sujeto, de modo que el ácido nucleico se pueda expresar en el sujeto *in situ* para proporcionar un efecto terapéutico deseado. En la técnica existe constancia de vectores para el suministro de ácidos nucleicos y terapia génica adecuados.

Las composiciones de la invención pueden ser composiciones inmunógenas y pueden ser composiciones de vacuna que comprenden un antígeno que comprende un epítipo reconocido por un anticuerpo de la invención. Las vacunas pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección).

Las composiciones pueden incluir un agente antimicrobiano, especialmente si se empaqueta en un formato de múltiples dosis. Pueden comprender detergente, por ejemplo, un Tween (polisorbato), tal como Tween 80. Por lo general, los detergentes están presentes con un nivel bajo, por ejemplo, <0.01%. Las composiciones también pueden incluir sales de sodio (por ejemplo, cloruro de sodio) para proporcionar tonicidad. Es típica una concentración de 10 ± 2 mg/mL de NaCl.

Además, las composiciones pueden comprender un alditol (por ejemplo, manitol) o un disacárido (por ejemplo, sacarosa o trehalosa), por ejemplo, en una concentración de 15-30 mg/mL (por ejemplo, 25 mg/mL), especialmente si se van a liofilizar o si incluyen material que se ha reconstituido a partir de material liofilizado. El pH de una composición para la liofilización se puede ajustar hasta aproximadamente 6.1 antes de la liofilización.

Las composiciones de la invención también pueden comprender uno o más agentes inmunorreguladores. Opcionalmente, uno o más de los agentes inmunorreguladores incluyen un adyuvante.

Las composiciones de epítipos de la invención pueden generar tanto una respuesta inmunitaria mediada por células como una respuesta inmunitaria humoral con el fin de enfrentarse de manera eficaz a la infección por el virus de la gripe A. La respuesta inmunitaria puede inducir anticuerpos duraderos (por ejemplo, neutralizantes) y una inmunidad mediada por células que pueden responder rápidamente a la exposición al virus de la gripe A.

Tratamientos y usos médicos

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención o derivados y variantes de estos se pueden utilizar para el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A, para la prevención de la infección por el virus de la gripe A o para el diagnóstico de la infección por el virus de la gripe A.

Los métodos de diagnóstico pueden incluir poner en contacto un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con una muestra. Tales muestras pueden ser muestras de tejido tomadas de, por ejemplo, las fosas nasales, cavidades sinusales, glándulas salivales, pulmón, hígado, páncreas, riñón, oído, ojo, placenta, tubo digestivo, corazón, ovarios, hipófisis, glándulas suprarrenales, tiroides, cerebro o piel. Los métodos de diagnóstico también pueden incluir la detección de un complejo antígeno/anticuerpo.

Por lo tanto, se divulga (i) un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, o variantes y derivados de estos de acuerdo con la invención, (ii) un clon de linfocitos B inmortalizados de acuerdo con la invención, (iii) un epítipo capaz de unirse a un anticuerpo de la invención o (iv) un ligando, preferentemente un anticuerpo, capaz de unirse a un epítipo que se une a un anticuerpo de la invención para su uso en terapia.

También se divulga el uso de (i) un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, o variantes y derivados de estos de acuerdo con la invención, (ii) un clon de linfocitos B inmortalizados de acuerdo con la invención, (iii) un epítipo capaz de unirse a un anticuerpo de la invención o (iv) un ligando, preferentemente un anticuerpo, que se une a un epítipo capaz de unirse a un anticuerpo de la invención, en la producción de un medicamento para la prevención o tratamiento de la infección por el virus de la gripe A.

La invención proporciona una composición de la invención para su uso como medicamento para la prevención o tratamiento de una infección por el virus de la gripe A. Opcionalmente, el sujeto puede ser un ser humano. Una manera de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico conlleva monitorizar los síntomas de la enfermedad después de la administración de la composición de la invención. El tratamiento puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples.

Se puede administrar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, clon de linfocitos B inmortalizados, epítipo o composición de acuerdo con la invención a un sujeto que necesite un tratamiento de este tipo. Un sujeto de este tipo incluye, sin carácter limitante, uno que corre especialmente el riesgo o es susceptible de padecer una infección por el virus de la gripe A incluido, por ejemplo, un sujeto inmunocomprometido. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención también se puede utilizar en la inmunización pasiva o vacunación activa.

También se pueden utilizar anticuerpos y fragmentos de estos tal como se describe en la presente invención en un kit para el diagnóstico de la infección por el virus de la gripe A. Además, se pueden utilizar epítopos capaces de unirse a un anticuerpo de la invención en un kit para monitorizar la eficacia de procedimientos de vacunación detectando la presencia de anticuerpos protectores contra el virus de la gripe A. También se pueden utilizar anticuerpos, fragmento de anticuerpo, o variantes y derivados de estos, tal como se describe en la presente invención, en un kit para monitorizar la fabricación de vacunas con la inmunogenicidad deseada.

También se divulga un método para preparar un agente farmacéutico que comprende la etapa de mezclar un anticuerpo monoclonal con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal que se ha obtenido a partir de una célula hospedadora transfectada de la invención. Por lo tanto, los procedimientos para obtener primero el anticuerpo monoclonal (por ejemplo, expresarlo y/o purificarlo) y mezclarlo a continuación con el(los) portador(es) farmacéutico(s) pueden ser realizados en momentos muy diferentes, por personas diferentes, en lugares diferentes (por ejemplo, en países diferentes).

Comenzando con un linfocito B transformado o una célula plasmática cultivada de la invención, se pueden llevar a cabo diversas etapas de cultivo, subcultivo, clonación, subclonación, secuenciación, preparación del ácido nucleico, etc., para perpetuar el anticuerpo expresado por el linfocito B transformado o la célula plasmática cultivada, con una optimización opcional en cada etapa. Opcionalmente, los métodos anteriores comprenden además técnicas de optimización (por ejemplo, maduración de la afinidad u optimización) aplicadas a los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo. La invención engloba todas las células, ácidos nucleicos, vectores, secuencias, anticuerpos, etc., utilizados y preparados durante tales etapas.

En todos estos métodos, el ácido nucleico utilizado en el hospedador de expresión se puede manipular para insertar, eliminar o modificar ciertas secuencias de ácido nucleico. Los cambios debidos a tal manipulación incluyen, sin carácter limitante, cambios para introducir sitios de restricción, para modificar la utilización de codones, para añadir u optimizar las secuencias reguladoras de la transcripción y/o traducción, etc. También es posible cambiar el ácido nucleico para alterar los aminoácidos codificados. Por ejemplo, puede ser útil introducir una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Tales mutaciones puntuales pueden modificar las funciones efectoras, afinidad de unión al antígeno, modificaciones postraduccionales, inmunogenicidad, etc., pueden introducir aminoácidos para la incorporación de grupos covalentes (por ejemplo, marcas) o pueden introducir etiquetas (por ejemplo, a efectos de purificación). Las mutaciones se pueden introducir en sitios específicos o se pueden introducir al azar, a lo que sigue la selección (por ejemplo, evolución molecular). Por ejemplo, se pueden mutar uno o más ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las regiones CDR, regiones variables de la cadena pesada o regiones variables de la cadena ligera de anticuerpos de la invención, de manera aleatoria o dirigida para introducir diferentes propiedades en los aminoácidos codificados. Tales cambios pueden ser resultado de un proceso iterativo donde se mantienen los cambios iniciales y se introducen nuevos cambios en otras posiciones nucleotídicas. Además, se pueden combinar los cambios conseguidos en etapas independientes. Las diferentes propiedades introducidas en los aminoácidos codificados pueden incluir, sin carácter limitante, una mejora de la afinidad.

General

La expresión “que comprende” engloba “que incluye” así como también “que está constituido por”, por ejemplo, una composición “que comprende” X puede estar constituida exclusivamente por X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

La palabra “sustancialmente” no excluye “completamente”, por ejemplo, una composición que está “sustancialmente exenta” de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando sea necesario, la palabra “sustancialmente” se puede omitir de la definición de la invención.

El término “aproximadamente” en relación a un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

El término “enfermedad”, tal como se utiliza en la presente, se pretende que sea por lo general un sinónimo de los términos “trastorno” y “afección” (como en afección médica), y que se utilice indistintamente con ellos, en el sentido de que todos reflejan una afección anómala del cuerpo humano o animal o de una de sus partes que altera el funcionamiento normal, se manifiesta normalmente por señales y síntomas distintivos y provoca que el ser humano o animal tenga una duración o calidad de vida reducida.

La referencia al “tratamiento” de un sujeto o paciente, tal como se utiliza en la presente, se pretende que incluyan la prevención, profilaxis y terapia. Los términos “sujeto” o “paciente” se utilizan indistintamente en la presente para

referirse a todos los mamíferos incluidos seres humanos. Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, vacas, perros, gatos, caballos, cabras, ovejas, cerdos y conejos. Opcionalmente, el paciente es un ser humano.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos se proporcionan realizaciones ejemplares de la presente invención. Los siguientes ejemplos se presentan únicamente a modo ilustrativo y para ayudar al experto a utilizar la invención. La presente invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier materia divulgada en los siguientes Ejemplos que no está comprendida en el alcance de las reivindicaciones no es parte de la invención y se incluye únicamente a efectos de referencia o comparativos.

10 **Ejemplo 1. Generación y caracterización de anticuerpos de células plasmáticas ampliamente neutralizantes del virus de la gripe A**

Para identificar individuos que pueden producir anticuerpos heterosubtípicos en respuesta a la vacuna de la gripe estacional (que contiene HA H1 y H3), los autores cribaron mediante ELISPOT células plasmáticas circulantes recogidas el día 7 después del refuerzo para determinar su capacidad de secretar anticuerpos que se unen a la vacuna o a una HA H5 no relacionada (A/VN/1203/04). Sorprendentemente, aunque en cuatro de los cinco donantes estudiados no se pudieron detectar células plasmáticas específicas para H5, en un donante el 14% de las células plasmáticas secretoras de IgG produjeron anticuerpos para H5, mientras que un 57% produjeron anticuerpos para la vacuna. Se aislaron células plasmáticas CD138⁺ a partir de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC, por sus siglas en inglés) recogidas 7 días después de la vacunación utilizando microesferas magnéticas, a lo que siguió una clasificación celular utilizando un dispositivo FACSaria. Se sembraron números limitantes de células plasmáticas en placas de cultivo con micropocillos. Los sobrenadantes del cultivo se estudiaron en tres ELISA paralelos utilizando como antígenos HA de H5 o H9 recombinantes y el antígeno irrelevante del toxoide del tétanos. De los 4928 sobrenadantes de cultivo cribados, 12 se unieron a la HA H5 pero no H9, 25 a la HA H9 pero no H5 y 54 tanto a H5 como H9. Algunos de los 54 cultivos con la señal de DO más elevada se sometieron a RT-PCR y se recuperaron dos genes de VH y VL emparejados.

Los genes de VH y VL se clonaron en vectores de expresión y se produjeron anticuerpos recombinantes transfectando células HEK293T. Los dos anticuerpos monoclonales, FI6 y FI28, compartieron la mayoría de los fragmentos génicos V, D y J (IGHV3-30*01, IGHD3-9*01, IGHJ4*02 e IGKV4-1*01), pero difirieron en las regiones N, en el uso de IGKJ y en el patrón de mutaciones somáticas y, por lo tanto, no estuvieron relacionados desde un punto de vista clonal.

Se estudió la especificidad de los anticuerpos recombinantes mediante ELISA utilizando un grupo de HA que pertenecían a diferentes subtipos. Notablemente, FI6 se unió a todos los subtipos de HA de la gripe A estudiados incluidos el grupo 1 (H1, H5 y H9) y el grupo 2 (H3 y H7), a la vez que no se unieron a HA del virus de la gripe B. Por el contrario, FI28 se unió únicamente a tres HA del grupo 1 (H1, H5 y H9).

Tabla 4.

	Unión a HA mediante ELISA (% de anticuerpos de control específicos del subtipo)				
	H1	H3	H5	H7	H9
	A/NC/ 20/99	A/BR/ 10/07	A/VN/ 1203/04	A/NL/ 219/03	A/HK/ 1073/99
FI6	85.9	68.5	73.7	87.9	98.7
FI28	59.4	1.3	46.3	-0.5	87.7

Dada la homología de las secuencias de VH y VL de los dos anticuerpos, se realizaron experimentos de reordenamiento utilizando las cadenas H y L de FI6, FI28 y 7113, un anticuerpo específico de hCMV que utiliza los mismos elementos V, D y J de la cadena H. Aunque la unión a H7 requirió el emparejamiento de las cadenas H y L de FI6, se mantuvo la unión a H5 cuando se reordenaron las cadenas L de FI6 y FI28. Además, también se observó unión a H5 cuando la cadena H de FI6 se emparejó con la cadena L no relacionada de 7113. Por el contrario, no se observó unión a H5 cuando la cadena H homóloga de 7113 se emparejó con la cadena L de FI6. Sin querer ceñirse a ninguna teoría particular, estos resultados sugieren que la contribución principal para la unión a H5 se debe a la cadena H, mientras que la unión a H7 requiere un emparejamiento preciso entre las cadenas H y L de FI6.

Se estudiaron FI6 y FI28 para determinar su capacidad para neutralizar los subtipos de la gripe A del grupo 1 y del grupo 2 utilizando virus pseudotipados (Tabla 5) así como también virus infecciosos (Tabla 6). Notablemente, FI6 neutralizó todos los pseudovirus estudiados, incluidos seis aislados de H5 pertenecientes a los clados divergentes desde un punto de vista antigénico 0, 1, 2.1, 2.2 y 2.3, y dos aislados aviáres de H7. Además, FI6 neutralizó todos los virus infecciosos estudiados, incluidos dos virus H3N2 y cuatro virus H1N1 que abarcan varias décadas, hasta el reciente aislado pandémico de H1N1 A/CA/04/09 (Tabla 6). FI28 neutralizó todos los pseudovirus H5 pero no neutralizó los pseudovirus H7, así como tampoco ninguno de los virus infecciosos estudiados. Los títulos neutralizantes en los pseudovirus fueron más elevados que los títulos en los virus infecciosos.

Tabla 5.

	Neutralización de los pseudotipos-HA (CI90, µg/mL)							
	H5N1						H7N1	
	A/HK/491/97	A/HK/213/03	A/VN/1203/04	A/INDO/5/05	A/WSN/MONG/05	A/AH/1/05	A/ck/IT/13474/99	A/ck/FPV/Ro/34
FI6	0.07	0.02	0.02	0.31	0.03	0.05	1.87	0.09
FI28	0.05	0.33	0.02	0.35	0.04	0.05	>100	>100

Tabla 6.

	Neutralización de virus infecciosos (CI50, µg/mL)					
	H1N1				H3N2	
	A/PR/8/34	A/NC/20/99	A/SI/3/06	A/CA/4/09	A/CA/7/04	A/WI/67/05
FI6	2.2	6.3	8.8	12.5	7.9	12.5
FI28	>100	>100	>100	nd	>100	>100
nd, no determinado						

Ejemplo 2. Sitios de unión antigénicos de FI6 y FI28

Para identificar los sitios antigénicos a los cuales se unen los anticuerpos FI6 y FI28, los autores estudiaron primero su capacidad para inhibir la unión a C179, un anticuerpo monoclonal de ratón que se cartografió respecto a una región conservada de la región del tallo de HA (Y. Okuno, *et al.*, *J Virol* **67**, 2552 (1993)). Tanto FI6 como FI28 inhibieron completamente la unión de C179 a la HA H5 VN/1203/04 recombinante, lo que indica que pueden reconocer un epítipo solapante. Por el contrario, FI6 y FI28 no compitieron con un grupo de anticuerpos específicos para H5 aislados de donantes inmunitarios de H5N1 que reconocen diferentes epítopos en la cadena globular de la HA (C. P. Simmons *et al.*, *PLoS Med* **4**, e178 (2007); S. Khurana *et al.*, *PLoS Med* **6**, e1000049 (2009)). Los intentos de cartografiar el epítipo de FI6 mediante selección de mutantes de escape fracasaron, lo que sugiere que su epítipo no se pudo mutar fácilmente sin comprometer la aptitud viral.

A continuación, los autores realizaron un cartografiado con péptidos utilizando colecciones de péptidos lineales y ciclados de HA A/VN/1194/04 así como también un barrido de la hélice utilizando los sistemas de Pepscan Presto BV (Lelystad, Los Países Bajos). Este análisis identificó una región de unión de FI6 que incluye el péptido de fusión de HA2 FGAIAG (aminoácidos 3-8, de acuerdo con la numeración H3; SEQ ID NO: 37), el péptido de la hélice A de HA2 DGVNTKVN (aminoácidos 46-54; SEQ ID NO: 38), el péptido de la hélice B de HA2 MENERTLDFHDSNVK (aminoácidos 102-116; SEQ ID NO: 39) y el péptido C-terminal de HA1 LVLATGLRNSP (aminoácidos 315-325; SEQ ID NO: 40). La región de unión de FI28 fue diferente de la de FI6 ya que este anticuerpo no reaccionó con el péptido C-terminal de HA1 y el péptido de la hélice B de HA2.

REFERENCIAS

- Okuno *et al.*, (1993) *Journal of Virology* 67: 2552-2558.
- Gerhard *et al.*, (2006) *Emerging Infectious Diseases* 12: 569-574.
- Gioia *et al.*, (2008) *Emerging Infectious Diseases* 14: 121-128.
- 5 US 3 766 162
- US 3 791 932
- US 3 817 837
- US 4 233 402
- US 4 676 980
- 10 US 4 831 175
- US 5 595 721
- WO00/52031
- WO00/52473
- US 4 766 106
- 15 US 4 179 337
- US 4 495 285
- US 4 609 546
- Gabizon *et al.*, (1982) *Cancer Research* 42:4734
- Cafiso (1981) *Biochem Biophys Acta* 649:129
- 20 Szoka (1980) *Ann. Rev. Biophys. Eng.* 9:467
- Poznansky *et al.*, (1980) *Drug Delivery Systems* (R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y.) págs. 253-315
- Poznansky (1984) *Pharm Revs* 36:277
- Kohler, G. y Milstein, C., 1975, *Nature* 256:495-497.
- Kozbar *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4:72.
- 25 WO2004/076677
- Capítulo 4 de Kuby *Immunology* (4.^a edición 2000; ASIN: 0716733315
- Jones *et al.*, *Biotechnol Prog* 2003,19(1):163-8
- Cho *et al.*, *Cytotechnology* 2001,37:23-30
- Cho *et al.*, *Biotechnol Prog* 2003,19:229-32
- 30 US 5 807 715
- US 6 300 104
- Rowe *et al.*, (1999) *J Clin Microbiol* 37(4):937-43.
- Temperton, *et al.*, (2005). *Emerg Infect Dis* 11, 411-416.
- Smirnov *et al.*, (2000). *Arch Virol* 145, 1733-1741.
- 35 Smirnov *et al.*, (1999). *Acta Virol* 43, 237-244.
- Simmons *et al.*, (2007). *PLoS Med* 4, e178.

Traggiai *et al.*, (2004). *Nat Med* 10, 871-875.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 de la cadena pesada que tienen una identidad secuencial de al menos un 75% con las SEQ ID NOS: 1, 2 y 3, respectivamente, y secuencias de CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera que tienen una identidad secuencial de al menos un 75% con las SEQ ID NOS: 4, 5 y 6, respectivamente, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 37, 38, 39 y 40 y donde el anticuerpo neutraliza la infección de un subtipo del grupo 1 y un subtipo del grupo 2 del virus de la gripe A.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, o un fragmento de unión al antígeno de este, donde el subtipo del grupo 1 es H1, H2, H5 o H9; o donde el subtipo del grupo 2 es H3 o H7.
3. El anticuerpo de cualquier reivindicación anterior, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 de la cadena pesada que tienen una identidad secuencial de al menos un 95% con las SEQ ID NOS: 1, 2 y 3, respectivamente, y secuencias de CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera que tienen una identidad secuencial de al menos un 95% con las SEQ ID NOS: 4, 5 y 6, respectivamente.
4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende:
 - (i) una región variable de la cadena pesada que tiene una identidad secuencial de al menos un 95% con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 13 o 33; y
 - (ii) una región variable de la cadena ligera que tiene una identidad secuencial de al menos un 95% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.
5. El anticuerpo de la reivindicación 4, o un fragmento de unión al antígeno de este, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.
6. Una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, que neutraliza la infección de un subtipo del grupo 1 y un subtipo del grupo 2 del virus de la gripe A donde el polinucleótido comprende una secuencia de las a) SEQ ID NOS: 7-12, b) SEQ ID NOS: 15 y 16, o c) SEQ ID NOS 34 y 16.
7. Una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
8. Una célula que expresa el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un fragmento de unión al antígeno de este.
9. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un fragmento de unión al antígeno de este, el ácido nucleico de la reivindicación 6 o 7 o la célula de la reivindicación 8, y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
10. Uso del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un fragmento de unión al antígeno de este, el ácido nucleico de la reivindicación 6 o 7, la célula de la reivindicación 8, o la composición farmacéutica de la reivindicación 9 en la producción de un medicamento para el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A.
11. Uso de un polipéptido inmunógeno aislado o purificado que comprende un epítipo que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 37, 38, 39 y 40, donde el polipéptido inmunógeno se une al anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un fragmento de unión al antígeno de este, en un método *in vitro* de cribado para detectar ligandos capaces de neutralizar la infección por el virus de la gripe A.
12. Uso de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un fragmento de unión al antígeno de este, el ácido nucleico de la reivindicación 6 o 7, la célula de la reivindicación 8, o la composición farmacéutica de la reivindicación 9 en un método *in vitro* de diagnóstico de la infección por el virus de la gripe A.
13. Uso de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un fragmento de unión al antígeno de este, el ácido nucleico de la reivindicación 6 o 7, la célula de la reivindicación 8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 9 en un método *in vitro* de monitorización de la calidad de vacunas contra el virus de la gripe A comprobando que el antígeno de dicha vacuna contiene el epítipo específico en la conformación correcta.

- 5 14. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un fragmento de unión al antígeno de este, el ácido nucleico de la reivindicación 6 o 7, la célula de la reivindicación 8, la composición farmacéutica de la reivindicación 9 o un polipéptido inmunógeno aislado o purificado que comprende un epítipo que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 37, 38, 39 y 40, donde el polipéptido inmunógeno se une al anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un fragmento de unión al antígeno de este, para su uso en el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A.

ES 2 662 519 T3

Lista de números de ID de SEQ

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
1	aa de CDRH1	GFTFSTYA
2	aa de CDRH2	ISYDGNYK
3	aa de CDRH3	AKDSQLRSLLYFEWLSQGYFDP
4	aa de CDRL1	QSVTFNYKNY
5	aa de CDRL2	WAS
6	aa de CDRL3	QQHYRTPPT
7	nuc de CDRH1	ggattcacgttcagtacctatgcc
8	nuc de CDRH2	atctcatac gatggaaattataaa
9	nuc de CDRH3	gcgaaagactcccaactgcgatcactcctctatttgaatgggtatcccagggatatttgacccc
10	nuc de CDRL1	cagagtgtcacctcaactataagaactac
11	nuc de CDRL2	tgggcacat
12	nuc de CDRL3	cagcaacattataggactcctccgacg
13	aa de la cadena pesada	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSTYAMHWVRQAPGRG LEWVAVISYDGNYKYYADSVKGRFSISRDNNSNTHLEMNLTRED TALYYCAKDSQLRSLLYFEWLSQGYFDPWQGGLTVTVTS
14	aa de la cadena ligera	DIQMTQSPDSLAVSLGARATINCKSSQSVTFNYKNYLAWYQQKPG QPPKVLIIYASARESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQHYRTPPTFGQGTKVEIK
15	nuc de la cadena pesada	cagggtgcagctgggtgcagctcgggggagggcgtgggtccagcctgggaggtccctgagactcctctgttag cctctggattcacgttcagtacctatgccatgcactgggtccgtcaggctccaggcagggggctggagtg gtggcagttatctcatacagtgaaattataaatactatgcagactctgtgaaggccgattctccatctccag agacaattccaacagcacgctgcactagaatgaacacccctgagaactgaggacacggccttatattactg tgcgaaagactcccaactgcgatcactcctctatttgaatgggtatcccaggatatttgacccctggggcc agggaaccctgtcacctcacctcag
16	nuc de la cadena ligera	gacatccagatgaccagctcctcagactcctggctgtatctctgggcgcgagggccaccatcaactgcaa gtccagccagagtggtcacctcaactataagaactacttagcttggtaccagcagaaaccaggacagcctcc taaagtgtcattactgggcatctgccgggaatcaggggtccctgaccgattcagtggcagcgggtctg ggacagatttcactcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgtggctgtttattactgtcagcaacattat aggactcctccgacgttcggccaagggaaccaaggtggagatcaaac
17	aa de CDRH1	GFTFSNYG
18	aa de CDRH2	ISYDGSNK
19	aa de CDRH3	AKERPLRLRLRYFDWLSGGANDY
20	aa de CDRL1	QSVLYSSNNKNY
21	aa de CDRL2	WAS
22	aa de CDRL3	QQYYRSPS
23	nuc de CDRH1	ggattcaccttcagtaactatggc
24	nuc de CDRH2	atatcatatgatgatctaataag

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
25	nuc de CDRH3	gcgaaagagagacccttcgcctattacgatattttgactgggtatcgggggggcggaatgactac
26	nuc de CDRL1	cagagtggtttatatacagctccaacaataagaactac
27	nuc de CDRL2	tgggcatct
28	nuc de CDRL3	cagcagtattatagaagtcctgcc
29	aa de la cadena pesada	EVQLVESGGGAVQPGESLKLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGL EWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKDTLYLQMNSLRAED TALFYCAKERPLRLRLRYFDWLSGGANDYWGQGTLVTVSS
30	aa de la cadena ligera	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQKP GQPPKLLIDWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISNLQVEDVAVYY CQQYYRSPSFGQGTKLEIK
31	nuc de la cadena pesada	gagggtgcagctgggtggagctcggggaggcgcggtccagcctggggagtccttgaactctcctgtgca gcctctggattacaccttcagtaactatggcatgcactgggtccgcaggtccaggcaaggagctggagtg gggtggcagtcatacatatgatggatctaataagtactatgcagactccgtgaaggccgattcaccatctcc agagacaattccaaggacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggctctgtttta ctgtgcgaaagagagacccttcgctattacgatattttgactgggtatcggggggggcggaatgactactg gggccagggaacctggtcaccgtctcctcag
32	nuc de la cadena ligera	gacatcgtgatgaccagctcctcagactccctggctgtgtctctgggcgagaggccaccatcaactgcaa gtccagccagagtggtttatatacagctccaacaataagaactacttagcttggtaccagcagaaaccaggaca gcctcctaagtgtctcattgactgggcactctaccgggaatccgggtccctgaccgattcagtgcgacg gggtctgggacagatttcactctcaccatcagcaatctgcaggtgaagatgtggcgtttattactgtcagcag tattatagaagtcctcttggccaggggaccaagctggagatcaaac
33	aa de la cadena pesada	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSTYAMHWVRQAPGRG LEWVAVISYDGNKYKYADSVKGRFSISRDN SNNTLHLEMNTLRTE DTALYYCAKDSQLRSLLYFEWLSQGYFDPWGQGLVTVTS
34	nuc de la cadena pesada	cagggtgcagctgggtggagctcggggaggcgcggtccagcctggggagtccttgaactctcctgtgtag cctctggattcacgttcagtaactatggcatgcactgggtccgcaggtccaggcaaggggctggagtg gtggcagttatctacatgatggaattataaataactatgcagactctgtgaaggccgattcaccatctccag agacaattccaacaacacgctgcactctagaatgaacacctgagaactgaggacacggctttattactg tgcgaaagactccaactgcgatcactctctattttgaatgggtatccagggaatatttgacctggggcc agggaacctgtgtaccgtcaccctcag
35	aa de la cadena pesada	EVQLVESGGGAVQPGESLKLPCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGL EWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKDTLYLQMNSLRAED TALFYCAKERPLRLRLRYFDWLSGGANDYWGQGTLVTVSS
36	nuc de la cadena pesada	gagggtgcagctgggtggagctcggggaggcgcggtccagcctggggagtccttgaactccctgtgca gcctctggattacaccttcagtaactatggcatgcactgggtccgcaggtccaggcaaggagctggagtg gggtggcagtcatacatatgatggatctaataagtactatgcagactccgtgaaggccgattcaccatctcc agagacaattccaaggacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggctctgtttta ctgtgcgaaagagagacccttcgctattacgatattttgactgggtatcggggggggcggaatgactactg gggccagggaacctggtcaccgtctcctcag

ES 2 662 519 T3

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
37	aa	FGAIAG
38	aa	DGVTNKVNS
39	aa	MENERTLDFHDSNVK
40	aa	LVLATGLRNSP