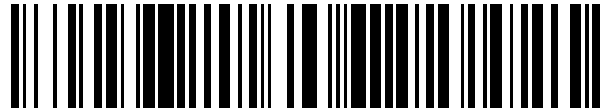


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 625**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2013 PCT/EP2013/054606**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13132007**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2013 E 13708411 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2822968**

54 Título: **Moléculas de unión humanas que pueden unirse a los virus de la influenza B y neutralizarlos, y sus usos**

30 Prioridad:

08.03.2012 US 201261608414 P
08.03.2012 EP 12158525

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.04.2018

73 Titular/es:

JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V.
(100.0%)
Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL

72 Inventor/es:

KWAKS, THEODORUS HENDRIKUS JACOBUS y
VOGELS, RONALD

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 664 625 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

Moléculas de unión humanas que pueden unirse a los virus de la influenza B y neutralizarlos, y sus usos

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se relaciona con la medicina. En particular, la invención se relaciona con moléculas de unión humanas, por ejemplo, con anticuerpos monoclonales o con fragmentos de unión al antígeno de éstos, que pueden unirse a los virus de la influenza B y neutralizarlos. Más precisamente, la invención se relaciona con moléculas de unión neutralizadoras que se unen a virus de la influenza B de los linajes B/Yamagata y/o B/Victoria, de manera tal de neutralizarlos. Además, la invención se relaciona con el diagnóstico, la profilaxis y/o el tratamiento de las infecciones que son provocadas por un virus de la influenza B, particularmente de las infecciones que son provocadas por virus de la influenza B de los linajes B/Yamagata y B/Victoria.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La infección de influenza (que también se conoce como gripe) es una de las enfermedades más comunes entre los seres humanos, y da como resultado entre tres y cinco millones de casos de enfermedades severas y entre 250000 y 500000 muertes por año en todo el mundo. La influenza se dispersa rápidamente a través de epidemias estacionales que afectan al 5-15% de la población, y la carga de los costos sobre los servicios relacionados con el cuidado de la salud y las pérdidas en la productividad son muy importantes (Organización Mundial de la Salud (OMS)). Hay tres tipos de virus de la influenza (A, B y C) que son responsables de las patologías infecciosas en los seres humanos y en los animales. En la actualidad, los virus de los tipos A y B son los agentes responsables de las epidemias y las pandemias de influenza que se observan entre los seres humanos.

20 Los abordajes actuales para combatir las epidemias de influenza anuales incluyen la vacunación anual, con lo que preferiblemente se genera una protección heterotípica transversal. Sin embargo, los diversos virus de la influenza que se encuentran en circulación entre los seres humanos se ven sometidos a cambios antigénicos permanentes, por lo que es necesario reformular anualmente las vacunas contra la influenza para asegurar una correspondencia lo más cercana posible entre las vacunas contra las cepas de influenza y las cepas de influenza en circulación. Como alternativa, las drogas antivirales, tales como el oseltamivir (Tamiflu®) pueden ser eficaces para prevenir y tratar las infecciones de influenza. Sin embargo, la cantidad de cepas de virus de la influenza que presentan resistencia a las drogas antivirales como el oseltamivir se está incrementando.

Un abordaje alternativo es el desarrollo de medios profilácticos o terapéuticos basados en anticuerpos para neutralizar diversos virus de la influenza estacionales.

30 Recientemente, se han descrito anticuerpos que presentan una capacidad de neutralización transversal amplia y que pueden reconocer epitopes en la región conservada del tallo de la proteína HA de los virus de la influenza A del grupo filogenético 1 (como es el caso de los virus de la influenza que comprenden proteínas HA de los subtipos H1 o H5), tales como CR6261 (véase WO2008/028946), así como anticuerpos que presentan una capacidad de neutralización transversal y que pueden reconocer un epítipo altamente conservado en la región del tallo de la proteína HA de los virus de la influenza A del grupo filogenético 2, como es el caso de los virus de la influenza que comprenden proteínas HA de los subtipos H3 o H7, por ejemplo, CR8020 o CR8043 (véase WO 2010/130636, y Ekiert et al., Science 333:843-850, (2011)). Más recientemente, se describieron anticuerpos que pueden unirse a los virus de la influenza A de los grupos filogenéticos 1 y 2 y a los virus de la influenza B, de manera tal de neutralizarlos (por ejemplo, CR9114, que se describe en la solicitud N° EP 11173953.8).

40 Hasta la fecha, se le ha prestado menos atención al virus de la influenza B. Esto puede deberse al hecho de que, particularmente en el contexto de los seres humanos como huéspedes, los virus de la influenza B no se alojan en una gran cantidad de animales que son clave para la aparición de una pandemia de las cepas de la influenza A. Sin embargo, el impacto acumulativo de las epidemias anuales durante los períodos interpandémicos supera el de las pandemias, y aunque, por ejemplo, las tasas de morbilidad y de mortalidad que se le atribuyen a la influenza B son menores que las que caracterizan a los virus H3N2, son más altas que las que caracterizan a los virus H1N1 (Thompson (2003), Thompson (2004)).

50 La evolución de los virus de la influenza B se caracteriza por la circulación concurrente de diversos linajes que difieren desde los puntos de vista antigénico y genético, durante períodos de tiempo prolongados. En la actualidad, se distinguen dos linajes, que están representados por los virus prototípicos B/Victoria/2/87 (el linaje Victoria) y B/Yamagata/16/88 (el linaje Yamagata; Kanegae (1990), Rota (1990)). B/Yamagata fue el linaje más importante que circuló durante la década de 1980, cuando aparecieron los virus del linaje B/Victoria. Desde dicho momento, las variantes producidas por la derivaciones de ambos linajes de la influenza B han circulado simultáneamente en todo el mundo, y ambos linajes han circulado de manera simultánea en las últimas temporadas de la influenza.

55 Debido al hecho de que los virus de la influenza B son la causa más importante de epidemias de influenza estacionales cada 2-4 años, y si se tiene en cuenta la severidad que presentan las afecciones respiratorias que son provocadas por determinados virus de la influenza B, así como el impacto económico que tienen estas epidemias estacionales, puede concluirse que existe la necesidad de medios alternativos y eficaces para prevenir y tratar la

influenza de los subtipos B, lo que puede traducirse en la necesidad de moléculas de unión que puedan neutralizar de manera transversal los virus de la influenza B, que preferiblemente sean moléculas de unión humanas que presenten una capacidad de neutralización amplia.

COMPENDIO DE LA INVENCION

- 5 En la invención se proveen moléculas de unión, que en particular son moléculas de unión humanas, que pueden unirse de manera específica a cepas del virus de la influenza B de los linajes B/Yamagata y B/Victoria, de manera tal de neutralizarlas. Las moléculas de unión no pueden unirse a los virus de la influenza de los subtipos A.

10 La invención también está relacionada con inmunoconjugados y/o composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de unión como las que se han mencionado, así como con moléculas de ácidos nucleicos que codifican al menos la región de unión de diversas moléculas de unión humanas.

Las moléculas de unión, los inmunoconjugados y/o las moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención son apropiados para usarlos como agentes profilácticos, de diagnóstico y/o de tratamiento universales, en el contexto del combate del virus de la influenza B, independientemente del subtipo.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 15 La figura 1 es un mapa esquemático de los epitopes que está basado en experimentos de competición. Los anticuerpos anti-influenza B que se identificaron en el contexto de la presente invención se clasificaron en 4 grupos sobre la base de su capacidad de unirse a la proteína HA del virus de la influenza B o de competir con ella.

20 En la figura 2 se ilustran los resultados de un análisis del ingreso basado en la inmunofluorescencia, cuyo propósito fue analizar la capacidad de las moléculas de unión de bloquear la unión al receptor y el ingreso del virus de la influenza. En **A**, se representa la inhibición del ingreso del virus, que se determinó sobre la base de la lectura de la inmunofluorescencia. En **B**, se representa la infección de las células MDCK por B/Florida/04/2006.

En la figura 3 se ilustra la inhibición de la salida del virus por parte de una molécula de unión de acuerdo con la invención.

25 En la figura 4 se ilustran los resultados del análisis de EM de las células que fueron infectadas por virus de la influenza B.

En la figura 5 se ilustra la protección in vivo que confirió el anticuerpo CR8033 contra una infección letal de virus de la influenza B (B/Florida/04/2006 y B/Malaysia/2506/2004) en ratones.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

A continuación se proveen las definiciones de diversos términos que se emplean en la presente.

- 30 El verbo "incluir" y sus conjugaciones, tal como se los emplea en la presente, hacen referencia a una inclusión no limitativa.

35 Tal como se lo emplea en la presente, el término "molécula de unión" hace referencia a una inmunoglobulina intacta, incluidos anticuerpos monoclonales, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados o humanos, o a un fragmento de una inmunoglobulina, que puede comprender un dominio de unión al antígeno y/o un dominio variable que puede competir con la inmunoglobulina intacta por la unión específica al componente al que se une normalmente dicha inmunoglobulina, por ejemplo, HA. Independientemente de su estructura, el fragmento de unión al antígeno se une al mismo antígeno que es reconocido por la inmunoglobulina intacta. Un fragmento de unión al antígeno puede comprender un péptido o un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que puede abarcar al menos 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200 ó 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de la molécula de unión.

40 El término "molécula de unión", tal como se lo emplea en la presente, abarca todas las clases y las subclases de inmunoglobulinas que son conocidas en la técnica. En función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las moléculas de unión pueden clasificarse en las cinco clases principales de anticuerpos intactos: las IgA, las IgD, las IgE, las IgG y las IgM, y varias de estas también pueden clasificarse en subclases (isotipos), por ejemplo, las IgA1, las IgA2, las IgG1, las IgG2, las IgG3 y las IgG4.

45 Los fragmentos de unión al antígeno incluyen, entre otros, los fragmentos Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, dAb o Fd, los fragmentos de las regiones que están relacionadas con la determinación de la complementariedad (CDR), los anticuerpos de cadena simple (scFv), los anticuerpos de cadena simple bivalentes, los anticuerpos de cadena simple provenientes de fagos, los diacuerpos, los triacuerpos, los tetracuerpos y los (poli)péptidos que comprenden al menos un fragmento de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir a dicho (poli)péptido la capacidad de unirse a los antígenos específicos, etc. Los fragmentos anteriores pueden producirse de manera sintética, a través de la escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas o sobre la base de procedimientos de ingeniería

genética, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de ADN recombinante. Los métodos que pueden emplearse para la producción son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Antibodies: A Laboratory Manual*, editado por E. Harlow y D. Lane (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, que se incorpora en la presente a modo de referencia. Una molécula de unión o un fragmento de unión al antígeno de ésta pueden comprender uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos o diferentes.

La molécula de unión puede ser una molécula de unión desnuda o no conjugada, pero también puede ser parte de un inmunoconjugado. Una molécula de unión desnuda o no conjugada es una molécula de unión que no está conjugada con un grupo efector o con una marca, que no está unida operativamente a ellos y que no está asociada físicamente o funcionalmente a ellos, donde el grupo efector o la marca pueden ser, por ejemplo, una sustancia tóxica, una sustancia radiactiva, un liposoma o una enzima. Ha de comprenderse que las moléculas de unión desnudas o no conjugadas no excluyen las moléculas de unión que se han estabilizado, multimerizado, humanizado o manipulado de alguna otra manera diferente de la unión a un grupo efector o a una marca. Por lo tanto, dentro del alcance de la invención se incluirán todas las moléculas de unión desnudas o no conjugadas que hayan sido sometidas a modificaciones posteriores a la traducción, las cuales podrán efectuarse en el entorno natural de las células en las que se produzcan dichas moléculas de unión, mediante una célula productora de moléculas de unión recombinantes, y ser introducidas por la mano del hombre, una vez elaboradas las moléculas de unión. Evidentemente, el término “molécula de unión desnuda o no conjugada” no excluye la posibilidad de que la molécula de unión forme asociaciones funcionales con las células y/o moléculas efectoras una vez que sea introducida en el cuerpo, debido a que algunas de estas interacciones son imprescindibles para que se produzca un efecto biológico. En este contexto, la falta de un grupo efector o de una marca asociados se aplica a la definición de una molécula de unión desnuda o no conjugada in vitro, pero no in vivo.

Tal como se lo emplea en la presente, el término “muestra biológica” abarca una variedad de tipos de muestras, que abarcan las muestras de sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, las muestras de tejidos sólidos, tales como los especímenes de biopsias o los cultivos de tejido, así como las células que derivan de estas muestras y su progenie. El término también abarca aquellas muestras que han sido manipuladas de cualquier forma después de obtenerlas, por ejemplo, por medio de un tratamiento con reactivos, un procedimiento de solubilización o una técnica para incrementar la proporción de determinados componentes, que pueden ser, por ejemplo, proteínas o polinucleótidos. El término incluye los diversos tipos de muestras clínicas que pueden obtenerse a partir de cualquier especie, y también abarca las células en cultivos, los sobrenadantes de las células y los lisados de células.

El término “regiones de determinación de la complementariedad” (CDR), tal como se lo emplea en la presente, hace referencia a aquellas secuencias que se encuentran en las regiones variables de las moléculas de unión, tales como las inmunoglobulinas, que usualmente tienen una participación importante en la formación del sitio de unión al antígeno, que se caracteriza por una forma y una distribución de cargas que presentan una relación de complementariedad con relación al epítopo reconocido en el antígeno. Las regiones CDR pueden presentar especificidad por epítopos lineales, epítopos discontinuos o epítopos conformacionales de las proteínas o de los fragmentos proteicos, los cuales pueden estar presentes en la proteína en su conformación nativa, o en algunos casos, como es el caso de los epítopos de las proteínas desnaturalizadas, por ejemplo, pueden surgir a través de una solubilización en SDS. Los epítopos también pueden aparecer como resultado de modificaciones posteriores a la traducción en las proteínas.

El término “supresión”, tal como se lo emplea en la presente, hace referencia a un cambio en la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos, que se caracteriza por la ausencia de uno o más residuos de aminoácidos o de uno o más nucleótidos, respectivamente, con relación a la secuencia de referencia, que usualmente es la molécula de origen natural.

El término “secuencia de ácido nucleico reguladora de la expresión”, tal como se lo emplea en la presente, hace referencia a aquellas secuencias de polinucleótidos que son necesarias para que tenga lugar la expresión de las secuencias codificantes que están unidas operativamente a ellas en un organismo huésped particular, y/o a aquellas secuencias que afectan dicha expresión. Las secuencias de ácidos nucleicos que son apropiadas para regular la expresión, entre otras, el sitio de inicio de la transcripción, las secuencias de terminación, el promotor, los potenciadores, las secuencias represoras o activadoras, las señales que son útiles para procesar el ARN de manera eficiente, tales como las señales de escisión o de poliadenilación, las secuencias que son útiles para estabilizar el ARNm citoplasmático, las secuencias que potencian la eficacia de la traducción (por ejemplo, los sitios de unión a los ribosomas), las secuencias que potencian la estabilidad de las proteínas y las secuencias que dan como resultado un incremento en la secreción de las proteínas pueden ser cualquier secuencia de ácido nucleico que presente actividad en el organismo huésped seleccionado, y pueden derivar de genes que codifiquen proteínas homólogos o heterólogos con relación a dicho organismo. La identificación y el uso de las secuencias reguladoras de la expresión han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica.

El término “variante funcional”, tal como se lo emplea en la presente, hace referencia a una molécula de ácido nucleico o una molécula de unión que se caracteriza por una secuencia de nucleótidos y/o de aminoácidos que comprende uno o más nucleótidos y/o aminoácidos alterados, en comparación con las secuencias de nucleótidos y/o

de aminoácidos de las moléculas de ácidos nucleicos o las moléculas de unión de referencia. Una variante funcional de una molécula de unión de acuerdo con la invención puede competir por la unión al componente deseado, es decir, el virus de la influenza, con la molécula de unión de referencia. En otras palabras, las modificaciones en la secuencia de aminoácidos y/o de nucleótidos de la molécula de unión de referencia no afectan o alteran de manera significativa las características de unión de la molécula de unión que está codificada por la secuencia de nucleótidos o que contiene la secuencia de aminoácidos en cuestión, lo que implica que la molécula de unión todavía puede reconocer su objetivo y puede unirse a él. La variante funcional puede comprender modificaciones conservativas en su secuencia, que pueden ser sustituciones, adiciones o supresiones a nivel de los nucleótidos o de los aminoácidos. Estas modificaciones pueden efectuarse de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida a sitios específicos y la mutagénesis al azar mediada por una PCR, y en ellas pueden emplearse nucleótidos o aminoácidos naturales o no naturales.

Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen aquellas donde se reemplaza un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido, que presenta propiedades estructurales o químicas similares. Las familias de residuos de aminoácidos que comprenden cadenas laterales similares ya se han definido en la técnica. Esta familias incluyen los aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, la lisina, la arginina o la histidina), los aminoácidos con cadenas laterales ácidas (por ejemplo, el ácido aspártico o el ácido glutámico), los aminoácidos con cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, la asparragina, la glutamina, la serina, la treonina, la tirosina, la cisteína o el triptofano), los aminoácidos con cadenas laterales no polares (por ejemplo, la glicina, la alanina, la valina, la leucina, la isoleucina, la prolina, la fenilalanina o la metionina), los aminoácidos con cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, la treonina, la valina o la isoleucina) y los aminoácidos con cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, la tirosina, la fenilalanina o el triptofano). Para aquellos versados en la técnica, ha de resultar evidente la posibilidad de usar otras clasificaciones de familias de residuos de aminoácidos que sean diferentes a la que se describió con anterioridad. Adicionalmente, una variante podrá comprender sustituciones de aminoácidos no conservativas, lo que abarcará por ejemplo, el reemplazo de un residuo de aminoácido por otro que presente propiedades estructurales o químicas diferentes. Las variaciones menores similares también pueden incluir supresiones o inserciones de aminoácidos o ambas. Mediante el uso de programas informáticos bien conocidos en la técnica, pueden hallarse parámetros para determinar cuáles residuos de aminoácidos pueden sustituirse, insertarse o suprimirse, sin que se vea afectada la actividad inmunológica.

Una mutación en una secuencia de nucleótidos puede ser una alteración simple en un locus (una mutación puntual), tal como una mutación de transición o de transversión. Como alterativa, pueden insertarse, suprimirse o modificarse múltiples nucleótidos en un único locus. Además, pueden realizarse una o más alteraciones en cualquier cantidad de loci en una secuencia de nucleótidos. Las mutaciones pueden llevarse a cabo de acuerdo con cualquier método apropiado conocido en la técnica.

El término "subtipo del virus de la influenza", aplicado a virus de la influenza A, hace referencia a aquellas variantes del virus de la influenza A que se caracterizan por diversas combinaciones de las proteínas superficiales hemaglutinina (H) y neuramidasa (N). Los subtipos del virus de la influenza A pueden clasificarse con la letra H y un número: por ejemplo, un "virus de la influenza que comprende una proteína HA del subtipo H1 o H3", un "virus de la influenza H1" o un "virus de la influenza H3", o con una combinación de la letra H, la letra N y sendos números, por ejemplo, un "virus de la influenza del subtipo H3N2" o "H3N2". El término "subtipo", aplicado a un virus de la influenza en general, abarca específicamente todos los virus de la influenza que pertenecen a aquellas cepas en cada subtipo que se originan como resultado de mutaciones y que presentan perfiles patogénicos diferentes. Estas cepas también pueden conocerse como varios "aislados" de un subtipo subtipo de virus. Por lo tanto, tal como se los emplea en la presente, los términos "cepas" y "aislados" pueden usarse de manera indistinta.

El término "neutralización", tal como se lo emplea en la presente, con relación a una molécula de unión de acuerdo con la invención, hace referencia a una molécula de unión que inhibe la replicación de un virus de la influenza in vitro y/o en un sujeto, independientemente del mecanismo mediante el que se logra la neutralización. De esta manera, la neutralización puede ser, por ejemplo, el resultado de la inhibición de la fijación o la adhesión del virus a la superficie de la célula, de la inhibición de la fusión entre la membrana del virus y la membrana de la célula, que podría ocurrir después de la fijación del virus a la célula diana o de la invasión del egreso del virus de células infectadas y similares.

El término "neutralización transversal", tal como se lo emplea en la presente, particularmente en el contexto de las moléculas de unión de acuerdo con la invención, hace referencia a la capacidad de las moléculas de unión de acuerdo con la invención de neutralizar diversos virus de la influenza B de los linajes B/Yamagata y B/Victoria, lo que puede abarcar diversas cepas de los virus de la influenza B de estos linajes.

El término "huésped", tal como se lo emplea en la presente, hace referencia a una célula o un organismo en el que se ha introducido un vector, que puede ser un vector de clonación o un vector de expresión. El organismo o la célula pueden ser procariontas o eucariotas. Preferiblemente, los huéspedes son células huésped aisladas, por ejemplo, células huésped en cultivo. El término "células huésped" simplemente denota que las células han sido sometidas a una modificación a para que tenga lugar la (sobre)expresión de las moléculas de unión de acuerdo con la invención, y puede aplicarse tanto a las células B en las que originalmente se expresan estas moléculas de unión como a aquellas células que han sido modificadas para sobreexpresar las moléculas de unión por medio de un

procedimiento de inmortalización o de amplificación o potenciación de la expresión, entre otros. Ha de comprenderse que el término “huésped” no solamente hace referencia a la célula o el organismo propiamente dicho, sino también a la progenie de dicha célula o de dicho organismo. Debido a que pueden ocurrir determinadas modificaciones en las generaciones subsiguientes, que pueden deberse a mutaciones o a influencias ambientales, la progenie de hecho
5 puede no ser idéntica a la célula o el organismo progenitor, pero en cualquier caso ha de quedar incluida dentro del alcance del término “huésped”, tal como se lo emplea en la presente.

El término “humanas”, aplicado a las moléculas de unión que se describen en la presente, hace referencia a aquellas moléculas que derivan directamente del ser humano o que están basadas en secuencias de la línea germinal humana. Cuando una molécula de unión derivada de una secuencia humana o basada en ella ha sido sometida a una modificación subsiguiente, todavía se la considera humana, en función de la definición que se provee en esta memoria descriptiva. En otras palabras, el término “humanas”, aplicado a las moléculas de unión, abarca aquellas moléculas de unión que comprenden regiones variables y constantes que derivan de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana o que se basan en regiones variables o constantes que existen en los seres humanos o en los linfocitos humanos y que han sido modificadas de alguna manera. Por lo tanto, las moléculas de unión humanas podrán incluir secuencias de aminoácidos que no estén codificadas por las secuencias que codifican las inmunoglobulinas de la línea germinal humana, que comprenden sustituciones y/o supresiones (por ejemplo, mutaciones introducidas por medio de una mutagénesis al azar o en un sitio específico in vitro o a través de una mutación somática in vivo). El término “basada”, tal como se lo emplea en la presente, hace referencia a una secuencia de ácido nucleico que puede ser una copia exacta de un molde o que puede comprender mutaciones menores, las cuales pueden efectuarse de acuerdo con métodos de PCR con una susceptibilidad elevada a errores, o sintéticamente haciendo un copia exacta del molde o con modificaciones menores.
10
15
20

El término “inserción”, que es sinónimo del término “adición”, hace referencia a un cambio en una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que da como resultado la adición de uno o más residuos de aminoácidos o de nucleótidos, respectivamente, en comparación con la secuencia original.

El término “aislada”, aplicado a una molécula de unión como las que se definen en la presente, hace referencia a una molécula de unión que está sustancialmente libre de otras proteínas o de otros polipéptidos, y que en particular está libre de otras moléculas de unión que presentan especificidades antigénicas diferentes, y que también está sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o químicos. A modo de ejemplo, cuando las moléculas de unión se produzcan de manera recombinante, preferiblemente estarán sustancialmente libres de los componentes del medio de cultivo, y cuando las moléculas de unión se produzcan por medio de una síntesis química, preferiblemente estarán sustancialmente libres de los precursores u otras sustancias químicas, es decir, están separadas de los precursores químicos u otras sustancias químicas que participan en la síntesis de la proteína. El término “aislada”, aplicado a una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de unión como las que se definen en la presente, hace referencia a una molécula de ácido nucleico donde las secuencias de nucleótidos que codifican las moléculas de unión están libres de otras secuencias de nucleótidos, y en particular están libres de aquellas secuencias de nucleótidos que codifican moléculas de unión que se unen a componentes diferentes. Más aun, el término “aislada” se aplica a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente separada de los otros componentes celulares que la acompañan en su ámbito natural, en su huésped original, lo que abarca, por ejemplo, los ribosomas, las polimerasas y las secuencias genómicas a las que suele estar asociada. En este contexto, las moléculas de ácidos nucleicos “aisladas”, que pueden ser moléculas de ADNc, pueden estar sustancialmente libres de otros materiales celulares y de otros medios de cultivo cuando se las elabora mediante el uso de técnicas recombinantes, o bien pueden estar sustancialmente libres de precursores o de otras sustancias químicas cuando se las sintetiza por medios químicos.
25
30
35
40

El término “anticuerpo monoclonal”, tal como se lo emplea en la presente, hace referencia a una preparación que comprende moléculas de anticuerpos que presentan una especificidad determinada. Un anticuerpo monoclonal presenta una especificidad de unión y una afinidad únicas por un epítopo particular. En este contexto, el término “anticuerpo monoclonal humano” hace referencia a un anticuerpo que presenta una especificidad de unión única, que comprende regiones variables y constantes que derivan de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana, que se basan en ellas o que derivan de secuencias completamente sintéticas. El método con el que se elabora el anticuerpo monoclonal no es de relevancia para la especificidad de unión.
45
50

El término “natural”, tal como se lo emplea en la presente, aplicado a un objeto o a un compuesto, hace referencia al hecho de que dicho objeto o dicho compuesto pueden hallarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo que puede aislarse de una fuente determinada en la naturaleza y que no ha sido modificada de manera intencional por el hombre en el laboratorio es de origen natural.
55

El término “secuencia de ácidos nucleicos”, tal como se lo emplea en la presente, hace referencia a una forma polimérica de nucleótidos, que abarca las cadenas en el sentido del marco de lectura y las cadenas antisentido del ARN, del ADNc y del ADN genómico, así como sus formas sintéticas y sus formas poliméricas combinadas. El término “nucleótido” hace referencia a un ribonucleótido, a un desoxinucleótido o a una forma modificada de un nucleótido de cualquier tipo. El término también incluye el ADN de cadena simple y el ADN de cadena doble.
60

Además, un polinucleótido puede comprender nucleótidos de cualquiera de los tipos mencionados, que pueden ser de origen natural o pueden estar modificados, y que pueden estar unidos a través de enlaces de origen natural o no naturales. Aquellos versados en la técnica han de apreciar que las moléculas de ácidos nucleicos pueden someterse a modificaciones químicas o bioquímicas o pueden combinarse con bases nucleotídicas no naturales o modificadas.

5 Estas modificaciones incluyen, por ejemplo, las marcas, las metilaciones, las sustituciones de uno o más nucleótidos de origen natural por nucleótidos análogos, las modificaciones internucleotídicas, tales como las uniones sin carga (por ejemplo, los metilfosfonatos, los fosfotriésteres, los fosforamidatos o los carbamatos, entre otros), las uniones cargadas (por ejemplo, los fosforotioatos o los fosforoditioatos, entre otros), la introducción de grupos adyacentes (por ejemplo, los polipéptidos), la introducción de grupos intercalados (por ejemplo, la acridina o el psoraleno, entre otros), la introducción de quelantes, la introducción de agentes alquilantes o la introducción de uniones modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos). El término anterior también abarca cualquier conformación topológica, tales como las conformaciones de cadena simple, de cadena doble, de duplas parciales, de cadena triple, de horquillas, circulares o en forma de candado. Dentro del alcance de la invención también se incluyen las moléculas sintéticas que presentan una capacidad similar a la de los polinucleótidos en el contexto de la unión a las secuencias deseadas, que puede tener lugar a través de puentes de hidrógeno o de otras interacciones químicas. Estas moléculas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellas donde las uniones peptídicas en el esqueleto han sido sustituidas por enlaces de fosfato. Una referencia a una secuencia de ácido nucleico abarca su complemento, a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, ha de comprenderse que una referencia a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia particular también abarca la cadena complementaria, con su secuencia complementaria. La cadena complementaria también puede ser útil, por ejemplo, en una terapia antisentido, como sonda de hibridación o como un cebador para una PCR.

El término “unidos operativamente” se aplica a dos o más elementos de una secuencia de ácido nucleico que usualmente están unidos físicamente y que presentan una relación mutuamente funcional. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor puede iniciar o regular la transcripción o la expresión de la secuencia codificante, en cuyo caso se dice que la secuencia codificante se encuentra “bajo el control” del promotor.

El término “excipiente farmacéuticamente aceptable” hace referencia a cualquier sustancia inerte que ha sido combinada con una molécula activa, tal como una droga, un agente o una molécula de unión, para obtener una forma de dosificación satisfactoria o conveniente. Un “excipiente farmacéuticamente aceptable” es un excipiente que no es tóxico para los sujetos que lo reciben, en las dosificaciones y las concentraciones en las que se lo emplea, y que es compatible con los otros ingredientes de la formulación que comprende la droga, el agente o la molécula de unión. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son de uso habitual y han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica.

El término “unión específica”, tal como se lo emplea en la presente, en referencia a la interacción entre una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo, y el componente con el que ocurre la unión, que puede ser un antígeno, denota que la interacción depende de la presencia de una estructura particular, por ejemplo, un determinante antigénico o un epitope, en el componente con el que tiene lugar la unión. En otras palabras, el anticuerpo puede unirse al componente en cuestión o puede reconocerlo de manera específica, incluso cuando éste está presente en una mezcla que comprende otras moléculas u otros organismos. La unión puede estar mediada por interacciones covalentes o no covalentes, o bien por una combinación de ambas. En otras palabras, el término “unión específica” hace referencia a la presencia de una unión inmuno-específica a un determinante antigénico o a un epitope y a la ausencia de una unión no inmuno-específica a otros determinantes antigénicos o epitopes. Una molécula de unión que se une de manera inmuno-específica a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con una afinidad menor, lo cual puede determinarse, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), un análisis BIACORE u otros análisis conocidos en la técnica. Las moléculas de unión o los fragmentos de éstas que pueden unirse de manera inmuno-específica a un antígeno pueden reaccionar de manera transversal con aquellos antígenos relacionados que comprenden los mismos epitopes. Preferiblemente, las moléculas de unión o los fragmentos de éstas que pueden unirse de manera inmuno-específica a un antígeno no presentan una reacción transversal con otros antígenos.

El término “sustitución”, tal como se lo emplea en la presente, hace referencia al reemplazo de uno o más aminoácidos o uno o más nucleótidos por aminoácidos o nucleótidos diferentes, respectivamente.

El término “cantidad eficaz para el uso terapéutico” hace referencia a una cantidad de una molécula de unión como las que se definen en la presente que es eficaz para prevenir, mejorar y/o tratar un estado que es el resultado de la infección de un virus de la influenza del tipo B. El término “mejora”, tal como se lo emplea en la presente, puede hacer referencia a la reducción de los síntomas visibles o perceptibles de la enfermedad, de la viremia o de cualquier otra manifestación mensurable de una infección de influenza.

El término “tratamiento” hace referencia tanto a un tratamiento terapéutico como a un tratamiento profiláctico o preventivo, que puede ser útil para curar una enfermedad, o bien para detener o como mínimo demorar su progreso. Los individuos que necesitan dicho tratamiento son aquellos que necesitan presentar una afección como resultado de una infección de un virus de la influenza, o bien pueden ser individuos en los que se desea prevenir la ocurrencia

de una infección de un virus de la influenza. Los sujetos que se han recuperado parcialmente o totalmente de una infección de un virus de la influenza también pueden necesitar un tratamiento. La prevención abarca la inhibición o la reducción de la dispersión del virus de la influenza, así como la inhibición o la demora del inicio, el desarrollo o el progreso de uno o más de los síntomas asociados a la infección del virus de la influenza.

5 El término "vector" hace referencia a una molécula de ácido nucleico en la cual puede insertarse una segunda molécula de ácido nucleico, que puede introducirse, replicarse y eventualmente expresarse en el huésped deseado. En otras palabras, un vector es útil para transportar la molécula de ácido nucleico que se ha introducido en él. El término "vector", tal como se lo emplea en la presente, abarca los vectores de clonación y los vectores de expresión. Los vectores pueden ser, sin limitaciones, plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales de bacterias (BAC),
10 cromosomas artificiales de levadura (YAC) o vectores que derivan de bacteriófagos o de virus que atacan a los vegetales o a los animales (lo que abarca los seres humanos). Los vectores comprenden un origen de replicación reconocido por el huésped deseado, y en el caso de los vectores de expresión, comprenden promotores y otras regiones reguladoras reconocidas por el huésped. Un vector que comprende una segunda molécula de ácido nucleico se introduce en una célula por medio de un procedimiento de transformación o de transfección, o bien
15 mediante el uso de mecanismos de ingreso de virus. Determinados vectores pueden replicarse de manera autónoma en el huésped donde se los introduce (por ejemplo, los vectores que comprenden un origen de replicación apropiado para las bacterias pueden replicarse en ellas). Otros vectores, una vez introducidos en el huésped, pueden integrarse en el genoma, por lo que pueden replicarse junto con el genoma del huésped.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

20 En un primer aspecto, en la presente invención se proveen moléculas de unión que pueden unirse de manera específica a la hemaglutinina (HA) de las cepas del virus de la influenza B de los linajes B/Yamagata y B/Victoria y que puede neutralizar dichas cepas del virus de la influenza B de los linajes B/Yamagata y B/Victoria, como se define en las reivindicaciones. De acuerdo con la invención, las moléculas de unión no pueden unirse a la HA de los virus de la influenza A. Las moléculas de unión pueden neutralizar los virus de la influenza B tanto in vitro como in vivo.
25

Preferiblemente, las moléculas de unión son moléculas de unión humanas. En una forma de realización preferida, las moléculas de unión son anticuerpos humanos o fragmentos de unión al antígeno de éstos.

Las moléculas de unión se unen a un epítopo que es diferente del epítopo de CR9114 (que se describe en la solicitud co-pendiente EP11173953.8), que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una
30 secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 116 y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 117. Se ha demostrado que CR9114 puede unirse in vivo a los virus de la influenza A de los grupos filogenéticos 1 y 2, así como a los virus de la influenza B, de manera tal de neutralizarlos.

En determinadas formas de realización, las moléculas de unión se unen a la región principal de la proteína HA de los virus de la influenza B, particularmente a la región principal de la proteína HA1 de los virus de la influenza B.
35

En determinadas formas de realización, las moléculas de unión bloquean la salida de las células infectadas de los virus de la influenza B, particularmente de los virus de la influenza B de las cepas de los linajes B/Victoria y B/Yamagata.

En la divulgación se proveen moléculas de unión que pueden unirse de manera específica a la proteína hemaglutinina (HA) y que pueden neutralizar las cepas del virus de la influenza B del linaje B/Victoria, particularmente la cepa del virus de la influenza B B/Malaysia/2506/2004, cuando el aminoácido en la posición 168
40 de la particularmente de la cepa del virus de la influenza B B/Malaysia/2506/2004, es prolina (P), y que no pueden neutralizar las cepas del virus de la influenza B del linaje B/Victoria, particularmente la cepa B/Malaysia/2506/2004, cuando el aminoácido en la posición 168 de la HA del virus de la influenza B, particularmente de la cepa B/Malaysia/2506/2004, es glutamina (Q).
45

En determinadas formas de realización, en la divulgación se proveen moléculas de unión que pueden unirse de manera específica a la proteína hemaglutinina (HA) y que pueden neutralizar las cepas del virus de la influenza B del linaje B/Yamagata, particularmente la cepa del virus de la influenza B B/Florida/04/2006, cuando el aminoácido en la posición 38 de la HA del virus de la influenza B, particularmente de la cepa del virus de la influenza B B/Florida/04/200, es lisina (K), y que también pueden neutralizar las cepas del virus de la influenza B del linaje B/Yamagata, particularmente la cepa B/Florida/04/2006, cuando el aminoácido en la posición 38 de la HA del virus de la influenza B, particularmente de la cepa B/Florida/04/2006, es ácido glutámico (E).
50

En la invención se proveen moléculas de unión que pueden unirse de manera específica a la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de la influenza B y que pueden neutralizar las cepas del virus de la influenza B de los linajes B/Victoria/2/87 y B/Yamagata/16/88, pero que no pueden unirse a la proteína HA de los virus de la influenza de los subtipos A, donde las moléculas de unión comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende una
55

secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 75 o una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos aproximadamente 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con ella.

5 En determinadas formas de realización, las moléculas de unión comprenden una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 77 o una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos aproximadamente 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con ella.

10 En determinadas formas de realización, las moléculas de unión comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 75 y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 77.

En determinadas formas de realización, la molécula de unión comprende una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 78 y una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 79.

15 En determinadas formas de realización, en la invención se proveen moléculas de unión que pueden unirse de manera específica a la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de la influenza B y que pueden neutralizar las cepas del virus de la influenza B de los linajes B/Victoria/2/87 y B/Yamagata/16/88, pero que no pueden unirse a la proteína HA de los virus de la influenza de los subtipos A, donde las moléculas de unión comprenden una CDR1 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 7, una CDR2 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 8 y una CDR3 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 9.

20 En determinadas formas de realización, las moléculas de unión comprenden una CDR1 de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 10, una CDR2 de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 11 y una CDR3 de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 12 o 13.

25 En determinadas formas de realización, la molécula de unión comprende una CDR1 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 7, una CDR2 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 8 y una CDR3 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 9, así como una CDR1 de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 10, una CDR2 de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 11 y una CDR3 de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 12.

35 En determinadas formas de realización, la molécula de unión comprende una CDR1 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 7, una CDR2 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 8 y una CDR3 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 9, así como una CDR1 de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 10, una CDR2 de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 11 y una CDR3 de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 13.

40 En la divulgación también se proveen moléculas de unión que pueden unirse de manera inmuno-específica al mismo epítopo de una proteína HA de un virus de la influenza B que otra molécula de unión que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 75 y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 77.

45 En la divulgación se proveen moléculas de unión que pueden unirse de manera específica a la proteína hemaglutinina (HA) y que pueden neutralizar las cepas del virus de la influenza B del linaje B/Victoria, particularmente la cepa del virus de la influenza B B/Malaysia/2506/2004, cuando el aminoácido en la posición 168 de la HA del virus de la influenza B, particularmente de la cepa del virus de la influenza B B/Malaysia/2506/2004, es prolina (P), y que también pueden neutralizar las cepas del virus de la influenza B del linaje B/Victoria, particularmente la cepa B/Malaysia/2506/2004, cuando el aminoácido en la posición 168 de la HA del virus de la influenza B, particularmente de la cepa B/Malaysia/2506/2004, es glutamina (Q).

50 En la divulgación se proveen moléculas de unión que pueden unirse de manera específica a la proteína hemaglutinina (HA) y que pueden neutralizar las cepas del virus de la influenza B del linaje B/Yamagata, particularmente la cepa del virus de la influenza B B/Florida/04/2006, cuando el aminoácido en la posición 38 de la HA del virus de la influenza B, particularmente de la cepa del virus de la influenza B B/Florida/04/200, es lisina (K), y

que no pueden neutralizar las cepas del virus de la influenza B del linaje B/Yamagata, particularmente la cepa B/Florida/04/2006, cuando el aminoácido en la posición 38 de la HA del virus de la influenza B, particularmente de la cepa B/Florida/04/2006, es ácido glutámico (E).

5 Los virus de la influenza del tipo B, al igual que los virus de la influenza del tipo A, infectan las células al unirse a los
residuos de ácido siálico en su superficie celular de células blanco, después de lo cual son transferidos al interior de
los endosomas, para lo cual su membrana se fusiona con las membranas endosómicas. Posteriormente, se libera un
complejo que comprende el genoma y la transcriptasa en el interior de las células. Los procesos a través de los
10 cuales ocurre la unión al receptor y la fusión de las membranas son mediados por la glucoproteína HA. La HA de los
virus de la influenza A y B comprende dos regiones que son diferentes desde el punto de vista estructural: una
región globular, que puede conocerse como la cabeza, que contiene un sitio que se une al receptor, que es
responsable de la unión del virus a la célula blanco y que está relacionada con la actividad de hemaglutinación de la
HA, y una región del tallo, que contiene un péptido de fusión que es imprescindible para que tenga lugar la fusión
entre la membrana que recubre el virus y la membrana endosómica de la célula. La proteína HA es un trímero, y
15 cada uno de cuyos monómeros consiste en dos glucopolipéptidos que están conectados a través de un enlace
disulfuro, HA1 y HA2, que se producen durante la infección, a través de la escisión proteolítica de un precursor
(HA0). La escisión es necesaria para la infectividad del virus, ya que es imprescindible para sensibilizar la HA en una
medida suficiente para que ocurra la fusión de las membranas, con lo que se posibilita el cambio conformacional. La
activación de la molécula sensibilizada tiene lugar en los endosomas, a un pH bajo, de entre 5 y 6, y para que ocurra,
son necesarios cambios importantes en la estructura de la HA.

20 En determinadas formas de realización, las moléculas de unión pueden unirse de manera específica a la subunidad
HA1 de la proteína HA, particularmente a la región principal de la subunidad HA1. Las moléculas de unión pueden
unirse de manera específica a epitopes conformacionales lineales y/o estructurales en la subunidad HA1 de la
proteína HA. La molécula de la HA puede purificarse a partir de los virus, o bien puede producirse de manera
recombinante, y opcionalmente puede aislarse antes de usarla. Como alternativa, la HA puede expresarse en la
25 superficie de las células.

A modo de ejemplo, las moléculas de unión de acuerdo con la invención pueden unirse de manera específica a los
virus de la influenza del tipo B que son viables, que están vivos, que son infecciosos o que se encuentran en formas
inactivadas o atenuadas. Los métodos para inactivar/atenuar los virus, por ejemplo, los virus de la influenza, son
bien conocidos en la técnica y abarcan, sin limitaciones, el tratamiento con formalina, con β -propiolactona (BPL), con
30 mertiolate y/o con luz ultravioleta.

Las moléculas de unión de acuerdo con la invención también podrán unirse de manera específica a uno o más
fragmentos de los virus de la influenza B, por ejemplo y sin limitaciones, a una o más proteínas o uno o más
(poli)péptidos que deriven de los virus de la influenza B de diversos subtipos, o bien a una o más proteínas o uno
o más polipéptidos del virus de la influenza B que hayan sido producidos por medios recombinantes. Las secuencias
35 de aminoácidos de las proteínas de los virus de la influenza B de diversas cepas y/o las secuencias de nucleótidos
que las codifican pueden hallarse en la base de datos GenBank, en la base de datos de secuencias del virus de la
influenza del NCBI, en la base de datos de secuencias de la influenza (ISD), en la base de datos EMBL y/o en otras
bases de datos. Aquellos versados en la técnica han de poder hallar las secuencias deseadas en las bases de datos
que se han mencionado.

40 En otra forma de realización, las moléculas de unión de acuerdo con la invención pueden unirse de manera
específica a un fragmento de las proteínas y/o los polipéptidos que se mencionaron con anterioridad, donde el
fragmento comprende al menos un epitope que puede ser reconocido por las moléculas de unión de acuerdo con la
invención. El término "epitope", tal como se lo emplea en la presente, hace referencia a una unidad que puede unirse
a una molécula de unión de acuerdo con la invención, con una afinidad suficientemente alta para formar un complejo
45 detectable que comprende el antígeno y la molécula de unión.

Las moléculas de unión de acuerdo con la invención pueden ser moléculas de inmunoglobulina intactas, por
ejemplo, pueden ser anticuerpos monoclonales, o bien pueden ser fragmentos de unión al antígeno de éstas, lo que
abarca, sin limitaciones, los fragmentos de las regiones variables de las cadenas pesadas o livianas Fab, F(ab'),
F(ab')₂, Fv, Fd, los fragmentos de las regiones que están relacionadas con la determinación de la
50 complementariedad (CDR), los anticuerpos de cadena simple (scFv), los anticuerpos de cadena simple bivalentes,
los anticuerpos de cadena simple provenientes de fagos, los diacuerpos, los triacuerpos, los tetracuerpos y los
(poli)péptidos que comprenden al menos un fragmento de una inmunoglobulina que es suficiente para conferirles la
capacidad de unirse a antígenos específicos de virus de influenza de determinadas cepas. En una forma de
realización preferida, las moléculas de unión de acuerdo con la invención son anticuerpos monoclonales humanos
55 y/o fragmentos de unión al antígeno de éstos. Las moléculas de unión también pueden ser nanocuerpos,
alfacuerpos, aficuerpos, andamiajes de dominios FN3, otros andamiajes basados en dominios repetidos de
proteínas (humanas), lo que abarca las adnectinas, las anticalinas y las darpinas, entre otros, u otros andamiajes
que comprenden secuencias que pueden unirse a los epitopes.

En determinadas formas de realización, las moléculas de unión son anticuerpos intactos, que comprenden tanto las regiones variables como las regiones constantes de las cadenas pesadas y livianas.

En determinadas formas de realización, las moléculas de unión presentan una actividad citotóxica que depende del complemento y/o una actividad citotóxica que es mediada por células y que depende de un anticuerpo (ADCC).

5 Las moléculas de unión de acuerdo con la invención pueden usarse en formas aisladas o no aisladas. Por otro lado, las moléculas de unión de acuerdo con la invención pueden usarse solas o en mezclas que comprenden al menos una molécula de unión de acuerdo con la invención (o una variante o un fragmento de ésta) y una o más moléculas de unión diferentes, que pueden unirse al virus de la influenza con el propósito de inhibirlo. En otras palabras, las moléculas de unión pueden emplearse en formas combinadas, por ejemplo, en forma de composiciones farmacéuticas que comprenden dos o más moléculas de unión o variantes o fragmentos de éstas. A modo de ejemplo, es posible combinar moléculas de unión que presentan actividades diferentes pero complementarias en una única terapia, de manera tal de obtener el efecto profiláctico, terapéutico o de diagnóstico deseado. Como alternativa, pueden combinarse moléculas de unión que presentan actividades idénticas en una única terapia, también de manera tal de obtener el efecto profiláctico, terapéutico o de diagnóstico deseado. Opcionalmente, la mezcla también puede comprender al menos una molécula de unión de acuerdo con la invención y al menos un agente terapéutico adicional. Preferiblemente, el agente terapéutico, que puede ser, por ejemplo, un inhibidor de M2 (tal como la amantadina o la rimantadina) y/o un inhibidor de la neuraminidasa (tal como el zanamivir o el oseltamivir), es útil en la profilaxis y/o el tratamiento de una infección provocada por un virus de la influenza.

20 Típicamente, una molécula de unión de acuerdo con la invención puede unirse al componente deseado, es decir, a un virus de la influenza B de los linajes B/Yamagata o B/Victoria y/o a un fragmento de éste, con una afinidad que se caracteriza por una constante (el valor de la K_d) que es inferior a 0.2×10^{-4} M, 1.0×10^{-5} M, 1.0×10^{-6} M o 1.0×10^{-7} M, que preferiblemente es inferior a 1.0×10^{-8} M, que más preferiblemente es inferior a 1.0×10^{-9} M, que aun más preferiblemente es inferior a 1.0×10^{-10} M, que incluso más preferiblemente es inferior a 1.0×10^{-11} M, y que en particular es inferior a 1.0×10^{-12} M. El valor de la constante con la que se caracteriza a la afinidad puede variar con el isotipo del anticuerpo. A modo de ejemplo, la afinidad que caracteriza la unión al isotipo de la IgM puede caracterizarse por una constante con un valor de aproximadamente 1.0×10^{-7} M. La constante con la que se caracteriza a la afinidad puede determinarse, por ejemplo, por medio de una resonancia superficial de plasmón, para lo cual puede usarse el sistema BIACORE (de Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia).

30 Las moléculas de unión de acuerdo con la invención presentan actividad de neutralización. La actividad de neutralización puede determinarse, por ejemplo, tal como se describe en la presente. Se describen otros ensayos con los que puede determinarse la actividad de neutralización, por ejemplo, en WHO Manual on Animal Influenza Diagnostic and Surveillance, Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2005, versión 2002.5.

35 Típicamente, las moléculas de unión de acuerdo con la invención presentan una actividad de neutralización de 50 $\mu\text{g/ml}$ o menos, preferiblemente de 20 $\mu\text{g/ml}$ o menos, más preferiblemente de 10 $\mu\text{g/ml}$ o menos, y aun más preferiblemente de 5 $\mu\text{g/ml}$ o menos, lo cual puede determinarse por medio de un análisis basado en la neutralización de los virus in vitro (VNA), tal como se describe en el ejemplo 6. Las moléculas de unión de acuerdo con la invención pueden unirse a un virus de la influenza o a un fragmento de éste en una forma soluble, por ejemplo, en una muestra o en una suspensión, o pueden unirse a los virus de la influenza o fragmentos de éstos unidos o adosados a un vehículo o a un sustrato, que por ejemplo, puede ser una placa de microtitulación, una membrana o una esfera, entre otros. Los vehículos o los sustratos pueden estar compuestos por vidrio, plástico (por ejemplo, poliestireno), polisacáridos, nylon, nitrocelulosa, teflón u otros materiales. La superficie de los soportes puede ser sólida o porosa y puede tomar cualquier forma conveniente. Además, las moléculas de unión pueden unirse a los virus de la influenza en formas purificadas/aisladas o en formas no purificadas/no aisladas.

45 Tal como se indicó con anterioridad, en determinadas formas de realización de la presente invención, se proveen moléculas de unión humanas que pueden reconocer un epítopo en la proteína hemaglutinina (HA) de los virus de la influenza B y que pueden unirse él, donde dichas moléculas de unión presentan actividad de neutralización sobre los virus de la influenza B de los linajes B/Yamagata y/o B/Victoria, tanto in vitro como in vivo. En el contexto de la invención, se ha demostrado que las moléculas de unión de acuerdo con la presente invención pueden neutralizar de manera transversal un virus de la influenza de subtipos que pertenecen a los dos linajes filogenéticos que se han mencionado. Sobre la base de la descripción que se provee en la presente, aquellos versados en la técnica han de poder determinar si un anticuerpo efectivamente podrá reaccionar de manera transversal con proteínas HA de diversos subtipos, y también han de poder determinar si dichos anticuerpos podrán neutralizar los virus de la influenza de diversos subtipos in vitro y/o in vivo.

55 Otro aspecto de la divulgación está relacionado con las variantes funcionales de las moléculas de unión que se describen en la presente. Se considera que una molécula es una variante funcional de una molécula de unión de acuerdo con la invención si la molécula de unión que constituye la variante puede competir de manera inmunoespecífica por la unión a un virus de la influenza o a un fragmento de éste con la molécula de unión "original" o "de referencia". En otras palabras, se considera que las moléculas son una variante funcional de una molécula de unión de acuerdo con la invención si pueden unirse a un epítopo idéntico o superpuesto en un virus de la influenza o

5 en un fragmento de éste. En la presente solicitud, los términos “original” y “de referencia”, que se emplean como sinónimos, denotan que la información de la molécula de referencia u original o la molécula física propiamente dicha pueden ser la base de la variación. Las variantes funcionales incluyen, sin limitaciones, los derivados que presentan una estructura primordial sustancialmente similar, que incluyen aquellos derivados que presentan modificaciones en
 10 el receptor Fc o en otras regiones relacionadas con las funciones efectoras y/o que comprenden, por ejemplo, modificaciones químicas y/o bioquímicas que se han efectuado in vitro o in vivo, que no se encuentran en la molécula de unión original. Estas modificaciones abarcan, entre otras, la acetilación, la acilación, la unión covalente de un nucleótido o de un derivado de un nucleótido, la unión covalente de un lípido o de un derivado de un lípido, el entrecruzamiento, la formación de un enlace disulfuro, la glucosilación, la hidroxilación, la metilación, la oxidación, la
 15 pegilación, el procesamiento proteolítico, la fosforilación y similares. Como alternativa, las variantes funcionales pueden ser moléculas de unión como las que se definen en la presente, que comprenden secuencias de aminoácidos que presentan sustituciones, inserciones y/o supresiones de uno o más aminoácidos, en comparación con las secuencias de aminoácidos de las moléculas de unión originales. Además, podrá haber variantes funcionales que comprendan cortes en los extremos amino y/o carboxilo de sus secuencias de aminoácidos. Las
 20 variantes funcionales pueden presentar una afinidad de unión idéntica o diferente (superior o inferior) a la de las moléculas de unión originales, pero en cualquier caso pueden unirse a un virus de la influenza o a un fragmento de éste. Por ejemplo, las variantes funcionales podrán presentar una afinidad de unión por un virus de la influenza o por un fragmento de éste que sea superior o inferior a la de las moléculas de unión originales. En algunas formas de realización, pueden modificarse las secuencias de aminoácidos de las regiones variables, que incluyen, sin limitaciones, las regiones del marco y las regiones hipervariables, particularmente las regiones CDR3. En general, las regiones variables de la cadena liviana y de la cadena pesada comprenden tres regiones hipervariables, que abarcan tres CDR, así como regiones más conservadas, que se conocen como las regiones del marco (FR). Las
 25 regiones hipervariables abarcan los residuos de aminoácidos de las CDR y los residuos de aminoácidos de los rizos hipervariables. Las variantes funcionales presentan una identidad y/o una homología de entre al menos aproximadamente 80% y aproximadamente 99%, preferiblemente de entre aproximadamente 70% y aproximadamente 99%, más preferiblemente de entre aproximadamente 80% y aproximadamente 99%, aun más preferiblemente de entre aproximadamente 90% y aproximadamente 99%, incluso más preferiblemente de entre
 30 aproximadamente 95% y aproximadamente 99%, y particularmente de entre aproximadamente 97% y aproximadamente 99% con las moléculas de unión originales que se describen en la presente, a nivel de su secuencia de aminoácidos. Pueden emplearse algoritmos informáticos, tales como Gap, Bestfit u otros algoritmos conocidos por aquellos versados en la técnica, para efectuar un alineamiento óptimo de las secuencias de aminoácidos que se desea comparar y para definir los residuos de aminoácidos que son similares o idénticos. Las variantes funcionales pueden obtenerse alterando las moléculas de unión originales o partes de éstas de acuerdo con métodos de biología molecular generalmente conocidos en la técnica, que incluyen, sin limitaciones, la PCR con
 35 una susceptibilidad elevada a errores, la mutagénesis dirigida de oligonucleótidos, la mutagénesis en sitios específicos y el barajado de las cadenas pesadas y/o livianas.

40 En algunas formas de realización, las variantes funcionales presentan actividad de neutralización sobre los virus de la influenza B. La actividad de neutralización puede ser idéntica, superior o inferior a la de las moléculas de unión originales. Tal como se lo emplea en la presente solicitud, el término “molécula de unión (humana)”, también abarca las variantes funcionales de dichas moléculas de unión (humanas). En la técnica se conocen ensayos apropiados para verificar si una variante de una molécula de unión presenta actividad de neutralización (véase WHO Manual on Animal Influenza Diagnostic and Surveillance, Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2005 versión 2002.5).

45 En determinadas formas de realización, las variantes funcionales son moléculas de unión que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende una o más mutaciones a nivel de los aminoácidos, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince mutaciones a nivel de los aminoácidos, en comparación con SEQ ID N° 75, y/o una región variable de la cadena liviana que comprende una o más mutaciones a nivel de los aminoácidos, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince mutaciones a nivel de los aminoácidos, en comparación con SEQ ID N° 77.

50 En determinadas formas de realización, las moléculas de unión de acuerdo con la invención se usan como medicamentos, y preferiblemente se usan para tratar y/o prevenir infecciones de influenza provocadas por los virus de la influenza B. El virus de la influenza que puede provocar la infección y que puede ser combatido con las moléculas de unión de acuerdo con la presente invención puede ser un virus de la influenza B de los linajes B/Yamagata y B/Victoria.

55 La presente invención también está relacionada con una composición farmacéutica que comprende al menos una molécula de unión de acuerdo con la invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En aun otra forma de realización, la invención está relacionada con el uso de una molécula de unión de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar una infección provocada por un virus de la influenza.

60 Las infecciones de los virus de la influenza que pueden prevenirse y/o tratarse mediante el uso de las moléculas de unión de acuerdo con la invención pueden ocurrir en poblaciones pequeñas, pero también pueden dispersarse en

todo el mundo a través de epidemias estacionales, o en el peor de los casos, a través de pandemias globales, donde millones de individuos se encuentran en riesgo. En la invención se proveen moléculas de unión que pueden neutralizar las infecciones de las cepas de influenza que provocan dichas epidemias estacionales, así como las pandemias potenciales.

5 En un aun otro aspecto, en la invención se proveen inmunoconjugados, es decir, moléculas que comprenden al menos una molécula de unión como las que se definen en la presente y al menos una marca, que puede ser una unidad o un agente detectable. En la presente invención también se contemplan las mezclas que comprenden los inmunoconjugados de acuerdo con la invención y las mezclas que comprenden al menos un inmunoconjugado de acuerdo con la invención y otra molécula, que puede ser un agente terapéutico o una molécula de unión o un
10 inmunoconjugado de otro tipo. En formas de realización adicionales, los inmunoconjugados de acuerdo con la invención pueden comprender más de una marca. Estas marcas pueden ser idénticas o diferentes, y pueden estar unidas a las moléculas de unión o conjugadas con ellas a través de enlaces no covalentes. La marca o marcas también pueden estar unidas a las moléculas de unión o conjugadas con ellas de manera directa, a través de enlaces covalentes. Como alternativa, la marca o marcas pueden estar unidas a las moléculas de unión o
15 conjugadas con ellas a través de uno o más compuestos conectores. Los métodos para conjugar las marcas con las moléculas de unión han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica.

Las marcas en los inmunoconjugados de la presente invención pueden ser agentes terapéuticos o unidades o agentes detectables. Las marcas apropiadas para la terapia y/o la prevención pueden ser toxinas o partes funcionales de éstas, antibióticos, enzimas u otras moléculas de unión útiles para potenciar la fagocitosis o la
20 estimulación inmune. Los inmunoconjugados que comprenden agentes detectables pueden utilizarse para el diagnóstico, por ejemplo, para determinar si un sujeto ha sido infectado por un virus de la influenza o para monitorear el desarrollo o el progreso de una infección de un virus de la influenza, como parte de un procedimiento de análisis clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento determinado. Por otra parte, los inmunoconjugados también pueden utilizarse para otros propósitos relacionados con la detección, el análisis y/o
25 el diagnóstico. Las unidades o los agentes detectables incluyen, sin limitaciones, las enzimas, los grupos protésicos, los materiales fluorescentes, los materiales luminiscentes, los materiales bioluminiscentes, los materiales radiactivos, los metales que emiten positrones y los iones de metales paramagnéticos no radiactivos. Las marcas que puedan emplearse en combinación con las moléculas de unión para propósitos relacionados con la detección, el análisis y/o el diagnóstico dependerán de las técnicas y/o los métodos específicos que se empleen, que abarcarán, entre otros,
30 la coloración inmunohistoquímica de las muestras (de tejidos), la detección basada en la citometría de flujo, la detección citométrica basada en un barrido con un láser, los inmunoensayos fluorescentes, los análisis inmunosorbentes ligados a enzimas (ELISA), los radioinmunoensayos (RIA), los bioensayos (por ejemplo, los ensayos basados en la fagocitosis) y las aplicaciones en transferencias Western. Aquellos versados en la técnica han de conocer marcas apropiadas para los procedimientos de detección, de análisis o de diagnóstico y/o para otros
35 métodos.

Por otro lado, las moléculas de unión humanas o los inmunoconjugados de acuerdo con la invención pueden unirse a soportes sólidos, los cuales resultan particularmente útiles para los inmunoensayos in vitro o para la purificación de los virus de la influenza o de fragmentos de éstos. Dichos soportes sólidos pueden ser porosos o no porosos, planos o no planos. Las moléculas de unión de acuerdo con la presente invención pueden estar fusionadas con secuencias
40 de marca, que pueden ser péptidos, con el propósito de facilitar la purificación. Los ejemplos de estas secuencias incluyen, sin limitaciones, las marcas a base de hexahistidina o de hemaglutinina (HA), la marca myc y la marca flag. Como alternativa, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un anticuerpo heteroconjugado. En otro aspecto, las moléculas de unión de acuerdo con la invención pueden conjugarse con uno o más antígenos o pueden unirse a ellos. Preferiblemente, estos antígenos son antígenos que son reconocidos por el sistema inmune del sujeto al que se le administra el conjugado que comprende la molécula de unión y el antígeno. Los antígenos pueden ser idénticos, aunque también pueden ser diferentes uno del otro. Los métodos de conjugación con los que pueden unirse los antígenos y las moléculas de unión son bien conocidos en la técnica, e incluyen, sin limitaciones, el uso de agentes de entrecruzamiento. Las moléculas de unión de acuerdo con la
45 invención se unirán al virus de la influenza HA, y los antígenos que estén unidos a las moléculas de unión iniciarán un ataque poderoso mediado por las células T sobre el conjugado, lo cual eventualmente dará como resultado la destrucción del virus de la influenza.

Además de poder elaborarse sobre la base de una conjugación química, que puede ser directa o indirecta, por ejemplo, a través de un conector, los inmunoconjugados pueden producirse como proteínas de fusión que comprenden las moléculas de unión de acuerdo con la invención y una marca apropiada. Las proteínas de fusión
55 pueden elaborarse con métodos conocidos en la técnica, lo que abarca los métodos recombinantes, que están basados en la construcción de moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las moléculas de unión, en el mismo marco con secuencias de nucleótidos que codifican las una o más marcas apropiadas, a lo que sigue la expresión de dichas moléculas de ácidos nucleicos.

Otro aspecto de la presente invención consiste en proveer moléculas de ácidos nucleicos que codifican al menos una molécula de unión o un inmunoconjugado de acuerdo con la invención. Estas moléculas de ácidos nucleicos
60

pueden emplearse como intermediarios en procedimientos de clonación, por ejemplo, en un proceso de maduración basado en la afinidad, según se describe en la presente. En una forma de realización preferida, las moléculas de ácidos nucleicos se aíslan o se purifican.

5 Aquellos versados en la técnica han de apreciar que dentro del alcance de la presente invención también se contemplan las variantes funcionales de las moléculas de ácidos nucleicos que se han mencionado. Las variantes funcionales son secuencias de ácidos nucleicos que pueden traducirse de manera directa, mediante el uso del código genético convencional, con lo que pueden obtenerse secuencias de aminoácidos idénticas a las que se traducen a partir de las moléculas de ácidos nucleicos originales.

10 Preferiblemente, las moléculas de ácidos nucleicos codifican moléculas de unión que comprenden las regiones CDR que se describieron con anterioridad. En una forma de realización adicional, las moléculas de ácidos nucleicos codifican moléculas de unión que comprenden dos, tres, cuatro, cinco o incluso las seis regiones CDR de las moléculas de unión de acuerdo con la invención.

15 En otra forma de realización, las moléculas de ácidos nucleicos codifican moléculas de unión que comprenden una cadena pesada que comprende las secuencias variables de la cadena pesada que se describieron con anterioridad. En otra forma de realización las moléculas de ácidos nucleicos codifican moléculas de unión que comprenden una cadena liviana que comprende las secuencias variables de la cadena liviana que se describieron con anterioridad. Más adelante se detallan las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas de las moléculas de unión de acuerdo con la invención.

20 Otro aspecto de la invención consiste en proveer vectores, es decir, construcciones de ácidos nucleicos, que comprenden una o más moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Los vectores pueden obtenerse a partir de plásmidos, por ejemplo y sin limitaciones, F, R1, RP 1, Col, pBR322, TOL o Ti entre otros, a partir de cósmidos, a partir de fagos como los fagos lambda, lambdaoide, M13, Mu, P1, P22, Q β , T-par, T-impar, T2, T4 o T7, entre otros, o a partir de diversos virus que afectan a las plantas. Los vectores pueden emplearse en la clonación y/o la expresión de las moléculas de unión de acuerdo con la invención, e incluso pueden usarse en una
 25 terapia génica. Dentro del alcance de la presente invención también se contemplan los vectores que comprenden una o más moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención unidas operativamente a una o más moléculas de ácidos nucleicos reguladoras de la expresión. La selección del vector depende de los procedimientos recombinantes seleccionados y del huésped que se desea tratar. La introducción de los vectores en las células huésped puede llevarse a cabo sobre la base de una transfección con fosfato de calcio, una infección con un virus,
 30 una transfección mediada por DEAE-dextrano, una transfección mediada por lipofectamina o una electroporación, entre otras posibilidades. Los vectores pueden replicarse de manera autónoma o pueden replicarse junto con el cromosoma en el cual se han integrado.

35 Preferiblemente, los vectores contienen uno o más marcadores de selección. La selección de los marcadores podrá depender de las células huésped que se hayan seleccionado, aunque esto no será crítico para la invención, lo cual ha de resultar evidente para aquellos versados en la técnica. Los ejemplos de marcadores incluyen, sin limitaciones, la kanamicina, la neomicina, la puromicina, la higromicina, la zeocina, el gen que codifica la timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-TK) y el gen que codifica la dihidrofolato reductasa del ratón (dhfr). Dentro del alcance de la invención también se incluyen aquellos vectores que comprenden una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican moléculas de unión humanas como las que se describieron con anterioridad, unidas operativamente a
 40 una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas o péptidos que pueden usarse para aislar moléculas de unión humanas. Las proteínas y los péptidos de este tipo incluyen, sin limitaciones, la glutatión-S-transferasa, la proteína que puede unirse a la maltosa, la polihistidina que puede unirse a los metales, la proteína fluorescente verde, la luciferasa y la beta-galactosidasa.

45 Los huéspedes que contienen una o más copias de los vectores que se mencionaron con anterioridad son un aspecto adicional de la presente invención. Preferiblemente, los huéspedes son células huésped. Las células huésped pueden ser, sin limitaciones, células de mamíferos, células vegetales, células de insectos, células de origen fúngico o células bacterianas. Las células bacterianas incluyen, sin limitaciones, las células de bacterias Gram positivas o Gram negativas, tales como las diversas especies de los géneros *Escherichia*, tal como *E.coli*, y *Pseudomonas*. En el contexto de las células fúngicas, preferiblemente se emplean células de levadura. La expresión en levaduras puede efectuarse usando cepas de levaduras tales como *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y
 50 *Hansenula polymorpha*. Además, como células huésped pueden utilizarse células de insectos, tales como las células de *Drosophila* o las células Sf9. Adicionalmente, las células huésped pueden ser células provenientes de plantas de utilidad en la forestación o en la alimentación, como es el caso de las células que derivan de los cereales, aunque también pueden ser células provenientes de plantas medicinales, de plantas ornamentales o de retoños florales. Las plantas o las células vegetales transformadas (transgénicas) pueden producirse de acuerdo con métodos conocidos,
 55 por ejemplo, sobre la base de una transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*, mediante la transformación de discos de hojas, a través de una transformación de protoplastos basada en una transferencia de ADN inducida con polietilenglicol o por medio de una electroporación, una sonicación, una microinyección o una transferencia balística de genes. Adicionalmente, el sistema de expresión apropiado puede ser un sistema basado en baculovirus.
 60 En el contexto de la presente invención, se prefieren los sistemas de expresión en los que se emplean células de

5 mamíferos, tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), las células COS, las células BHK, las células NSO o las células del melanoma de Bowes. En las células de mamíferos, las proteínas pueden expresarse con modificaciones posteriores a la traducción, lo que implica que pueden obtenerse proteínas más similares a las de origen natural. Debido a que la presente invención está relacionada con moléculas que pueden administrárseles a los seres humanos, resulta particularmente preferible un sistema de expresión completamente humano. Por lo tanto, las células huésped más preferiblemente son células humanas. Los ejemplos de células humanas abarcan, entre otras, las células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 y HEK293T. En las formas de realización preferidas, las células productoras humanas comprenden al menos una parte funcional de una secuencia de ácido nucleico que codifica una región E1 de un adenovirus, en un formato que puede expresarse. En otras formas de realización aun más preferidas, las células huésped se obtienen de la retina humana y se immortalizan con ácidos nucleicos que comprenden secuencias adenovirales E1, lo que abarca, por ejemplo, las células 911 o la línea de células que fue depositada en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), CAMR, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Gran Bretaña, el 29 de febrero de 1996, con el número 96022940, que se comercializa bajo la marca PER.C6® (PER.C6 es una marca comercial registrada de Crucell Holland, B.V.). Para los propósitos de la presente solicitud, el término "células PER.C6" abarca las células que fueron depositadas con el número 96022940, sus ancestros, los productos de pasajes precedentes o ulteriores, los descendientes de sus ancestros y los derivados de cualquiera de los anteriores. La producción de las proteínas recombinantes en las células huésped puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. El uso de las células que se comercializan bajo la marca PER.C6® como una plataforma para elaborar proteínas de interés se describe en WO 00/63403, cuyo contenido se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad.

10 Un método para producir una molécula de unión de acuerdo con la invención es un aspecto adicional de la invención. El método comprende los siguientes pasos: (a) cultivar un huésped de acuerdo con la invención, bajo condiciones apropiadas para obtener la expresión de la molécula de unión, y (b) opcionalmente recuperar la molécula de unión expresada. Las moléculas de unión expresadas pueden recuperarse a partir del extracto libre de células, pero preferiblemente se las recupera a partir del medio de cultivo. Este método de producción también puede emplearse para elaborar variantes funcionales de las moléculas de unión y/o los inmunoconjugados de acuerdo con la presente invención. Los métodos para recuperar las proteínas, tales como las moléculas de unión, a partir de los extractos libres de células o los medios de cultivo son bien conocidos por aquellos versados en la técnica. Las moléculas de unión y/o los inmunoconjugados que las comprenden que pueden obtenerse con un método como el que se describió con anterioridad también se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

15 Como una alternativa a la expresión en los huéspedes, que pueden ser células huésped, las moléculas de unión y los inmunoconjugados de acuerdo con la invención pueden elaborarse sobre la base de una síntesis con sintetizadores de péptidos convencionales o en sistemas de traducción libres de células, mediante el uso de moléculas de ácidos nucleicos del tipo del ARN, que pueden derivar de moléculas de ADN de acuerdo con la invención. Las moléculas de unión y los inmunoconjugados que pueden obtenerse con los métodos de elaboración sintéticos o los sistemas de traducción libres de células que se describieron con anterioridad también se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

20 En aun otra forma de realización, las moléculas de unión de acuerdo con la presente invención también pueden obtenerse a partir de mamíferos no humanos transgénicos, tales como los conejos, las cabras o las vacas, y pueden ser secretadas, por ejemplo, en la leche producida por ellos.

25 En aun otra forma de realización, las moléculas de unión de acuerdo con la presente invención pueden generarse en mamíferos no humanos transgénicos, por ejemplo, en ratones o conejos transgénicos en los que se expresan genes que codifican inmunoglobulinas humanas. Preferiblemente, los mamíferos no humanos transgénicos presentan un genoma que comprende un transgen que codifica una cadena pesada humana y un transgen que codifica una cadena liviana humana, las cuales pueden ensamblarse para obtener las moléculas de unión humanas completas que se describieron con anterioridad o partes de éstas. Los mamíferos no humanos transgénicos pueden inmunizarse con una preparación que comprende un virus de la influenza purificado o con una preparación enriquecida en un virus de la influenza o en un fragmento de éste. Los protocolos para inmunizar mamíferos no humanos están bien establecidos en la técnica. Véanse Using Antibodies: A Laboratory Manual, editado por E. Harlow y D. Lane (1998), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, y Current Protocols in Immunology, editado por J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober (2001), John Wiley & Sons Inc., Nueva York, cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia. Los protocolos de inmunización suelen estar basados en el uso de inmunizaciones múltiples, con coadyuvantes como el coadyuvante completo de Freund o el coadyuvante incompleto de Freund o sin ellos, aunque también pueden comprender inmunizaciones con ADN desnudo. En otra forma de realización, las moléculas de unión humanas son producidas en células B, células del plasma y/o células de memoria derivadas de los animales transgénicos. En aun otra forma de realización, las moléculas de unión humanas son producidas en hibridomas, los cuales se elaboran fusionando las células B que se obtienen de los mamíferos no humanos transgénicos que se describieron con anterioridad con células immortalizadas. Las células B, las células del plasma y los hibridomas pueden obtenerse a partir de los mamíferos no humanos transgénicos que se describieron con anterioridad, y las moléculas de unión humanas que

pueden obtenerse a partir de los mamíferos no humanos transgénicos que se describieron con anterioridad, a partir de las células B, a partir de las células del plasma, a partir de las células de memoria y/o a partir de los hibridomas también se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

5 En un aspecto adicional, en la invención se proveen composiciones que comprenden al menos una molécula de unión de acuerdo con la invención, que preferiblemente es un anticuerpo monoclonal humano, al menos un inmunocombinado de acuerdo con la invención y/o una combinación de éstos. Por otra parte, las composiciones pueden comprender, entre otros elementos, moléculas estabilizadoras, como es el caso de la albúmina o el polietilenglicol, o sales. Preferiblemente, las sales que se emplean son sales que permiten que se conserve la actividad biológica deseada de las moléculas de unión, y que no producen efectos toxicológicos indeseables. De ser necesario, las moléculas de unión humanas de acuerdo con la invención podrán recubrirse con un material o podrán aplicarse como un recubrimiento sobre él, con el objeto de protegerlas de la acción de los ácidos o de otras condiciones naturales o no naturales que puedan dar como resultado su inactivación.

10 En un aspecto adicional, en la invención se proveen composiciones que comprenden al menos una molécula de ácido nucleico como las que se definen en la presente invención. Las composiciones pueden comprender soluciones acuosas, tales como soluciones acuosas que contienen sales (por ejemplo, NaCl o sales como las que se describieron con anterioridad), detergentes (por ejemplo, SDS) y/u otros componentes apropiados.

15 Además, la presente invención está relacionada con composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una molécula de unión de acuerdo con la invención, que puede ser un anticuerpo monoclonal humano (o un fragmento funcional o una variante de éste), al menos un inmunocombinado de acuerdo con la invención, al menos una composición de acuerdo con la invención o una combinación de éstos. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención también puede comprender al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por aquellos versados en la técnica. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención también puede comprender al menos un agente terapéutico adicional. Los agentes apropiados también han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica.

20 En algunas formas de realización, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende al menos una molécula de unión adicional, es decir, la composición farmacéutica puede ser un cóctel o una mezcla de moléculas de unión. La composición farmacéutica puede comprender al menos dos moléculas de unión de acuerdo con la invención, al menos una molécula de unión de acuerdo con la invención y al menos otra molécula capaz de unirse a un virus de la influenza y/o de neutralizarlo, que puede ser otro anticuerpo contra una proteína HA o contra otras estructuras antigénicas presentes en el virus de la influenza, como es el caso de M2, y/o una molécula de unión capaz de neutralizar uno o más patógenos diferentes. En otra forma de realización, la molécula de unión adicional puede ser formulada de modo tal que pueda ser administrada por separado, de manera simultánea o consecutiva.

25 En algunas formas de realización, las moléculas de unión presentan una actividad de neutralización sinérgica cuando se las emplea en una combinación. Tal como se lo emplea en la presente, el término "sinérgico" denota que los efectos combinados de las moléculas de unión, cuando se las usa en una combinación, son mayores que la suma de sus efectos individuales. Las moléculas de unión que actúan de manera sinérgica pueden unirse a estructuras diferentes en un mismo fragmento de un virus de influenza o en fragmentos diferentes. Un método para calcular la sinergia está basado en el índice de combinación. El concepto del índice de combinación (CI) fue descrito por Chou y Talalay (1984). A modo de ejemplo, las composiciones pueden comprender una molécula de unión que presenta actividad de neutralización y una molécula de unión no neutralizadora. Las moléculas de unión no neutralizadoras y neutralizadoras también pueden actuar de manera sinérgica para neutralizar el virus de la influenza.

30 En determinadas formas de realización, la composición farmacéutica puede comprender al menos una molécula de unión de acuerdo con la invención y al menos una molécula de unión adicional, que preferiblemente puede ser otra molécula de unión capaz de neutralizar el virus de la influenza. Las moléculas de unión en la composición farmacéutica preferiblemente son capaces de reaccionar con virus de la influenza de diversos subtipos. Las moléculas de unión pueden presentar una afinidad elevada y una especificidad amplia. Preferiblemente, las dos moléculas de unión son moléculas que dan como resultado una neutralización transversal, es decir, cada una de ellas puede neutralizar virus de la influenza de diversos subtipos. Además, las moléculas de unión preferiblemente dan como resultado la neutralización de la mayor cantidad posible de cepas de cada uno de los diversos subtipos del virus de la influenza.

35 En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende al menos un agente profiláctico y/o terapéutico adicional. Preferiblemente, dicho agente profiláctico y/o terapéutico adicional es un agente que es útil para prevenir y/o tratar una infección de un virus de la influenza y/o una afección que es el resultado de una infección como la que se ha descrito. Los agentes terapéuticos y/o profilácticos incluyen, sin limitaciones, los agentes antivirales. Estos agentes pueden ser moléculas de unión, moléculas pequeñas, compuestos orgánicos o inorgánicos, enzimas, secuencias de polinucleótidos o péptidos antivirales, entre otros. Otros agentes que se emplean en la actualidad para tratar aquellos pacientes que han sido infectados por virus de la influenza incluyen los

- inhibidores de M2 (por ejemplo, la amantidina o la rimantadina) y los inhibidores de la neuraminidasa (por ejemplo, el zanamivir o el oseltamivir). Éstos pueden usarse en combinación con las moléculas de unión de acuerdo con la invención. En la presente, el término "combinación" abarca el uso de una única formulación combinada o de formulaciones separadas, las cuales pueden administrarse de manera simultánea o de manera consecutiva, en cualquier orden. Como agentes terapéuticos y/o profilácticos adicionales en el contexto de la presente invención, también se contempla la posibilidad de emplear agentes que sean útiles para prevenir y/o tratar las infecciones de los virus de la influenza y/o las afecciones que sean resultado de infecciones como las que se han descrito, pero que todavía se encuentren en la fase experimental.
- Antes de usarlas en los seres humanos, las moléculas de unión o las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden analizarse en sistemas basados en modelos animales apropiados. Los animales que pueden emplearse en estos sistemas modelo incluyen, sin limitaciones, el ratón, el hurón y el mono.
- Típicamente, las composiciones farmacéuticas deben ser estériles y estables bajo las condiciones en las que se lleva a cabo la elaboración y el almacenamiento. Las moléculas de unión de acuerdo con la presente invención, los inmunoconjugados de éstas o las composiciones que las comprenden pueden tomar la forma de un polvo que puede reconstituirse en un excipiente farmacéuticamente aceptable apropiado, antes de administrarlo o en el momento de su administración. En el caso de los polvos estériles que pueden emplearse en la elaboración de soluciones inyectables estériles, los métodos de producción preferidos incluyen el secado al vacío y la liofilización, en la cual se procesa una solución que comprende un ingrediente activo en combinación con cualquier ingrediente adicional deseado, que ha sido sometida a una esterilización basada en una filtración, para obtener un polvo.
- Como alternativa, las moléculas de unión de acuerdo con la presente invención, los inmunoconjugados de éstas o las composiciones que las comprenden pueden tomar la forma de soluciones, y los excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados pueden agregarse y/o mezclarse antes de la administración o durante la administración, de manera tal de obtener una dosis individual inyectable. Preferiblemente, el excipiente farmacéuticamente aceptable que se emplea en la presente invención es apropiado para obtener una concentración elevada de la droga, para mantener una fluidez correcta, y de ser necesario, para demorar la absorción.
- La selección de la ruta de administración óptima para las composiciones farmacéuticas dependerá de diversos factores, que incluyen las propiedades fisicoquímicas de las moléculas activas en las composiciones, la urgencia de la situación clínica y la relación entre las concentraciones de las moléculas activas en el plasma y el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, de ser necesario, las moléculas de unión de acuerdo con la invención podrán prepararse con vehículos que impidan que tenga lugar una liberación rápida, como es el caso de las formulaciones de liberación controlada, que abarcan los implantes, los parches transdérmicos y los sistemas de administración microencapsulados. Entre otros elementos, pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, como es el caso de los copolímeros de etileno y acetato de vinilo, los polianhídridos, el ácido poliglicólico, el colágeno, los poliortoésteres o el ácido poliláctico. Además, puede ser necesario recubrir las moléculas de unión humanas con un material o un compuesto que impida su inactivación. Como alternativa, es posible administrar las moléculas de unión humanas de manera concurrente con dicho material. A modo de ejemplo, las moléculas de unión pueden administrarse a un sujeto en un vehículo apropiado, que por ejemplo, puede ser un liposoma o un diluyente.
- Las rutas de administración pueden dividirse en dos categorías principales: las rutas de administración orales y las rutas de administración parenterales. Las rutas de administración preferidas son la ruta intravenosa y la inhalación.
- Las formas de dosificación orales pueden formularse, entre otras maneras, como tabletas, pastillas para disolver en la boca, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras, cápsulas de gelatina blanda, jarabes, elixires, píldoras, grageas, líquidos, geles o suspensiones espesas. Estas formulaciones pueden contener excipientes farmacéuticos, tales como, sin limitaciones, diluyentes inertes, agentes de granulación, desintegrantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, conservantes, colorantes, agentes saborizantes, edulcorantes, aceites vegetales o minerales, agentes humectantes o agentes espesantes.
- Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención también pueden formularse para una administración parenteral. Las formulaciones que pueden administrarse por vía parenteral pueden tomar la forma de soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas, entre otras, que pueden ser apropiadas para una inyección o para una infusión y que en cualquier caso han de ser isotónicas, estériles y no tóxicas. Las soluciones o las suspensiones podrán comprender agentes que no resulten tóxicos para quienes las reciban, en las dosificaciones y las concentraciones que se empleen, tales como el 1.3-butanodiol, la solución de Ringer, la solución de Hank, la solución isotónica de cloruro de sodio, los aceites, los ácidos grasos, los agentes anestésicos locales, los conservantes, los amortiguadores, los agentes para incrementar la viscosidad o la solubilidad, los antioxidantes solubles en agua, los antioxidantes solubles en aceites o los agentes quelantes de metales.
- En un aspecto adicional, las moléculas de unión de acuerdo con la invención, que pueden ser anticuerpos monoclonales humanos, los inmunoconjugados de éstas o las composiciones que las comprenden, que pueden ser composiciones farmacéuticas, pueden usarse como medicamentos o como agentes de diagnóstico. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención está relacionada con métodos con los que pueden diagnosticarse, tratarse y/o

prevenirse las infecciones que son provocadas por los virus de la influenza, que están basados en el uso de las moléculas de unión de acuerdo con la invención, de los inmunoconjugados de éstas o de las composiciones que las comprenden, que pueden ser composiciones farmacéuticas. Las moléculas que se mencionaron con anterioridad pueden utilizarse, entre otros propósitos, para el diagnóstico, la profilaxis y/o el tratamiento de las infecciones que son provocadas por el virus de la influenza B. En particular, las moléculas son apropiadas para tratar aquellos pacientes que padecen una infección provocada por un virus de la influenza y que todavía no han recibido tratamiento alguno, así como aquellos pacientes que ya han recibido un tratamiento para combatir una infección de un virus de la influenza.

Las moléculas o las composiciones que se mencionaron con anterioridad pueden emplearse en combinación con otras moléculas útiles en el diagnóstico, la profilaxis y/o el tratamiento. Es posible usarlas *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. A modo de ejemplo, las moléculas de unión de acuerdo con la invención, que pueden ser anticuerpos monoclonales humanos, los inmunoconjugados de éstas o las composiciones que las comprenden, que pueden ser composiciones farmacéuticas, pueden administrarse de manera concurrente con una vacuna contra el virus de la influenza (de estar disponible). Como alternativa, la vacuna puede administrarse antes o después de la administración de las moléculas de acuerdo con la invención. En lugar de vacunas, también pueden usarse agentes antivirales en combinación con las moléculas de unión de acuerdo con la presente invención. Los agentes antivirales apropiados abarcan los que se mencionaron con anterioridad.

Las moléculas típicamente se formulan en composiciones de acuerdo con la invención, que pueden ser composiciones farmacéuticas, en una cantidad que es eficaz para propósitos terapéuticos o de diagnóstico. Como alternativa, la formulación y la administración de los diversos componentes pueden efectuarse por separado. Por ejemplo, las moléculas de unión de acuerdo con la invención pueden aplicarse por vía intravenosa, y concurrentemente pueden administrarse otras moléculas, que pueden ser agentes antivirales, de manera sistémica.

El tratamiento puede aplicarse sobre grupos de pacientes que son susceptibles a sufrir una infección de influenza. Estos grupos de pacientes abarcan, por ejemplo y sin limitaciones, los pacientes de edad avanzada (por ejemplo, con una edad de al menos 50 años, de al menos 60 años o preferiblemente de al menos 65 años), los pacientes jóvenes (por ejemplo, con una edad de hasta 5 años o de hasta 1 año), los pacientes hospitalizados y los pacientes infectados que ya han sido tratados con un compuesto antiviral, pero que han presentado una respuesta inapropiada.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proveer la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Un rango de dosificación apropiado puede ser, por ejemplo, de 0.01-100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 0.1-50 mg/kg de peso corporal, y más preferiblemente de 0.01-15 mg/kg de peso corporal. Además, por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas con el transcurso del tiempo o pueden reducirse o incrementarse proporcionalmente las dosis con el tiempo, en función de las exigencias de la situación terapéutica. Las moléculas y las composiciones de acuerdo con la presente invención preferiblemente son estériles. Los métodos para esterilizar dichas moléculas y dichas composiciones son bien conocidos en la técnica. Las otras moléculas útiles para el diagnóstico, la profilaxis y/o el tratamiento pueden administrarse de acuerdo con un régimen de dosificación similar al que se ha propuesto para las moléculas de unión de acuerdo con la invención. Si las otras moléculas se administran por separado, es posible administrárselas a los pacientes antes de la administración de las una o más moléculas de unión humanas o las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención (por ejemplo, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 7 días, 2 semanas, 4 semanas ó 6 semanas antes de la administración), de manera concurrente con dicha administración o después de ella (por ejemplo, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 7 días, 2 semanas, 4 semanas ó 6 semanas después de la administración). El régimen de dosificación exacto usualmente se ajusta durante las pruebas clínicas en los pacientes humanos.

Las moléculas de unión humanas y las composiciones farmacéuticas que las comprenden son particularmente útiles para administrárselas a los seres humanos como agentes terapéuticos *in vivo*, y frecuentemente se las prefiere para dicho propósito, debido a que la respuesta inmune de quien recibe el anticuerpo frecuentemente será sustancialmente menor que la que se obtenga como resultado de la administración de una molécula de unión monoclonal murina, quimérica o humanizada.

En otro aspecto, la invención está relacionada con el uso de las moléculas de unión de acuerdo con la invención, que pueden ser anticuerpos monoclonales humanos, de los inmunoconjugados de éstas o de las composiciones que las comprenden, que pueden ser composiciones farmacéuticas, en la elaboración de un medicamento que es útil en el diagnóstico, la profilaxis y/o el tratamiento de las infecciones que son provocadas por los virus de la influenza, particularmente de aquellas infecciones de influenza que son provocadas por los virus de la influenza B.

Por otra parte, dentro del alcance de la presente invención se contemplan los conjuntos de elementos que comprenden al menos una molécula de unión de acuerdo con la invención, que puede ser un anticuerpo monoclonal

- humano, al menos un inmunoconjugado, al menos una composición, que puede ser una composición farmacéutica, al menos un vector, al menos un huésped y/o cualquier combinación de éstos. Opcionalmente, los componentes de los conjuntos de elementos de acuerdo con la invención que se describieron con anterioridad se envasan en recipientes apropiados, que pueden ser útiles en el diagnóstico, la profilaxis y/o el tratamiento de las afecciones que se han mencionado. En otro aspecto, los componentes que se enumeraron con anterioridad pueden almacenarse en recipientes apropiados para alojar dosis individuales o múltiples dosis, en cuyo caso pueden tomar la forma de soluciones acuosas, que preferiblemente son estériles, o de formulaciones liofilizadas apropiadas para una reconstitución ulterior, que preferiblemente también son estériles. Los recipientes pueden estar hechos de diversos materiales, tales como vidrio o plástico, y pueden comprender una abertura de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa donde puede colocarse una solución que puede administrarse por vía intravenosa o una ampolla con un tapón que puede perforarse con una aguja de inyección hipodérmica). El conjunto de elementos también puede comprender recipientes adicionales, que comprenden amortiguadores farmacéuticamente aceptables. En los recipientes, también pueden incluirse otros materiales deseables desde el punto de vista comercial o del usuario, que pueden ser otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, medios de cultivo para uno o más de los huéspedes apropiados, y posiblemente uno o más agentes terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico adicionales. Los conjuntos de elementos también pueden comprender instrucciones para su uso apropiado en la terapia, en la profilaxis y/o en el diagnóstico, que pueden comprender información, por ejemplo, sobre las indicaciones, el uso, la dosificación, la fabricación, la administración y/o las contraindicaciones, así como advertencias relacionadas con el uso de los productos en la terapia, en la profilaxis o en el diagnóstico.
- 20 Las moléculas de unión de acuerdo con la presente invención también pueden usarse de manera ventajosa como agentes de diagnóstico en un método para detectar los virus de la influenza in vitro. En este contexto, la invención está relacionada con un método con el que pueden detectarse los virus de la influenza de los subtipos B en una muestra, que comprende los siguientes pasos:
- (a) determinar el nivel de un antígeno del virus de la influenza B en una muestra biológica mediante el uso de una molécula de unión de acuerdo con la invención y/o de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención; y
- (b) comparar el nivel que se ha determinado para el antígeno del virus de la influenza B con un nivel de control, donde un incremento en el nivel que se ha determinado para el antígeno del virus de la influenza B, con relación al nivel de control del antígeno del virus de la influenza B, es indicativo de una infección provocada por un virus de la influenza B.
- 30 La muestra puede ser, sin limitaciones, una muestra biológica, que puede ser una muestra de sangre, de suero, de materia fecal, de esputo, una aspiración nasofaríngea, un lavaje bronquial o una muestra de orina, de un tejido o de otro material biológico, que puede obtenerse de un sujeto (potencialmente) infectado, o bien puede ser una muestra no biológica, tal como una muestra de agua o de una bebida, entre otras. Los sujetos (potencialmente) infectados podrán ser sujetos humanos, pero también podrán ser animales de los que se sospeche que puedan ser portadores de un virus de la influenza, donde podrá determinarse la presencia del virus mediante el uso de las moléculas de unión humanas o los inmunoconjugados de acuerdo con la invención. La muestra primero puede ser sometida a una manipulación para tornarla más apropiada para el método de detección. La manipulación puede abarcar, entre otros procedimientos, someter una muestra de la que se sabe o se sospecha que contiene un virus a un procedimiento apropiado para desintegrar el virus en sus componentes antigénicos, lo que abarca las proteínas, los (poli) péptidos y los fragmentos antigénicos de otro tipo. Preferiblemente, las moléculas de unión humanas o los inmunoconjugados de acuerdo con la invención se ponen en contacto con la muestra bajo condiciones que favorecen la formación de un complejo inmunológico entre las moléculas de unión humanas y los virus o los componentes antigénicos de éstos que puedan estar presentes en la muestra. Luego se detecta la formación de los complejos inmunológicos, de estar presentes, lo que es indicativo de la presencia del virus en la muestra, y se mide de acuerdo con métodos apropiados. Estos métodos incluyen, entre otros, los inmunoensayos con los que puede determinarse una unión homogénea o heterogénea, que abarcan, por ejemplo, los radioinmunoensayos (RIA), los ELISA, los análisis de inmunofluorescencia, los análisis inmunohistoquímicos, la FACS, los análisis de BIACORE y los análisis de transferencia Western.
- 50 Los procedimientos de análisis preferidos, especialmente para verificaciones clínicas a gran escala en las que se emplea suero, sangre o productos derivados de la sangre de los pacientes, abarcan los análisis de ELISA y las transferencias Western. Los análisis de ELISA son particularmente preferidos. En estos ensayos, las moléculas de unión o los inmunoconjugados de acuerdo con la invención pueden usarse como vehículos, ya que pueden unirse a la superficie interior de las cavidades de las placas de microtitulación a través de enlaces covalentes. Las moléculas de unión o los inmunoconjugados de acuerdo con la invención pueden unirse directamente a las cavidades de las placas de microtitulación. Sin embargo, la unión máxima entre las moléculas de unión o los inmunoconjugados de acuerdo con la invención y las cavidades solamente puede obtenerse si las cavidades se someten a un tratamiento preliminar con polilisina, antes de agregar las moléculas de unión o los inmunoconjugados de acuerdo con la invención. Por otra parte, las moléculas de unión o los inmunoconjugados de acuerdo con la invención pueden unirse a través de enlaces covalentes a las cavidades de acuerdo con otros métodos conocidos. En general, las moléculas de unión o los inmunoconjugados se emplean como recubrimientos en una concentración de entre 0.01 y

100 µg/ml, aunque también es posible usar cantidades mayores o menores. Posteriormente, las muestras se agregan a las cavidades que han sido recubiertas con las moléculas de unión o los inmunoconjugados de acuerdo con la invención.

5 En la invención también se proveen las moléculas de unión reivindicadas para su uso en métodos con los cuales puede tratarse o prevenirse una infección provocada por un virus de la influenza B en un sujeto, que comprende administrarle al sujeto una cantidad eficaz para fines terapéuticos o profilácticos de una molécula de unión, un inmunoconjugado y/o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. En determinadas formas de realización, el sujeto es un mamífero, y preferiblemente es un ser humano.

10 Además, las moléculas de unión de acuerdo con la invención pueden utilizarse para identificar estructuras de unión específicas en los virus de la influenza. Las estructuras de unión pueden ser epitopes en las proteínas y/o en los polipéptidos, los cuales pueden ser lineales, aunque también puede tratarse de epitopes estructurales y/o conformacionales. En una forma de realización, las estructuras de unión pueden analizarse por medio de un procedimiento PEPSCAN (véanse, entre otras, las publicaciones WO 84/03564, WO 93/09872 y Sloodstra et al., 1996). Como alternativa, puede analizarse una biblioteca de péptidos al azar, que comprende péptidos provenientes de proteínas de virus de la influenza, para determinar la presencia de péptidos capaces de unirse a las moléculas de unión de acuerdo con la invención.

La invención se ilustra con mayor detalle en los ejemplos y las figuras más adelante.

Ejemplos

EJEMPLO 1.

20 *Construcción de bibliotecas de expresión en fagos scFv usando ARN extraído de células B de memoria*

Se recolectó sangre periférica de donantes normales saludables por medio de una venipunción, en tubos para muestras que contenían EDTA como anticoagulante. Las bibliotecas de presentación en fagos de los fragmentos Fv de cadena simple (scFv) se obtuvieron como se describe en WO 2008/028946. Se estudió la frecuencia del inserto en la biblioteca final mediante el uso de una PCR en colonias, con un conjunto de cebadores que rodeaba las regiones VH y VL insertadas (100-150 colonias individuales). Típicamente, más de 95% de las colonias presentaron un inserto con la longitud correcta (véase la tabla 1). Los productos de la PCR en colonias se usaron para el análisis ulterior de la secuencia del ADN, con el propósito de confirmar su variabilidad y determinar el porcentaje de colonias que comprendieron un ORF completo, que en general fue superior a 70% (véase la tabla 1). También se analizó la frecuencia de las mutaciones en los genes V. Aproximadamente 95% de las secuencias no se hallaron en la configuración de la línea germinal, lo que es indicativo de un proceso de maduración y es consistente con el fenotipo de memoria de las células B que se usaron como fuente del ARN para la biblioteca.

Se aplicó una estrategia de amplificación basada en dos procedimientos de PCR, donde se emplearon los conjuntos de cebadores que se describen en WO 2008/028946, para aislar las regiones VH y VL de las inmunoglobulinas del repertorio de cada donante.

35 El primer procedimiento de amplificación con el ADNc de las regiones VH, Vkappa o Vlambda dio como resultado seis, siete o nueve productos, respectivamente, que comprendieron aproximadamente 650 pares de bases. En el caso de la amplificación de la región VH de la IgM de las células B de memoria, se empleó el cebador constante OCM (que presentó especificidad por la cadena pesada de la región constante de la IgM), en combinación con OH1-OH7. El programa del ciclado térmico para las amplificaciones del primer procedimiento comprendió 2 minutos a 96°C (el paso de desnaturalización), 35 ciclos de 30 segundos a 96°C/30 segundos a 60°C/50 segundos a 72°C, una elongación final a 72°C durante 10 minutos y una refrigeración a 6°C. Los productos se cargaron en un gel de agarosa al 1%, se extrajeron de dicho gel mediante el uso de columnas de extracción (de Macherey-Nagel, MN) y se eluyeron con 50 µl de Tris-HCl 5 mM (a un pH de 8.0). Se sometió diez por ciento de los productos del primer procedimiento (5 µl) a un segundo procedimiento de amplificación. Después, estos cebadores se extendieron con sitios de restricción, de manera tal de posibilitar la clonación direccional de las regiones VL y VH respectivas en el vector que se emplearía para la presentación en los fagos, PDV-C06. El programa de PCR para las amplificaciones del segundo procedimiento comprendió 2 minutos a 96°C (el paso de desnaturalización), 30 ciclos de 30 segundos a 96°C/30 segundos a 60°C/50 segundos a 72°C, una elongación final a 72°C durante 10 minutos y una refrigeración a 6°C. Los productos del segundo procedimiento (que comprendieron aproximadamente 350 pares de bases) se cargaron primero en un gel de agarosa y se extrajeron de él como se describió con anterioridad. Luego se combinaron los fragmentos en función de la ocurrencia natural de los segmentos J en los productos de los genes que codifican las inmunoglobulinas, con lo que se obtuvieron siete, seis y nueve lotes de las regiones variables VH, Vkappa y Vlambda, respectivamente, según se detalla en las tablas 1 y 2.

55 Para obtener una distribución normalizada se las secuencias de las inmunoglobulinas en la biblioteca inmune, los seis lotes de cadenas livianas Vkappa y los nueve lotes de cadenas livianas Vlambda se mezclaron en los porcentajes que se detallan en la tabla 1. Este único lote de regiones VL finales (5 µg) se digirió con las enzimas de

restricción Sall y NotI, se cargó en un gel de agarosa al 1.5% y se aisló usando columnas de extracción MN. El producto, de aproximadamente 350 pares de bases, se introdujo en un vector PDV-C06 que había sido tratado con Sall y NotI, que tenía un tamaño de aproximadamente 5000 pares de bases. La mezcla de reacción comprendió 500 ng del vector PDV-C06, 70 ng del inserto de la región VL, 5 µl de un amortiguador de unión 10X (de NEB), 2.5 µg de la ligasa de ADN T4 (de NEB, en una concentración de 400 U/µl) y agua pura, que se agregó hasta alcanzar un volumen total de 50 µl (la proporción entre el vector y el inserto fue de 1:2). La unión tuvo lugar en el transcurso de una noche, en un baño de agua a 16°C. Posteriormente, se duplicó el volumen con agua y se llevó a cabo una extracción con un volumen idéntico de una mezcla (75:24:1) de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (de Invitrogen). Esta extracción fue seguida por otra extracción con cloroformo (de Merck) y por una precipitación con 1 µl de pintura Pellet (de Novogen), 10 µl de acetato de sodio (3 M, pH 5.0) y 100 µl de isopropanol, que se llevó a cabo a -20°C durante 2 horas. La muestra obtenida se centrifugó a 20000 x G, a 4°C durante 30 minutos. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 20000 x G, a temperatura ambiente durante 10 minutos. El etanol se eliminó y el precipitado se secó al aire durante varios minutos, y luego se disolvió en 50 µl de un amortiguador que comprendió Tris-HCl 10 mM y que tuvo un pH de 8.0. Se usaron 2 µl de la mezcla de unión para transformar 40 µl de células electrocompetentes TG1 (de Agilent), en una cubeta de electroporación fría de 0.1 cm (Biorad), para lo cual se empleó un aparato Genepulser II (de Biorad) que había sido configurado a 1.7 kV, 200 Ohm y 25 µF (con una constante de tiempo de aproximadamente 4.5 milisegundos). Inmediatamente después de aplicar el pulso, las bacterias se removieron de la cubeta por medio de un lavado con 750 µl de un medio SOC (de Invitrogen) que contenía 5% (peso en volumen) de glucosa (de Sigma), a 37°C, y se transfirieron a un tubo de cultivo de 15 ml con un fondo redondo. Se usaron otros 750 µl de la mezcla de SOC y glucosa para lavar las bacterias residuales de la cubeta, que también se colocaron en el tubo de cultivo. Las bacterias se recuperaron a través de un cultivo a 37°C en una incubadora, que se prolongó durante exactamente una hora, con agitación a 220 rpm. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de Petri cuadradas grandes, de 240 milímetros (NUNC), que contenían 200 ml de agar 2TY (que comprendió 16 g/l de bacto-triptona, 10 g/l de un extracto de bacterias y levaduras, 5 g/l de NaCl y 15 g/l de agar y que tuvo un pH de 7.0), en combinación con 50 µg/ml de ampicilina y 5% (peso en volumen) de glucosa (de Sigma). Para llevar a cabo el conteo, se sembraron diluciones de 1 en 1000 y de 1 en 10000 en placas de Petri de 15 cm que contenían el mismo medio. Este procedimiento de transformación se repitió veinte veces de manera consecutiva. La biblioteca completa se sembró en un total de diez placas de Petri cuadradas grandes, donde se permitió que se desarrollara durante la noche en una estufa de cultivo a 37°C. En general, con el protocolo anterior se obtuvieron aproximadamente 1×10^7 cfu. La biblioteca intermedia que comprendió las regiones VL se recolectó de las placas por medio de un raspado suave, y luego se colocó en placas individuales que comprendían 12 ml de un medio 2TY. La masa de células se determinó sobre la base de su OD a 600 nm, y se usó el doble de la densidad de las bacterias a una OD de 500 nm en un proceso de elaboración de ADN plasmídico a gran escala, en el cual se emplearon dos columnas Maxiprep (MN), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

De manera análoga a las regiones VL, se mezclaron las regiones VH-JH que se obtuvieron en el segundo procedimiento de amplificación para obtener una distribución de uso normal de los segmentos J (véase la tabla 2), con lo que se obtuvieron 7 subconjuntos de regiones VH, que se denominaron PH1 a PH7. Los lotes se mezclaron de manera tal de obtener una distribución normalizada de las secuencias, con los porcentajes que se indican en la tabla 2. La fracción de regiones VH que se obtuvo se digirió con las enzimas de restricción Sfil y XhoI y se introdujo en la biblioteca intermedia de regiones PDV-VL, que había sido obtenida como se describió con anterioridad y que había sido sometida a un tratamiento con Sfil y XhoI. La preparación de la reacción de unión, el método que se empleó para la purificación, la transformación subsiguiente de las células TG1 y la recuperación de las bacterias se llevaron a cabo tal como se describió con anterioridad para la biblioteca intermedia de regiones VL, con la excepción de que difirió la cantidad de placas de 240 mm que se emplearon: para obtener la biblioteca final, se usaron veinte placas, con lo que se obtuvieron aproximadamente 2×10^7 cfu. Se analizó la frecuencia del inserto en la biblioteca final a través de una PCR en colonias, para lo cual se empleó un conjunto de cebadores que rodeaba las regiones VH y VL insertadas (100-150 colonias individuales). Más de 95% de las colonias presentaron un inserto con la longitud correcta (véase la tabla 3). Los productos de la PCR en colonias se usaron para el análisis ulterior de la secuencia del ADN, con el propósito de confirmar su variabilidad y determinar el porcentaje de colonias que comprendieron un ORF completo, que en general fue superior a 70% (véase la tabla 3). También se analizó la frecuencia de las mutaciones en los genes V. Aproximadamente 95% de las secuencias no se hallaron en la configuración de la línea germinal, lo que es indicativo de un proceso de maduración y es consistente con el fenotipo de memoria de las células B que se usaron como fuente del ARN para la biblioteca. Finalmente, la biblioteca se recuperó, se amplificó usando los fagos asistentes CT (véase WO 02/103012) y se usó para seleccionar los anticuerpos en los fagos, sobre la base de los métodos de clasificación que se describirán más adelante.

EJEMPLO 2.

Selección de los fagos que contenían fragmentos Fv de cadena simple contra la influenza B

La selección se llevó a cabo usando bibliotecas de presentación de anticuerpos contra una hemaglutinina (HA) recombinante de la influenza B (B/Ohio/01/2005, B/Florida/04/2006 y B/Brisbane/60/2008) en fagos. Los antígenos de la HA se diluyeron en PBS (5.0 µg/ml), se colocaron en tubos MaxiSorp™ Nunc-Inmuno (de Nunc), a razón de 2 ml por tubo, y se incubaron a 4°C durante la noche en una rueda con rotación. Los inmunotubos se vaciaron y se

lavarón tres veces en un amortiguador de bloqueo (que comprendió leche en polvo descremada al 2% (ELK) en PBS). Posteriormente, los inmunotubos se llenaron por completo con un amortiguador de bloqueo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Se bloquearon alícuotas de la biblioteca de presentación en fagos (de 350-500 µl, que habían sido amplificadas usando el fago asistente CT, véase WO 02/103012) en un amortiguador de bloqueo (que opcionalmente comprendió 10% de suero fetal bovino inactivado con calor y 2% de suero de ratón), a temperatura ambiente durante 1-2 horas. La biblioteca de expresión en fagos bloqueada se colocó en los inmunotubos, se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y se lavó con un amortiguador de lavado (que comprendió Tween-20 al 0.05% (volumen en volumen) en PBS) para eliminar los fagos no unidos. Los fagos unidos se eluyeron del antígeno respectivo por medio de una incubación con 1 ml de trietilamina (TEA) 100 mM, a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, los fagos eluidos se mezclaron con 0.5 ml de Tris-HCl 1 M, con un pH de 7.5, que se agregó para neutralizar el pH. Esta mezcla se usó para infectar 5 ml de un cultivo de *E. coli* XL1-Blue que había sido desarrollado a 37°C, de manera tal de alcanzar una OD a 600 nm de aproximadamente 0.3. Se permitió que los fagos infectaran las bacterias XL1-Blue a 37°C durante 30 minutos. Después, la mezcla se centrifugó a 3000 x G, a temperatura ambiente durante 10 minutos, y el precipitado de bacterias se suspendió nuevamente en 0.5 ml de un medio que comprendió un extracto de levaduras y 2-triptona (2TY). La suspensión bacteriana obtenida se colocó en dos placas que comprendían agar 2TY con la adición de tetraciclina, ampicilina y glucosa. Una vez terminada la incubación de las placas, que se llevó a cabo a 37°C durante la noche, se rasparon las colonias de las placas y se las usó para preparar una biblioteca de fagos enriquecida, esencialmente como se describe en De Kruif et al. (1995a) y en WO 02/103012. En resumen, las bacterias raspadas se usaron para inocular un medio 2TY que comprendió ampicilina, tetraciclina y glucosa y se desarrollaron a una temperatura de 37°C, hasta una OD a 600 nm de aproximadamente 0.3. Se agregaron los fagos asistentes CT y se permitió que infectaran las bacterias, después de lo cual se cambió el medio por un medio 2TY que comprendió ampicilina, tetraciclina y kanamicina. La incubación se llevó a cabo a 30°C durante la noche. Al día siguiente, se eliminaron las bacterias del medio 2TY por medio de una centrifugación, después de lo cual los fagos en el medio se precipitaron usando polietilenglicol (PEG) 6000/NaCl. Finalmente, los fagos se disolvieron en 2 ml de PBS con 1% de albúmina de suero bovino (BSA), se esterilizaron por medio de una filtración y se usaron para el siguiente procedimiento de selección, que se puso en práctica para obtener una HA del mismo subtipo o una HA de un subtipo diferente.

Antes de aislar cada uno de los anticuerpos de cadena simple a partir de los fagos, se llevaron a cabo dos procedimientos de selección consecutivos. Una vez completo el segundo procedimiento de selección, se usaron las colonias individuales de *E. coli* para preparar los anticuerpos monoclonales en los fagos. Esencialmente, las colonias individuales se cultivaron en una placa de 96 cavidades hasta que se alcanzara la fase logarítmica, después de lo cual se las infectó con fagos asistentes VCS-M13. La producción de los anticuerpos en los fagos tuvo lugar durante la noche. Los sobrenadantes que contenían los anticuerpos que se habían obtenido a partir de los fagos se usaron directamente en un ELISA, con el fin de determinar la unión a los antígenos de la HA. Como alternativa, habría sido posible someter los anticuerpos obtenidos a partir de los fagos a una precipitación con PEG/NaCl, a una esterilización basada en una filtración, a un ELISA y a un análisis de citometría de flujo (que suele ponerse en práctica con los clones que han resultado positivos en el ELISA).

EJEMPLO 3.

Convalidación de los anticuerpos de cadena simple con especificidad por la HA que fueron obtenidos a partir de los fagos

Por medio de un ELISA, es decir, sobre la base de la unión a diversos antígenos de la HA, se convalidó la especificidad de algunos de los sobrenadantes que comprendían los anticuerpos de cadena simple que se obtuvieron a través del procedimiento de selección en fagos que se describió con anterioridad. Con este propósito, se aplicó una proteína HA del virus de la influenza B (B/Ohio/01/2005, B/Malaysia/2506/2004, B/Jilin/20/2003, B/Brisbane/60/2008 y B/Florida/04/2006) recombinante, que había sido expresada en baculovirus (de Protein Sciences, CT, EEUU), como recubrimiento sobre placas de ELISA Maxisorp™ (a razón de 0.5 µg/ml). Una vez aplicado el recubrimiento, las placas se lavaron tres veces con PBS con 0.1% (volumen en volumen) de Tween-20 y se bloquearon en PBS con 2% de ELK, a temperatura ambiente durante 1 hora. Los anticuerpos de cadena simple que se obtuvieron a partir de los fagos se incubaron durante 1 hora en un volumen idéntico de PBS con 4% de ELK, con el fin de bloquearlos. Las placas se vaciaron y se lavaron tres veces con PBS con 0.1% de Tween-20. Posteriormente, los anticuerpos de cadena simple que se obtuvieron a partir de los fagos y que fueron sometidos al procedimiento de bloqueo se colocaron en las cavidades de las placas. La incubación se prolongó durante una hora, después de lo cual las placas se lavaron cinco veces con PBS con 0,1% de Tween-20. Los anticuerpos unidos se detectaron sobre la base de la OD a 492 nm, mediante el uso de un anticuerpo anti-M13 conjugado con una peroxidasa. De manera simultánea, se puso en práctica un procedimiento en el que no se emplearon los anticuerpos de cadena simple provenientes de fagos: en su lugar, se usó un anticuerpo de cadena simple que, si bien había sido obtenido a partir de fagos, no estaba relacionado con los anticuerpos que se mencionaron con anterioridad, por lo que sirvió como control negativo.

Sobre la base de la selección que se llevó a cabo en las bibliotecas inmunes con diversos antígenos de la HA, se obtuvieron catorce anticuerpos de cadena simple provenientes de fagos contra las proteínas HA de los virus de la

influenza B de los linajes Yamagata y Victoria: sc08-031, sc08-032, sc08-033, sc08-034, sc08-035, sc08-059, sc10-023, sc10-032, sc10-049, sc10-051, sc11-035, sc11-036, sc11-038 y sc11-039 (véase la tabla 4).

Estos catorce anticuerpos provenientes de fagos se usaron para construir inmunoglobulinas humanas completas, las cuales fueron sometidas a una caracterización más detallada (véase el ejemplo 4).

5 EJEMPLO 4.

Construcción de moléculas de inmunoglobulinas completamente humanas (anticuerpos monoclonales humanos) a partir de clones de fragmentos Fv de cadena simple

Se obtuvo ADN plasmídico a partir de algunos de los clones de anticuerpos de cadena simple provenientes de fagos (que eran fragmentos scFv) y se determinó su secuencia de nucleótidos sobre la base de procedimientos de secuenciación convencionales. La identidad de los genes que codificaban los fragmentos scFv de las regiones VH y VL se determinó usando la herramienta que se provee en el Sitio de Internet de IMGT/V-QUEST (Brochet, et al. (2008); véase la tabla 5).

La región variable de la cadena pesada (VH) de los fragmentos scFv se clonó sobre la base de una digestión con enzimas de restricción (SfiI/XhoI), para luego expresarla en el vector de expresión para la IgG plg-C911-HCgamma1, que se digirió con las mismas enzimas. La región variable de la cadena liviana (VL) también se clonó en un vector de expresión apropiado para la IgG, plg-C909-Ckappa o plg-C910-Clambda, mediante el uso de una digestión con Sall y NotI sobre el fragmento que habría de insertarse y una digestión con XhoI y NotI sobre el vector blanco, según se describió en WO 2008/028946.

Para remover un sitio de desamidación potencial en uno de los anticuerpos (CR8059), se generó una mutación en un único aminoácido (CR8071) por medio de una PCR de ensamblaje. De esta manera, se generaron dos fragmentos que comprendieron la mutación deseada, los cuales se combinaron en una proporción equimolar y se usaron como moldes en un segundo procedimiento de PCR, cuyo propósito fue obtener la secuencia completa de la cadena liviana. Las secuencias de nucleótidos de todas las construcciones se verificaron mediante el uso de procedimientos de secuenciación convencionales. Las construcciones de expresión resultantes, que codificaban las cadenas pesadas y livianas de la IgG1 humana, se expresaron de manera transitoria en células HEK293T. Después de una semana, se obtuvieron sobrenadantes que contenían anticuerpos humanos del tipo de la IgG1, los cuales se procesaron sobre la base de protocolos de purificación convencionales. Se empleó una concentración de entre 10 y 0.003 µg/ml de los anticuerpos humanos del tipo de la IgG1 que se mencionaron para analizar su afinidad por diversos antígenos de la proteína HA del virus de la influenza B (datos no presentados). Como anticuerpo de control, se empleó un anticuerpo no relacionado.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR de las cadenas pesadas y livianas de algunas de las moléculas de inmunoglobulinas que se han descrito se proveen en la tabla 5. Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana se proveen más adelante.

EJEMPLO 5.

35 *Reactividad transversal de las IgG contra el virus de la influenza B*

Se analizó la capacidad de unión de determinados anticuerpos contra el virus de la influenza B sobre la base de un procedimiento de FACS. Para este propósito se transfectaron vectores de expresión que comprendían proteínas HA recombinantes completas de diversos virus de la influenza B (B/Mississippi/04/2008, B/Houston/B60/1997, B/Nashville/45/1991, B/Florida/01/2009, B/Mississippi/07/2008 y B/Ohio/01/2005) en células PER.C6®, mediante el uso de lipofectamina (de Invitrogen) en una proporción de 1 a 5. 48 horas después de la transfección, las células PER.C6® en cuya superficie se expresaban las proteínas HA de los virus de la influenza B se sometieron a un análisis de FACS (de Cantoll, BD bioscience), para lo cual se las incubó con anticuerpos del tipo de la IgG durante 1 hora, a lo que siguieron tres pasos de lavado consecutivos en los que se empleó PBS con 0.1% de BSA. Los anticuerpos unidos se detectaron usando un anticuerpo secundario anti-humano conjugado con PE, que también se incubó durante 1 hora. Como control negativo, se usaron células PER.C6® no transfectadas que se incubaron con el anticuerpo secundario. Sobre la base de los resultados del análisis de FACS, puede concluirse que los anticuerpos contra el virus de la influenza B CR8033, CR8059, CR8071, CR10032 y CR10051 se unieron a seis de las proteínas HA que se analizaron (tabla 6).

EJEMPLO 6.

50 *Competición por la unión a la HA de diversas IgG contra la influenza B que presentaban una reactividad transversal*

Se convalidó la capacidad de los anticuerpos del tipo de la IgG contra el virus de la influenza B que se describieron con anterioridad de competir por la unión a diversos epitopes en la proteína HA del virus de la influenza B. Con este propósito, se marcaron virus de las cepas B/Brisbane/60/2008, B/Florida/04/2006 y B/Jillina/20/2003 con biotina, mediante el uso del conjunto de elementos EZ-link y el reactivo sulfo-NHS-LC-LC-biotina (de Pierce). Se combinó 1

5 μ l de una solución de biotina 10 mM con 110 μ g de una HA recombinante, lo que representa un exceso molar del séxtuple para la biotina, y se llevó a cabo una incubación a temperatura ambiente durante 30-40 minutos. La biotina libre, que no fue incorporada, se removió usando un filtro centrífugo Amicon Ultra (de 0.5 ml, con una membrana Ultracel-10K, de Millipore, cat. N° UFC501096). En este contexto, la muestra (de 300 μ l) se cargó en la columna y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga de mesa Eppendorf (20800 rcf). Se descartó la porción eluida, se agregaron 0.4 de un amortiguador a base de DPBS a la columna y se realizó una nueva centrifugación. Este paso se repitió dos veces. La muestra marcada se recuperó volcando el contenido de la columna en un nuevo tubo de recolección, a lo que siguió la adición de 200 μ l de DPBS y una centrifugación a 1000 rpm durante 1 minuto en una centrífuga de mesa. La concentración de la HA se determinó con un aparato Nanodrop ND-1000 (de Thermo Scientific).

15 El análisis de la competición propiamente dicha se llevó a cabo en un instrumento de interferometría Octet-QK Bio-layer (de ForteBio), de acuerdo con los parámetros que se proveen en la tabla 7, mediante el uso de biosensores recubiertos con estreptavidina (de ForteBio, cat. N° 18-5019) que habían sido sumergidos con antelación en un amortiguador cinético a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cuando el segundo anticuerpo pudo unirse a la proteína HA del virus de la influenza B en presencia del primer anticuerpo, se consideró que no hubo competición (véase la tabla 8). Como control, se usó un anticuerpo que podía unirse al tallo, CR9114 (que se describe en la solicitud co-pendiente EP11173953.8), y un anticuerpo que carecía de capacidad de unión, CR8057 (que se describe en WO2010/130636).

20 Los anticuerpos CR10023 y CR10049 pudieron competir por la unión con CR8033. Los anticuerpos CR10032 y CR10051 pudieron competir por la unión con CR8059. El anticuerpo CR10049 pudo competir por la unión con CR10032. Ninguno de los anticuerpos que se analizaron pudo competir por la unión con el anticuerpo que podía unirse al tallo, CR9114. Sobre la base de estos resultados, puede concluirse que en la proteína HA del virus de la influenza B hay al menos tres o cuatro epitopes diferentes (figura 1).

EJEMPLO 7.

Actividad de neutralización transversal de las IgG

30 Con el objetivo de determinar si determinadas IgG podían bloquear virus de la influenza B de diversas cepas, se pusieron en práctica análisis adicionales basados en la neutralización de los virus in vitro (VNA). Estos análisis se llevaron a cabo con células MDCK (ATCC CCL-34) que fueron cultivadas en un medio apropiado (que fue un medio MEM con la adición de HEPES 20 mM y 0.15% (p/v) de bicarbonato de sodio (un medio MEM completo), más 10% (v/v) de suero fetal bovino). Todas las cepas de virus de la influenza B de linajes similares a Yamagata (B/Harbin/7/1994 y B/Florida/04/2006) y a Victoria (B/Malaysia/2506/2004 y B/Brisbane/60/2008) que se empearon en este análisis fueron diluidas hasta alcanzar una concentración de 5.7×10^3 TCID₅₀/ml (la dosis por ml con la que puede alcanzarse una infección de 50% en los tejidos), que se calculó de acuerdo con el método de Spearman y Karber. Las preparaciones que comprendieron las IgG (en una concentración de 100 μ g/ml) se sometieron a dos series de diluciones (entre 1:2 y 1:512) en un medio MEM completo, en cavidades por cuadruplicado. Se mezclaron 50 μ l de cada una de las IgG diluidas con 50 μ l de la suspensión que comprendió el virus (a razón de 100 TCID₅₀/35 μ l) y se llevó a cabo una incubación a 37°C durante una hora. Luego se transfirió la suspensión a cuatro placas de 96 cavidades que comprendían sendos cultivos de células MDCK confluentes en 100 μ l de un medio MEM completo. Antes de usarlas, las células MDCK se sembraron, a razón 2×10^4 células por cavidad, en un medio de cultivo apropiado, se las cultivó hasta la confluencia y se las lavó con entre 300 y 350 μ l de PBS, a un pH de 7.4, para luego agregar 100 μ l de un medio MEM por cavidad. Las células inoculadas se cultivaron durante entre 3 y 4 días a 37°C y se observaron diariamente para determinar la presencia de un efecto citopatogénico (CPE). El CPE se comparó con el control positivo.

45 Los anticuerpos CR8032, CR8033, CR8034, CR8035, CR8059, CR8071, CR10023, CR10032, CR10049, CR10051, CR11035, CR11036, CR11038 y CR11039 presentaron una actividad de neutralización transversal sobre las cepas del virus de la influenza B representativas de los linajes Yamagata y Victoria (véase la tabla 9).

EJEMPLO 8.

Actividad de bloqueo de los receptores de las IgG

50 Con el fin de determinar si determinadas IgG podían bloquear la unión mediada por receptores entre diversas cepas del virus de la influenza B y las células huésped, se puso en práctica un análisis de inhibición de la hemaglutinación (HI). Se diluyeron cepas de virus de la influenza B de linajes similares a Yamagata (B/Harbin/7/1994 y B/Florida/04/2006) y a Victoria (B/Malaysia/2506/2004 y B/Brisbane/60/2008) hasta obtener 8 unidades de HA, lo cual se determinó por medio de un análisis de HAU, y se las combinó con un volumen idéntico de una IgG que había sido sometida a una serie de diluciones y que había sido incubada a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregó un volumen idéntico de eritrocitos de pavo (TRBC) al 0.5% a las cavidades y se continuó con la incubación durante 30 minutos. La formación de botones se tomó como evidencia de la hemaglutinación.

Los anticuerpos CR8059, CR8071, CR10032, CR10051 y CR11036 no presentaron actividad de HI sobre ninguna de las cepas del virus de la influenza B que se analizaron (la concentración fue superior a 10 µg/ml para CR11036 y superior a 50 µg/ml para los otros anticuerpos), por lo que puede concluirse que no bloquearon la unión al receptor. Los anticuerpos CR8033 y CR10023 solamente presentaron actividad de HI sobre las cepas del virus de la influenza B que eran representativas del linaje Yamagata, pero no sobre las cepas representativas del linaje Victoria. El anticuerpo CR11035 presentó actividad HI tan solo sobre una cepa del virus de la influenza B que era representativa del linaje Victoria, pero no sobre las cepas representativas del linaje Yamagata. Los anticuerpos CR10049, CR11038 y CR11039 presentaron actividad de HI sobre cepas del virus de la influenza B que eran representativas de los linajes Yamagata y Victoria (véase la tabla 10).

A modo de abordaje alternativo, se concibió un análisis para determinar el ingreso sobre la base de la inmunofluorescencia, de manera tal de estudiar la capacidad de los anticuerpos de bloquear la unión a los receptores y el ingreso del virus. En este contexto, el virus se sometió a una incubación preliminar con el anticuerpo, en dos pasos basados en sendas diluciones en serie, después de lo cual se lo colocó sobre una monocapa de células MDCK confluentes, en una placa de 96 cavidades que comprendía un medio apropiado para favorecer la infección (DMEM con glutamina 200 mM), durante un período de entre dos y tres horas. Se retiró el inóculo y se lo reemplazó por los anticuerpos en las concentraciones indicadas, a 37°C, durante 16-18 horas y en presencia de 5% de CO₂. Después de este período, se retiraron los sobrenadantes y se fijaron las placas con acetona al 80%, con el propósito de detectar las células sobre la base de la inmunofluorescencia, para lo cual se empleó un anticuerpo primario que fue un anticuerpo monoclonal anti-NP de ratón (de Santa Cruz, sc-52027) y un anticuerpo secundario que fue un anticuerpo anti-ratón unido a Alexa488 (de Invitrogen A11017), a lo que siguió la marca de los núcleos de las células con DAPI (véase la figura 2a). Tal como se había observado en el análisis de la HI, el anticuerpo CR8033 bloqueó de manera específica el ingreso del virus del linaje Yamagata B/Florida/04/2006, pero no el del virus del linaje Victoria B/Malaysia/2506/2004. El anticuerpo CR8059 no bloqueó el ingreso de los virus de la influenza B que se analizaron. Algunas de las placas fueron sometidas a un estudio ulterior con un analizador de imágenes BD Pathway 855. Para determinar el nivel de inhibición del ingreso, se analizó la intensidad de la fluorescencia en cada cavidad, sobre la base de un valor de fondo determinado y en presencia de una cantidad conocida de células infectadas (con una coloración con DAPI para definir las células). En este contexto, se emplearon las herramientas para analizar imágenes de BD Pathway. En la figura 2b se ilustra el porcentaje de células infectadas que se obtuvieron como resultado del tratamiento con los anticuerpos en las diluciones que se indican, en comparación con el porcentaje de células infectadas que se obtuvieron como resultado del tratamiento con el anticuerpo de control, que presentaba una capacidad de unión nula.

EJEMPLO 9.

Inhibición de la salida de las IgG anti-HA

Para investigar el mecanismo de acción del anticuerpo, se analizó la cantidad de partículas del virus que fueron liberadas en el sobrenadante 18 horas después de la infección, en presencia de un tratamiento con anticuerpos. La detección de una señal contra la proteína HA (o su ausencia) en el sobrenadante, que puede llevarse a cabo a través de una electroforesis en gel seguida por una transferencia Western, es indicativa de la presencia (o la ausencia) de partículas del virus liberadas.

Cuatro horas antes del experimento, se sembraron 40000 células MDCK en DMEM/glutamina, en cada cavidad de una placa de 96 cavidades. La cantidad del virus que era necesaria para obtener una infección de entre 90% y 100% había sido determinada en un experimento separado. Se combinó la cantidad necesaria del virus con las células y se llevó a cabo una incubación a 37°C, en presencia de 5% de CO₂. Después de tres horas, se retiraron los sobrenadantes y se sometieron las células a tres lavados con PBS para remover las partículas virales que no habían ingresado. Se restauró la cantidad del medio de infección que comprendía los anticuerpos monoclonales en el que se hallaban las células (para lo cual se llevó a cabo una serie de diluciones, a partir de una concentración de 20 µg/ml). Una vez transcurridas entre 16 y 18 horas a 37°C, en presencia de 5% de CO₂, se extrajeron los sobrenadantes y se lisaron las células remanentes (con una solución que comprendió Tris HCl, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM y 1% (v/v) de Triton-X y que tuvo un pH de 7.5). Las muestras fueron sometidas a una SDS-PAGE en combinación con una transferencia Western para analizar la cantidad de viriones que se liberaron en el sobrenadante, la cual se determinó revelando la transferencia Western con una coloración basada en un anticuerpo policlonal de ratón contra la HA (de Protein Sciences), a lo que siguió la aplicación de un fragmento F(ab')₂ conjugado con HRP (de Jackson Immuno Research Laboratories, 111-036-047). En la figura 3 puede observarse que los anticuerpos CR8033 y CR8059 inhibieron la liberación de las partículas virales de una manera que dependió de la concentración. En otros experimentos, se demostró que al menos CR8071 y CR10051 también inhibieron la liberación de las partículas virales.

Se verificó que las células hubieran sido infectadas de manera apropiada fijando cavidades que habían sido sometidas a un tratamiento idéntico con acetona al 80%. La magnitud de la infección se determinó con una marca basada en la inmunofluorescencia, para lo cual se empleó un anticuerpo primario que fue un anticuerpo monoclonal anti-NP de ratón (de Santa Cruz, sc-52027) y un anticuerpo secundario que fue un anticuerpo anti-

ratón unido a Alexa488 (de Invitrogen A11017). Posteriormente, las placas se estudiaron en un analizador de imágenes BD Pathway 855 (no se presentan los resultados).

EJEMPLO 10.

Análisis de microscopía electrónica de barrido de células infectadas por virus de la influenza B

5 Se sembraron células MDCK en cubreobjetos de vidrio un día antes del experimento. Al día siguiente, las células se infectaron con diversas cantidades del virus, con el propósito de determinar qué cantidad daba como resultado una infección de entre 90% y 100% de las células 18 horas después del ataque. Tres horas después de la infección inicial, se retiraron los sobrenadantes, se sometieron las células a tres lavados con PBS y se agregó un medio que contenía los anticuerpos en la concentración indicada. Una vez transcurridas 15-18 horas adicionales, se removió el
10 medio de cultivo y se fijaron las células en un amortiguador que comprendió 2.5% de glutaraldehído, para luego almacenarlas a 4°C hasta continuar con su análisis. Las muestras fueron sometidas a una fijación química adicional con glutaraldehído (GA) y/o tetróxido de osmio (OsO₄). Antes de poner en práctica el análisis de SEM, los especímenes se sometieron a una deshidratación con acetona y a un secado hasta el punto crítico. Finalmente, las células se montaron en placas de aluminio, se recubrieron con una capa delgada de carbono y se examinaron en un
15 microscopio de SEM Zeiss Ultra 55.

Se observó que la superficie de las células MDCK que habían sido infectadas por los virus de la influenza B estaba cubierta con partículas esféricas que presentaban una densidad electrónica elevada (figura 4b), en contraste con los controles no infectados (figura 4a). La incubación con el anticuerpo CR8059 no impidió la formación de estas partículas esféricas (figura 4c), mientras que la incubación con el anticuerpo CR8033 dio como resultado una
20 disminución notable en la formación de las partículas (figura 4d). En contraste con las células que fueron incubadas con CR8059, no fue posible detectar viriones en desarrollo en las células que fueron incubadas con CR8033 (figuras 4e y f).

EJEMPLO 11.

25 *Actividad profiláctica de anticuerpos monoclonales humanos del tipo de la IgG en presencia de un ataque letal in vivo con virus de la influenza B*

Se puso en práctica un estudio para determinar el efecto profiláctico de los anticuerpos monoclonales CR8033 y CR8071 en presencia de un ataque letal con dos virus de la influenza B in vivo. La eficacia profiláctica de los anticuerpos monoclonales CR8033 y CR8071 se analizó en un modelo basado en un ataque letal en ratones con un virus de la influenza B/Florida/04/2006 que había sido adaptado al ratón, para lo cual se lo había sometido a 5
30 pasajes en tejido pulmonar. El virus de la influenza B adaptado al ratón, que correspondió al pasaje 5, se propagó en huevos de pollo embrionados. Todos los ratones (que fueron ratones Balb/c hembra, con una edad de entre 6 y 8 semanas, n = 8 por grupo) se aclimataron y se alojaron durante un periodo de al menos 4 días antes del comienzo del experimento. Los anticuerpos monoclonales CR8033 y CR8071 fueron administrados por vía intravenosa, en la vena caudal (la vena coccígea), en dosis de 0.06, 0.2, 0.6, 1.7 ó 5 mg/kg, el día previo al ataque (el día -1). Debido a que se asumió que el peso promedio de cada ratón fue de 18 g, se aplicó una dosis fija de 0.2 ml. También se analizó un grupo de control, que fue tratado solamente con el vehículo. El día 0, los ratones fueron sometidos al
35 ataque, que se basó en una inoculación intranasal con 25 veces la LD₅₀ de los virus de la influenza B B/Florida/04/2006. En la figura 5 se ilustran las tasas de supervivencia de los ratones, que se determinaron después de administrar los anticuerpos monoclonales. Los ratones que fueron tratados con dosis de al menos 0.2 mg/kg para CR8033 y de al menos 0.6 mg/kg para CR8071 presentaron tasas de supervivencia que fueron significativamente mayores que las que se determinaron para los animales de control, que solamente fueron tratados con el vehículo.
40

Como alternativa, se analizó la eficacia profiláctica de los anticuerpos monoclonales CR8033 y CR8071 en un modelo basado en un ataque letal en ratones con un virus de la influenza B/Malaysia/2506/2004 que había sido adaptado al ratón, para lo cual éste fue sometido a 4 pasajes en tejido pulmonar. El virus de la influenza B adaptado al ratón, que correspondió al pasaje 4, se propagó en huevos de pollo embrionados. Todos los ratones (que fueron ratones Balb/c hembra, con una edad de entre 6 y 8 semanas, n = 8 por grupo) se aclimataron y se alojaron durante un periodo de al menos 4 días antes del comienzo del experimento. Los anticuerpos monoclonales CR8033 y CR8071 fueron administrados por vía intravenosa, en la vena caudal (la vena coccígea), en dosis de 0.06, 0.2, 0.6,
45 1.7 ó 5 mg/kg, el día previo al ataque (el día -1). Debido a que se asumió que el peso promedio de cada ratón fue de 18 g, se aplicó una dosis fija de 0.2 ml. También se analizó un grupo de control, que fue tratado solamente con el vehículo. El día 0, los ratones fueron sometidos al ataque, que se basó en una inoculación intranasal con 25 veces la LD₅₀ de los virus de la influenza B B/Malaysia/2506/2004. En la figura 5 se ilustran las tasas de supervivencia de los ratones, que se determinaron después de administrar los anticuerpos monoclonales. Los ratones que fueron tratados con dosis de al menos 0.2 mg/kg para CR8033 y de al menos 0,6 mg/kg para CR8071 presentaron tasas de supervivencia que fueron significativamente mayores que las que se determinaron para los animales de control, que solamente fueron tratados con el vehículo.
50
55

ES 2 664 625 T3

Con estos resultados, puede demostrarse que los anticuerpos contra la influenza humana CR8033 y CR8071, que fueron identificados y desarrollados en el contexto de la presente invención, son útiles para proveer protección in vivo contra dosis letales de los virus de la influenza B de los linajes B/Yamagata o B/Victoria, cuando se los administra un día antes de la infección en dosis iguales o superiores a 0.2 ó 0.6 mg/kg, respectivamente.

5 **Tabla 1.** Vista general del segundo procedimiento de amplificación de las regiones VL

Molde	Cebador 5'	Cebador 3'	Producto	Porción compartida en la región PK/PL(%)	Lote	Porción compartida en la región VL (%)
	OK1S	OJK1	K1J1	25		
	OK1S	OJK2	K1J2	25		
K1	OK1S	OJK3	K1J3	10	PK1	30
	OK1S	OJK4	K1J4	25		
	OK1S	OJK5	K1J5	15		
	OK2S	OJK1	K2J1	25		
	OK2S	OJK2	K2J2	25		
K2	OK2S	OJK3	K2J3	10	PK2	4
	OK2S	OJK4	K2J4	25		
	OK2S	OJK5	K2J5	15		
	OK3S	OJK1	K3J1	25		
	OK3S	OJK2	K3J2	25		
K3	OK3S	OJK3	K3J3	10	PK3	1
	OK3S	OJK4	K3J4	25		
	OK3S	OJK5	K3J5	15		
	OK4S	OJK1	K4J1	25		
	OK4S	OJK2	K4J2	25		
K4	OK4S	OJK3	K4J3	10	PK4	19
	OK4S	OJK4	K4J4	25		
	OK4S	OJK5	K4J5	15		
	OK5S	OJK1	K5J1	25		
	OK5S	OJK2	K5J2	25		
K5	OK5S	OJK3	K5J3	10	PK5	1
	OK5S	OJK4	K5J4	25		
	OK5S	OJK5	K5J5	15		
	OK6S	OJK1	K6J1	25		
	OK6S	OJK2	K6J2	25		

ES 2 664 625 T3

K6	OK6S	OJK3	K6J3	10	PK6	5
	OK6S	OJK4	K6J4	25		
	OK6S	OJK5	K6J5	15		
	OL1S	OJL1	L1J1	30		
L1	OL1S	OJL2	L1J2	60	PL1	14
	OL1S	OJL3	L1J3	10		
	OL2S	OJL1	L2J1	30		
L2	OL2S	OJL2	L2J2	60	PL2	10
	OL2S	OJL3	L2J3	10		
	OL3S	OJL1	L3J1	30		
L3	OL3S	OJL2	L3J2	60	PL3	10
	OL3S	OJL3	L3J3	10		
	OL4S	OJL1	L4J1	30		
L4	OL4S	OJL2	L4J2	60	PL4	1
	OL4S	OJL3	L4J3	10		
	OL5S	OJL1	L5J1	30		
L5	OL5S	OJL2	L5J2	60	PL5	1
	OL5S	OJL3	L5J3	10		
	OL6S	OJL1	L6J1	30		
L6	OL6S	OJL2	L6J2	60	PL6	1
	OL6S	OJL3	L6J3	10		
	OL7S	OJL1	L7J1	30		
L7	OL7S	OJL2	L7J2	60	PL7	1
	OL7S	OJL3	L7J3	10		
	OL8S	OJL1	L8J1	30		
L8	OL8S	OJL2	L8J2	60	PL8	1
	OL8S	OJL3	L8J3	10		
	OL9S	OJL1	L9J1	30		
L9	OL9S	OJL2	L9J2	60	PL9	1
	OL9S	OJL3	L9J3	10		

Tabla 2. Vista general del segundo procedimiento de amplificación de las regiones VH

Molde	Cebador 5'	Cebador 3'	Producto	Porción compartida en la región PK/PL (%)	Lote	Porción compartida en la región VH (%)
	OH1S	OJH1	H1J1	10		

	OH1S	OJH2	H1J2	10		
H1	OH1S	OJH3	H1J3	60	PH1	25
	OH1S	OJH4	H1J4	20		
	OH2S	OJH1	H2J1	10		
	OH2S	OJH2	H2J2	10		
H2	OH2S	OJH3	H2J3	60	PH2	2
	OH2S	OJH4	H2J4	20		
	OH3S	OJH1	H3J1	10		
	OH3S	OJH2	H3J2	10		
H3	OH3S	OJH3	H3J3	60	PH3	25
	OH3S	OJH4	H3J4	20		
	OH4S	OJH1	H4J1	10		
	OH4S	OJH2	H4J2	10		
H4	OH4S	OJH3	H4J3	60	PH4	25
	OH4S	OJH4	H4J4	20		
	OH5S	OJH1	H5J1	10		
	OH5S	OJH2	H5J2	10		
H5	OH5S	OJH3	H5J3	60	PH5	2
	OH5S	OJH4	H5J4	20		
	OH6S	OJH1	H6J1	10		
	OH6S	OJH2	H6J2	10		
H6	OH6S	OJH3	H6J3	60	PH6	20
	OH6S	OJH4	H6J4	20		
	OH7S	OJH1	H7J1	10		
H7	OH7S	OJH2	H7J2	10		
	OH7S	OJH3	H7J3	60	PH7	1
	OH7S	OJH4	H7J4	20		
					VH	100%

Tabla 3. Características de cada biblioteca de IgM provenientes de células B de memoria

Biblioteca	Células usadas	Tamaño de la biblioteca	Proporción del ORF intacto
MEM-05-M08	540000 IgM provenientes de células de memoria, extraídos por medio de una FACS a partir de 1 donante	5.9E+07	
MEM-05-M09	775000 IgM provenientes de células de memoria, extraídos por medio de una FACS a partir de 1 donante	2.35E+07	
MEM-05-M10	700000 IgM provenientes de células de memoria,	1.7E+07	

	extraídos por medio de una FACS a partir de 1 donante		
Flu-PBMC-09-M02	1E+07 PBMC totales provenientes de 1 donante	1.0E+07	75%
Flu-Bcell-09-M03	280000 Mac provenientes de células B de 1 donante	2.0E+07	76%
Flu-MEM-09-M08	800000 IgM provenientes de células de memoria, extraídos por medio de una FACS a partir de 1 donante	2.4E+07	85%
Flu-PBMC-10-M03	3E+07 PBMC totales provenientes de 3 donantes (1E+07 PBMC por donante)	2.8E+07	82%
Flu-PBMC-10-M04	3E+07 PBMC totales provenientes de 3 donantes (1E+07 PBMC por donante)	3.1E+07	87%
Flu-PBMC-10-M05	3E+07 PBMC totales provenientes de 3 donantes (1E+07 PBMC por donante)	3.3E+07	89%
Flu-PBMC-11-G01	4E+07 PBMC totales provenientes de 4 donantes (1E+07 PBMC por donante)	>1E+07	82%

Tabla 4. Unión de los fagos scFv a una proteína HA del virus de la influenza B recombinante

	Yamagata		Victoria		
	B/Jilin/20/03	B/Florida/04/06	B/Malaysia/2506/04	B/Ohio/01/05	B/Brisbane/60/08
sc08-013	++	nt	++	++	nt
sc08-032	++	nt	++	++	nt
sc08-033	++	++	++	+++	++
sc08-034	++	nt	++	++	nt
sc08-035	++	nt	++	++	nt
sc08-059	++	++	++	++	++
sc10-023	++	++	+	++	+
sc10-032	+++	+++	++	+++	+++
sc10-049	+++	+++	+++	+++	+++
sc10-051	+++	+++	+++	+++	+++
sc11-035	nt	+++	nt	++	++
sc11-036	nt	+++	nt	+++	+++
sc11-038	nt	++	nt	++	+++
sc11-039	nt	+++	nt	++	+++

+++ : unión fuerte; ++ : unión; + : unión débil; - : sin unión; nt : no analizado

Tabla 5A. Secuencias de aminoácidos de las CDR de la cadena pesada de determinados anticuerpos

CR N°	Locus en la región VH	CDR1-HC (identificador de secuencia)	CDR2-HC (identificador de secuencia)	CDR3-HC (identificador de secuencia)
CR8033	IGHV3-9*01	GFSFDEYT (1)	INWKG NFM (2)	AKDRLESSAMDILEGGTFDI (3)

ES 2 664 625 T3

CR8059	IGHV1-18*01	GYIFTESG (7)	ISGYSGDT (8)	ARDVQYSGSYLGAYYFDY (9)
CR8071	IGHV1-18*01	GYIFTESG (7)	ISGYSGDT (8)	ARDVQYSGSYLGAYYFDY (9)
CR10023	IGHV3-9*01	GFTFDDYA (14)	INWVSTTM (15)	AKDRLESAIDILEGGTFDI (16)
CR10032	IGHV4-39*02	GGSSINSSPYK (20)	FYYDGST (21)	AAYCSSISCHAYDYMN (22)
CR10049	IGHV3-23*04	GFTFSSYA (26)	LSDESTT (27)	AEDLGTVMDSYYYGMNV (28)
CR10051	IGHV1-46*01	GDTFTNYH (31)	INPSGGDT (32)	ATDESPGLLTGLRDYWYYYGMDV (33)
CR11024	IGHV1-2*02	GYSFTGY (35)	INPISGDT (36)	ARVAGEDWFGDLDY (37)
CR11035	IGHV1-18*01	GYAFNGYG (40)	INTYKVNT (41)	ARDWGGPFGNAFD (42)
CR11036	IGHV1-46*01	GYAFTSYY (45)	MNLHGGST (46)	ARESPDSSGYPGYGMDV (47)
CR11038	IGHV1-46*01	GYAFTSYY (45)	MNPHGGST (50)	ARESPDSSGYPGYGMDV (47)
CR11039	GHV1-18*01	GYAFTGYG (54)	INTYKFNT (55)	ARDWAGPFGNAFDV (56)
CR08031	IGHV3-9*01	GFTFDEYI (59)	INWKGNFM (2)	AKDRLESSAMDILEGGTFDI (3)
CR08032	IGHV3-9*01	GFSFDEYI (61)	INWKGNFM (2)	AKDRLESSAMDILEGGTFDI (3)
CR08034	IGHV3-9*01	GFTFDEYI (59)	INWKGNFM (2)	AKDRLESSAMDILEGGTFDI (3)
CR08035	IGHV3-9*01	GFTFDEYI (59)	INWKGNFM (2)	AKDRLESSAMDILEGGTFDI (3)

Tabla 5B. Secuencias de aminoácidos de las CDR de la cadena liviana de determinados anticuerpos

CR Nº	Locus en la región VL	CDR1-LC (identificador de secuencia)	CDR2-LC (identificador de secuencia)	CDR3-LC (identificador de secuencia)
CR8033	IGKV3-20*01	QSVSSSY (4)	GAS (5)	QQYGSSPWT (6)
CR8059	IGLV1-47*01	SSNIGTNY (10)	RSY (11)	ATWDDSLNGWV (12)
CR8071	IGLV1-47*01	SSNIGTNY (10)	RSY (11)	ATWDDSLDGWV (13)
CR10023	IGLV2-8*01	SSDVGGYNY (17)	DVS (18)	SSYASGSTYV (19)
CR10032	IGKV2-28*01	QSLRHENGYNY (23)	LGS (24)	MQALTQTLT (25)
CR10049	IGKV2-28*01	QSLHNSGLNY (29)	LGS (24)	MQALQTPFT (30)
CR10051	IGKV3-20*01	QSVSSSY (4)	GAS (5)	QQYGSSPLCS (34)
CR11024	IGKV3-20*01	QSVSSSY (4)	GTS (38)	QQYGSSPRT (39)

ES 2 664 625 T3

CR1103 5	IGKV1-39*01	QSVGSY (43)	GAS (5)	QQSYSTPRT (44)
CR1103 6	IGKV3-20*01	QSVSSDF (48)	GTS (38)	QQYGSSTWT (49)
CR1103 8	IGLV1-44*01	RSNIGSNP (51)	TND (52)	AAWDDSLKGWV (53)
CR1103 9	GHV1-18*01	QDISDY (57)	GAS (5)	QQYGNLPPT (58)
CR0803 1	IGLV2-14*01	SSDVGGYNY (17)	DVS (18)	SSYTSSSTHV (60)
CR0803 2	IGLV2-14*01	RRDVGDYKY (62)	DVS (18)	SSYTTSNTRV (63)
CR0803 4	IGKV1-17*01	QGIRND (64)	AAS (65)	QQANTYPLT (66)
CR0803 5	IGLV3-19*01	SLRSYY (67)	GKN (68)	DSRDSSGTHYV (69)

Tabla 6. Unión de la IgG purificada a la proteína HA del virus de la influenza B expresada en las células

	Yamagata			Victoria		
	Nashville/45/91	Mississippi/04/08	Houston/B0/97	Mississippi/07/08	Florida/01/09	Ohio/01/05
CR8031	++	NT	NT	NT	-	NT
CR8032	+++	+	NT	++	-	NT
CR8033	++	++	++	++	++	++
CR8034	++	NT	NT	NT	-	NT
CR8035	+++	+	+++	+	-	++
CR8059	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CR8071	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CR10023	+++	-	+++	-	-	-
CR10032	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CR10049	+	-	+	-	-	+
CR10051	++	++	++	++	++	++

+++ : unión fuerte; ++ : unión; + : unión débil; - : sin unión

Tabla 7. Análisis de la competición en un octeto de placas

	Paso				
	Línea basal 1	Carga de HA	Línea basal 2	Asociación, 1ª IgG (15 µg/ml)	Asociación/ competición, 2ª IgG (15 µg/ml)
Duración (segundos)	60	1200	60	700	700
Hilera A	Amortiguador cinético	Proteína HA del virus de la influenza B marcada con biotina, 10 µg/ml	Amortiguador cinético	CR8033	CR8033 en la 2ª medición, junto con CR8059, entre otros
Hilera B				CR8059	
Hilera C				CR10023	
Hilera D				CR10032	
Hilera E				CR10049	
Hilera F				CR10051	
Hilera G				CR9114*	
Hilera I				CR8057*	

*anticuerpos de control (CR9114: unión, CR8057: ausencia de unión)

Tabla 8. Análisis de la competición con la proteína HA del virus de la influenza B

	CR8033	CR8059	CR10023	CR10032	CR10049	CR10051	CR9114	CR8057
CR8033	x	N	S	N	S	N	N	N
CR8059	N	x	N	S	N	S	N	N
CR10023	S	N	x	S	S	N	N	N
CR10032	N	S	S	x	S	S	N	N
CR10049	S	N	S	N	x	N	N	N
CR10051	N	S	N	S	N	x	N	N
CR9114	N	N	N	N	N	N	x	N
CR8057	-	-	-	-	-	-	-	-

S: competición; N: sin competición; X: competición interna; -: sin unión

Tabla 9. Análisis de la neutralización del virus con cepas del virus de la influenza B

VNA	Yamagata		Victoria	
	B/Harbin/7/1994	B/Florida/04/2006	B/Malaysia/2506/2004	B/Brisbane/60/2008
CR8031	1.24	0.88	>50*	NT
CR8032	0.69	0.69	3.88*	NT
CR8033	0.03	0.02	0.88*	5.95
CR8034	0.29	0.12	2.31*	NT
CR8035	0.66	0.66	4.46*	NT
CR8059	2.39	3.23	17.68*	4.55
CR8071	2.34	2.12	14.87*	3.72
CR10023	0.26	≤0.55	12.5*	7.07
CR10032	12.5	21.02	53.03*	35.36
CR10049	4.42	1.3	25*	35.36
CR10051	0.28	0.63	1.77*	1.51
CR11035	0.16	≤0.06	0.53*	0.93
CR11036	0.02	≤0.06	0.22*	≤0.14
CR11038	0.05	≤0.06	2.1*	0.55
CR11039	0.02	≤0.06	0.06*	≤0.14

NT: no analizado

5 *el análisis se realizó con 25TCID

Tabla 10. Análisis de inhibición de la hemaglutinación con cepas del virus de la influenza B

HI	Yamagata		Victoria	
	B/Harbin/7/1994	B/Florida/04/2006	B/Malaysia/2506/2004	B/Brisbane/60/2008
CR8033	0.39	0.22	>50	>50
CR8059	>50	>50	>50	>50
CR8071	>50	>50	>50	>50
CR10023	1.1	1.56	>50	>50
CR10032	>50	>50	>50	>50
CR10049	>50	1.1	4.42	35.36
CR10051	>50	>50	>50	>50
CR11035	NT	>10	NT	0.26
CR11036	NT	>10	NT	>10
CR11038	NT	1.25	NT	0.31
CR11039	NT	0.63	NT	0.44

NT: no analizado

SECUENCIAS

>SC08-033, ADN de la región VH (SEQ ID N° 70)

5 GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCCTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTGTCTGTGCAGCC
TCTGGATTCAGCTTTGATGAGTACACCATGCATTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCCG
CAGGTATTAATTGAAAGGTAATTTTCATGGGTTATGCGGACTCTGTCCAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA
ACGGCAAGAACTCCCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGATTACTGTGCAAAA
10 GACCGGCTGGAGAGTTCAGCTATGGACATTCTAGAAGGGGGTACTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGT
CACC

>SC08-033, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 71)

EVQLVETGGGLVQPGRSLRLSCAASGFSFDEYTMHWVRQAPGKGLEWVAGINWKG NFMGYADSVQGRFTISRDNQ
KNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDRLESSAMDILEGGTFDIWGGQTMVT

>SC08-033, ADN de la región VL (SEQ ID N° 72)

15 GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGC
CAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCT
ATGGTGCATCCACCAGGGCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCCAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCACTCT
CACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATCTTGCAAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGACGT
TCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAAC

20 >SC08-033, Proteína de la región VL (SEQ ID N° 73)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA STRATGIPARFSGSGSDFTLTISRL
EPEDLAVYYCQQYGSSPWFQGGTKVEIK

>SC08-059, ADN de la región VH (SEQ ID N° 74)

25 GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAGGGTCTCCTGCAGGGCC
TCTGGTTACATCTTTACCGAATCTGGTATCACCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG
ATGGATCAGCGTTACAGTGGTGACACAAAATATGCACAGAACTCCAGGGCAGAGTCAACCATGACCAAAGACA
CATCCACGACCACAGCCTACATGGAATTGAGGAGCCTGAGATATGACGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGA
GACGTCCAGTACAGTGGGAGTTATTTGGGCGCCTACTACTTTGACTATTGGAGCCCCGGGAACCCTGGTCACCGT
CTCGAGC

30 >SC08-059, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 75)

EVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCRASGYIFTESGITWVRQAPGQGLEWMGWISGYSGDTKYAQLQGRVTMTKDTS
TTTAYMELRSLRYDDTAVYYCARDVQYSGSYLGAYYFDYWSPGLTVTVSS

>SC08-059, ADN de la región VL (SEQ ID N° 76)

5 TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAA
GCAGCTCCAACATCGGAATAATTATGTATACTGGTACCAGCAGTCCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCT
ATAGGAGTTATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCTCCTCAGCCTCCCTG
GCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAACATGGGATGACAGCCTGAATGGTTG
GGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG

>SC08-059, Proteína de la región VL (SEQ ID N° 77)

10 SYVLTQPPSASGTPGQRVVISCSGSSSNIGTNYVYQQFPGTAPKLLIYRSYQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLNGWVFGGGTKLTVL

>CR08071, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 78)

QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCRASGYIFTESGITWVRQAPGQGLEWMGWISGYSGDTKYAQLQGRVTMTKDTS
TTTAYMELRSLRYDDTAVYYCARDVQYSGSYLGAYYFDYWSPGLTVTVSS

15 >CR08071, Proteína de la región VL (SEQ ID N° 79)

QSVLTQPPSASGTPGQRVVISCSGSSSNIGTNYVYQQFPGTAPKLLIYRSYQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAIS
GLQSEDEADYYCATWDDSLDNGWVFGGGTKLTVLRK

>SC10-051, ADN de la región VH (SEQ ID N° 80)

20 GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTAGAACTTTCCTGCAAGGCAT
CTGGAGACACCTTCACCAACTACCATATACACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG
AATAATCAATCCTAGTGGTGGTGACACAGACTACTCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACCTGACCAGGGACA
GGTCCACAAACACATTCTATATGAAGTTGGCCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGACA
GATGAGAGTCCCGACTTTTGACTGGCCTTCGGGATTACTGGTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAGG
GGACCACGGTCACCGTCTCGAG

25 >SC10-051, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 81)

EVQLVQSGAEVKKPGASVELSCKASGDTFTNYHIHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGD TDYSQKFQGRVTLTRDRST
NTFYMKLASLRSEDTAVYYCATDESPGLLTGLRDYWYYYGMDVWVWGGTTVTVS

>SC10-051, ADN de la región VL (SEQ ID N° 82)

30 GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGC
CAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCT
ATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCT
CACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACAGATATGGTAGCTCACCTCTGTGCA
GTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC

>SC10-051, Proteína de la región VL (SEQ ID N° 83)

35 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL
EPEDFAVYYCQQYGSPLCSFGQGTKLEIK

>SC10-049, ADN de la región VH (SEQ ID N° 84)

40 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCT
CACGTCTTAGTGATGAAAGTACCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGACAATT
CCAAGAACACACTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAAGCCGACGACACGGCCATATATTACTGTGCGGAGGAT
CTGGGGACGGTGTGACTCCTACTACTACGGTATGAACGTCTGGGGCCAGGGACCACGGTCACCGTCTCGA
G

> SC10-049, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 85)

45 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSRLSDESTYYADSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLKADDTAIYYCAEDLGTVMDSYYYGMNVWVWGGTTVTVS

>SC10-049, ADN de la región VL (SEQ ID N° 86)

ES 2 664 625 T3

- GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTC
TAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGACTCAATTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACA
GCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACA
5 GATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACT
CCTTTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC
- >SC10-049, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 87)
- DVVMTQSPSLPVPTEPASPISCRSSQSLLHSNGLNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSDTFT
LKISRVEAEDVGVVYCMQALQTPFTFGGGTKVEIK
- >SC10-023, ADN de la región VH (SEQ ID N° 88)
- 10 GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCATGCATTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTC
AGGTATTAATTGGGTTAGTACTACCATGGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACA
ACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAA
15 GATAGGCTGGAGAGTGCAGCTATAGACATTCTAGAAGGGGGTACTTTTGATATCAGGGGCCAAGGGACAATGGT
CACCGTCTCGAGCG
- >SC10-023, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 89)
- EVQLVETGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGINWVSTTMGYADSVKGRFTISRDN
KNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDRLESAIDILEGGTFDIRGQGMVTVSS
- >SC10-023, ADN de la región VL (SEQ ID N° 90)
- 20 CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGCTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAAC
CAGCAGTGATGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGA
TTTATGATGTGAGTAAGCGGCCCTCAGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGGTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCC
CTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGAATATTACTGCAGCTCATATGCAAGCGGCAGCACTTA
TGCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG
- 25 >SC10-023, Proteína de la región VL (SEQ ID N° 91)
- QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTI
SGLQAEDEAEYYCSSLASGTYVFGTGKVTVL
- >SC10-032, ADN de la región VH (SEQ ID N° 92)
- 30 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGGCACCCTGTCCCTCACCTGCAATGTCT
CTGGTGGCTCCATCAACAGTAGTCCCTATAAGTGGGCCTGGATCCGCCAGTCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG
GATTTGGACTTTCTATTATGATGGGAGCACCGACTACAACCCGTCCCTCCAGAGTCCGACTCACCATTTCGGGAG
ACATGTCCAGTAACCACTTCTCCTTGAGGCTGAGTCTGTGACCGCCGACACACGGCTGTGTATTACTGTGCG
GCCTATTGTAGTAGTATAAGCTGCCATGCCTATTACGACTACATGAACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCAC
CGTCTCGAGC
- 35 >SC10-032, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 93)
- QVQLQESGPGLVKPSGTLSTLCNVSGGSINSSPYKAWIRQSPGKLEWIGTFYYDGDSTDYNPSLQSRITISGDMSS
NHFSLRLRSVTAADTAVYYCAAYCSSISCHAYDYMNWVGKTTVTVSS

ES 2 664 625 T3

>SC10-032, ADN de la región VL (SEQ ID N° 94)

5 GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTC
TAGTCAGAGCCTCCGACATGAGAATGGATACTAATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAC
AGCTCCTGATGATTTGGGTTCTGTTCCGGCCCTCCGGGTCCCTGACAGGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGCAC
AGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAAC
GCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC

>SC10-032, Proteína de la región VL (SEQ ID N° 95)

EIVLTQSPVSLPVPVTPGEPASISCRSSQSLRHENGYNYLDWYLQKPGQSPQLLMYLGSVRASGVPDRFSGSGSGTDFT
LKISRVEAEDVGVVYCMQALQTLTFGGGKLEIK

10 >SC11-024, ADN de la región VH (SEQ ID N° 96)

15 GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAATTAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTT
CTGGATACAGCTTACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGACCTGAGTGGATGGG
GCGGATCAACCCTATCAGTGGTGACACAACTATGCACAGAGTTTCAGGGCAGGGTCACCTGACCAGGGAC
AGGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCGGGCTGAAATCTGACGACACGGCCGTATATTTCTGTGCGA
GAGTCGCGGGTGAAGATTGGTTCGGGGATCTTACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCGAGCG

>SC11-24, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 97)

EVQLVQSGAEIKKPGASVKVSKASGYSFTGYMHVWRQAPGQGPPEWMGRINPISGDTNYAQRFFQGRVTLTRDRS
TSTAYMELSLKSDDAVYFCARVAGEDWFGDLDYWGQGLTVVSS

>SC11-024, ADN de la región VL (SEQ ID N° 98)

20 GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG
CCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC
TTTGGAAACATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGTTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTC
TCACCATCAGCAGGCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCGGACG
TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC

25 >SC11-024, Proteína de la región VL (SEQ ID N° 99)

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQKPGQAPRLLIFGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL
EPEDFAVYYCQQYGSSPRTFGQGTKVEIK

>SC11-035, ADN de la región VH (SEQ ID N° 100)

30 CAGGTGCAGCTGGTACAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGACCT
CTGGTTACGCCTTAAACGGCTACGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGC
ATGGATCAACACTTACAAAGTTAACACACATTATGCACAGAATCTCCGGGGCAGGGTCACCGTGAGCATAGACA
CATCCACGACCACAGCCTATATGGAAGTGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGA
GACTGGGGTGGGCCGTTTGGGAACGCTTTTGAATTTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAACCGTCTCGAGCG

>SC11-035, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 101)

35 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKTSGYAFNGYGISVWRQAPGQGLEWVAVWINTYKVNTHYAQNLRGRVTVSIDS
TTAYMELRSLRSDDAVYYCARDWGGPFGNAFDWGGQTMVTVSS

>SC11-035, ADN de la región VL (SEQ ID N° 102)

40 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGCATCTATAGGAGACAGTGTCAACCATCACTTGCCGGGC
AAGTCAGAGCGTTGGCTCTTACTTAAATTTGGTATCAGCAAAAACAGGGAAAGCCCCTAAGTTGTTGATCTATGG
TGCATCCAATGTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGTTTGTGGCAGTGAAGTCTGGGACAGAGTCCACACTCAACA
TCAACAATCTGCAGCCTGAAGATTCTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTAGAACGTTCCGGCC
AAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

ES 2 664 625 T3

>SC11-035, Proteína de la región VL (SEQ ID N° 103)

DIQMTQSPSSLAASIGDSVTITCRASQSVGSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYGASNVQSGVPSRFSGSESGTESTLTINNL
QPEDSATYYCQQSYSTPRTFGQGTKVEIK

>SC11-036, ADN de la región VH (SEQ ID N° 104)

5 GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGACGGTTTCCTGCAAGGCA
TCTGGATACGCCTTCACCAGCTACTATTTACACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGG
GGATAATGAATCTTCATGGTGGTAGCACAACTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGAC
ACGTCCACGAGGACAGTTTACATGGAGCTGAGCGCCCTGAGATCTGAGGACTCGGCCGTATATTACTGTGCC
10 GAGAGAGTCCCGATAGCAGTGGTTATCCTGGCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGGACCACGGTAC
CGTCTCGAGC

>SC11-036, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 105)

EVQLVQSGAEVKKPGASVTVSCKASGYAFTSYLHWVRQAPGQGLEWMGIMNLHGGSTTYAQKFQGRVTMTRDTS
TRTVYMELSLRSEDSAVYYCARESPDSSGYPGYYGMDVWGQGTIVTVSS

>SC11-036, ADN de la región VL (SEQ ID N° 106)

15 GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCCTGCAGGGC
CAGTCAGAGTGTTAGCAGCGACTTCTTCGCCTGGTACCAGCAGAAACGTGGCCAGACTCCCACCCTCCTCATCT
ATGGTACATCCACCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACACT
CAGCGTCGCCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCACTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCGACGTGGACGT
TCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

20 >SC11-036, Proteína de la región VL (SEQ ID N° 107)

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSDFFAWYQQKRGQTPTLLIYGTSTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLSVAR
LEPEDFAVYYCQYGSSTWTFGQGTKVEIK

>SC11-038, ADN de la región VH (SEQ ID N° 108)

25 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCA
TCTGGATACGCCTTCACCAGCTACTATTTGCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGG
GGATAATGAACCCTCATGGTGGTAGCACAACTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGA
CACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCC
CGAGAGAGTCCCGATAGTAGTGGTTATCCTGGCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCGAGC

30 >SC11-038, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 109)

EVQLVESGAEVKKPGASVKVSKASGYAFTSYLHWVRQAPGQGLEWMGIMNPHGGSTTYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARESPDSSGYPGYYGMDVWGQGTIVTVSS

>SC11-038, ADN de la región VL (SEQ ID N° 110)

35 TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATGTCTTGTCTGGAA
GCAGATCCAACATCGGATCTAATCCTGTAAGCTGGTTCAGCAACTCCCGGAATGGTCCCCAACTCCTCATC
TATACTAATGATCAGCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCCCTCAGCCTCCCT
GGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAAAGGTT
GGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG

>SC11-038, Proteína de la región VL (SEQ ID N° 111)

40 SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGSRSNIGSNPVSWFQQLPGMVPKLLIYTNDQRPSGVPDRFSGSKSGPSASLAIS
GLQSEDEADYYCAAWDDSLKGVVFGGGTKLTVL

>SC11-039, ADN de la región VH (SEQ ID N° 112)

45 GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTGTGAAGATCTCCTGTAAGACTT
CTGGTTACGCCTTTACCGGCTACGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATGGG
ATGGATCAACACTTACAAATTTAACACAAATTATGCACAGAACCTGCAGGGCAGAGTCACCATGACCATAGACAC
ATCCACGAGCGCAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATATGAGGACACGGCCGTATATTTCTGTGCGAGA
GACTGGGCTGGGCCGTTTGGGAATGCTTTTGTGTCTGGGGCCAGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGCG

>SC11-039, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 113)

EVQLVQSGAEVKKPGESVKISCKTSGYAFTGYGISWVRQAPGQGLEWMGWINTYKFNTNYAQNLRVTMTIDTST
 SAAYMELRSLRYEDTAVYFCARDWAGPFGNAFDVWGQGMVTVSS

>SC11-039, ADN de la región VL (SEQ ID N° 114)

5 ACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTATAGGAGACAGAGTCGCCATCACTTGCCAGGCG
 AGTCAGGACATTAGCGACTATTTAAATTGGTATCAGCAACAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGCTCTACGGT
 GCATCCAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCCACCATC
 AGCAGCCTGCAGCCTGAAGACATTGCAACATATTATTGTCAACAGTATGGTAATCTCCCTCCGACTTTCCGGCGGG
 GGGACCAAGCTGGAGATCAAAC

>SC11-039, Proteína de la región VL (SEQ ID N° 115)

10 IQMTQSPSSLSASIGDRVAITCQASQDISDYLWYQQQPGKAPKLLLYGASNLETGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQ
 PEDIATYYCQQYGNLPPTFGGGTKLEIK

>SC09-114, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 116)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKSSGGTSNNYAIWVRQAPGQGLDWMGGISPIFGSTAYAQKFQGRVTISADIFSN
 TAYMELNSLTSEDVAVYFCARHGNYYYYSGMDVWGQTTVTVSS

15 >SC09-114, Proteína de la región VL (SEQ ID N° 117)

SYVLTQPPAVSGTPGQRVTISCSGSDSNIGRRSVNWyQQFPGTAPKLLIYSNDQRPSVVPDRFSGSKSGTSASLAIS
 GLQSEDEAEYYCAAWDSDLKGAVFGGGTQLTVL

>SC08-031, ADN de la región VH (SEQ ID N° 118)

20 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTACAGCCTGGCAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
 TCTGGATTCACCTTTGATGAGTATATCATGCATTGGGTCCGGCAAGCTCCCGGGAAGGGCCCGGAATGGGTCCG
 CAGGTATTAATTGGAAAGGTAATTCATGGGTTATGCGGACTCTGTCCAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA
 ACGCCAAGAACTCCCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGACGACACGGCCTTATATTACTGTGCAAAAAG
 ACCGGCTGGAGAGTTCAGCTATGGACATTCTAGAAGGGGGTACTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTC
 ACC

25 >SC08-031, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 119)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDEYIMHWVRQAPGKGPPEWVAGINWKG NFMGYADSVQGRFTISRDN
 A KNSLYLQMNSLRADDTALYYCAKDRLESSAMDILEGGTFDIWGGQTMVT

>SC08-031, ADN de la región VL (SEQ ID N° 120)

30 CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAAC
 CAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGA
 TTTATGATGTCAGTAGTCGGCCCTCAGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCGACACGGCCTCC
 CTGAGCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTACTGTCAGCTCATATACAAGCAGCAGCACTCA
 TGTCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG

>SC08-031, Proteína de la región VL (SEQ ID N° 121)

35 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSSRPSGVS NFRFSGSKSGDTASLSI
 SGLQAEDEADYYC SSYTSSSTHVFGTGKVTVL

>SC08-032, ADN de la región VH (SEQ ID N° 122)

40 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTACAGCCTGGCAGGTCCTGAGACTGTCCTGTGCAGCC
 TCTGGATTCAGCTTTGATGAGTACATCATGCATTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCCG
 CAGGTATTAATTGGAAAGGTAATTCATGGGTTATGCGGACTCTGTCCAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA
 ACGGCAAGAACTCCCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAA
 GACCGGCTGGAGAGTTCAGCTATGGACATTCTAGAAGGGGGTACTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGT
 CACCGTCTCGAGC

>SC08-032, Proteína de la región VH (SEQ ID N° 123)

45 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFSFDEYIMHWVRQAPGKGLEWVAGINWKG NFMGYADSVQGRFTISRDN
 G KNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDRLESSAMDILEGGTFDIWGGQTMVTVSS

>SC08-032, ADN de la región VL (SEQ ID N° 124)

ES 2 664 625 T3

- 5 CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAAC
CCGCAGGGACGTTGGTGATTATAAGTATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGA
TTTATGATGTGAGTAATCGGCCCTCAGGGTCTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCACGGCCTCC
CTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTATTGCAGTTCATACACAACCAGCAACTCG
GGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG
- >SC08-032, Proteína de la región VL (SEQ ID Nº 125)
- QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTRRDVGDYKYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGTTASLTI
SGLQAEDEADYYCSSLTNSNTRVFGGGTKLTVL
- >SC08-034, ADN de la región VH (SEQ ID Nº 126)
- 10 GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCCTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTTGATGAGTATATCATGCATTGGGTCCGGCAAGTCCCGGGAAGGGCCCGGAATGGGTCTG
CAGGTATTAATTGAAAAGGTAATTTTCATGGGTTATGCGGACTCTGTCCAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA
ACGCCAAGAACTCCCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGACGACACGGCCTTATATTACTGTGCAAAAAG
ACCGGCTGGAGAGTTCAGCTATGGACATTCTAGAAGGGGGTACTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTC
15 ACCGTCTCGAGC
- >SC08-034, Proteína de la región VH (SEQ ID Nº 127)
- EVQLVETGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDEYIMHWVRQAPGKGPPEWVAGINWKG NFMGYADSVQGRFTISRDN
KNSLYLQMNSLRADDTALYYCAKDRLESSAMDILEGGTFDIWGQGTMTVSS
- >SC08-034, ADN de la región VL (SEQ ID Nº 128)
- 20 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGC
AAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATG
CTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGTTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACC
ATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAACACTTATCCACTCACTTTCCGGC
GAGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC
- 25 >SC08-034, Proteína de la región VL (SEQ ID Nº 129)
- DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSL
QPEDFATYYCQANTYPLTFGGGTKLEIK
- >SC08-035, ADN de la región VH (SEQ ID Nº 130)
- 30 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTTGATGAGTATATCATGCATTGGGTCCGGCAAGTCCCGGGAAGGGCCCGGAATGGGTCTG
CAGGTATTAATTGAAAAGGTAATTTTCATGGGTTATGCGGACTCTGTCCAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA
ACGCCAAGAACTCCCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGACGACACGGCCTTATATTACTGTGCAAAAAG
ACCGGCTGGAGAGTTCAGCTATGGACATTCTAGAAGGGGGTACTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTC
ACCGTCTCGAGC
- 35 >SC08-035, Proteína de la región VH (SEQ ID Nº 131)
- EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDEYIMHWVRQAPGKGPPEWVAGINWKG NFMGYADSVQGRFTISRDN
KNSLYLQMNSLRADDTALYYCAKDRLESSAMDILEGGTFDIWGQGTMTVSS

ES 2 664 625 T3

>SC08-035, ADN de la región VL (SEQ ID N° 132)

5 TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGA
CAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTTCATCTATGGTA
AAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAAGAAACACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTATTGTGACTCCCGGGACAGCAGTGGAAACCCATTATGTCTT
CGGAGGTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG

>SC08-035, Proteína de la región VL (SEQ ID N° 133)

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVPLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSRNTASLTITGA
QAEDEADYYCDSRDSSGTHYVFGGGTKVTVL

10 REFERENCIAS

Brochet et al., Nucl. Acids Res., 36, W503-508 (2008).

De Kruif, J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 3938 (1995).

Kanegae et al., J. Virol., 64: 2860-2865 (1990).

Kubota-Koketsu et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 387: 180-185 (2009).

15 Rota et al., J. Gen. Virol., 73: 2737-2742 (1992).

Thompson et al., JAMA, 289(2): 179-186 (2003).

Thompson et al., JAMA, 292(11): 1333-1340 (2004).

Wrarmert et al., Nature, 453: 667-672 (2008).

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión que puede unirse de manera específica a la hemaglutinina (HA) de las cepas del virus de la influenza B de los linajes B/Yamagata y B/Victoria y puede neutralizar dichas cepas del virus de la influenza B de los linajes B/Yamagata y B/Victoria, donde la molécula de unión no puede unirse a la HA del virus de la influenza A; y donde la molécula de unión comprende una CDR1 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido como la que se detalla en SEQ ID N° 7, una CDR2 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 8 y una CDR3 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 9, así como una CDR1 de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 10, una CDR2 de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 11 y una CDR3 de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla ID. N° 12 o SEQ ID N° 13.
2. Una molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1, donde la molécula de unión puede unirse a la región principal de la proteína HA de los virus de la influenza B, particularmente a la región principal de la proteína HA1 de los virus de la influenza B.
3. Una molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde la molécula de unión comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 75 y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 77.
4. Una molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde la molécula de unión comprende una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 78 y una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 79.
5. Una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la molécula de unión inhibe la salida del virus de la influenza B de las células infectadas.
6. Una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la molécula de unión es un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento de unión al antígeno de éste.
7. Un inmunocombinado que comprende al menos una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes y al menos una marca.
8. Una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un inmunocombinado de acuerdo con la reivindicación 7 y/o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso como medicamentos, preferiblemente en el diagnóstico, la profilaxis y/o el tratamiento de una infección de influenza provocada por un virus de la influenza B.
10. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o un inmunocombinado de acuerdo con la reivindicación 7, así como un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
11. Un método para detectar una infección provocada por un virus de la influenza B, que comprende:
 - (a) determinar el nivel de un antígeno del virus de la influenza B en una muestra biológica mediante el uso de una molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1-6 y/o de un inmunocombinado de acuerdo con la reivindicación 7; y
 - (b) comparar el nivel que se ha determinado para el antígeno del virus de la influenza B con un nivel de control, donde un incremento en el nivel que se ha determinado para el antígeno del virus de la influenza B, con relación al nivel de control del antígeno del virus de la influenza B, es indicativo de una infección provocada por un virus de la influenza B.

FIG. 1

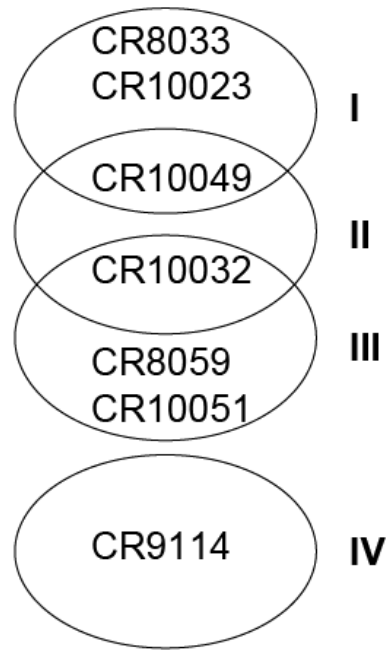


FIG. 2

A.

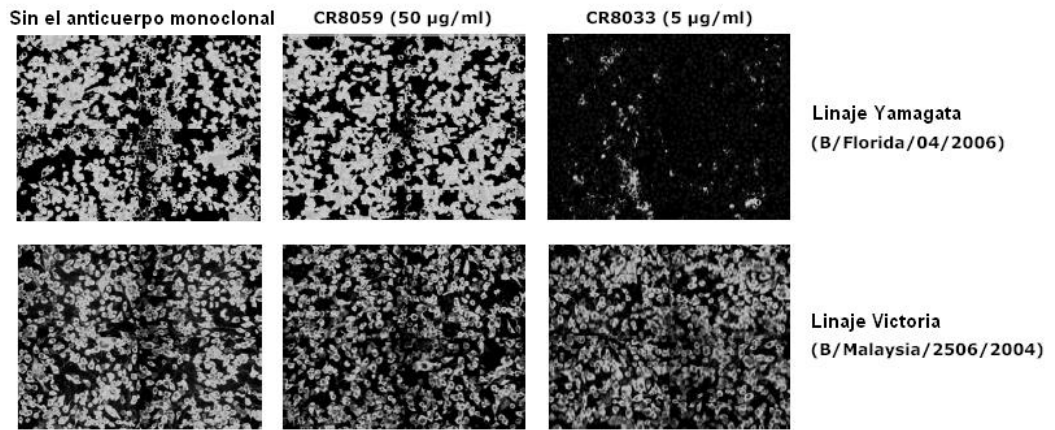


FIG.2

B.

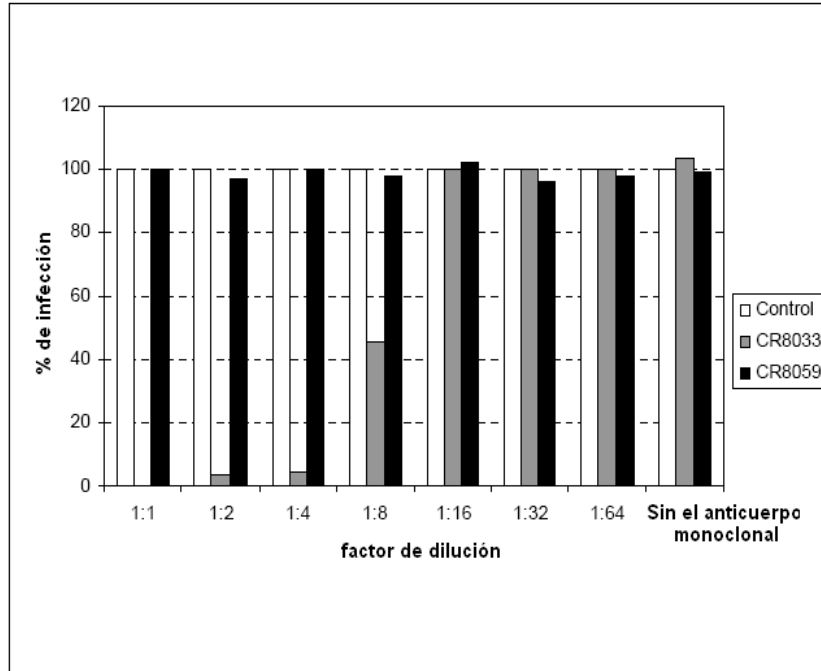


FIG. 3

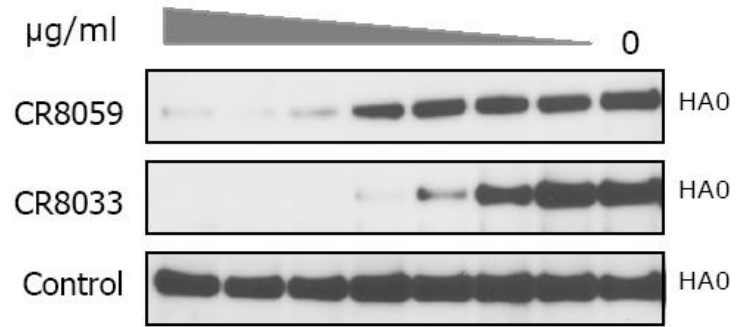
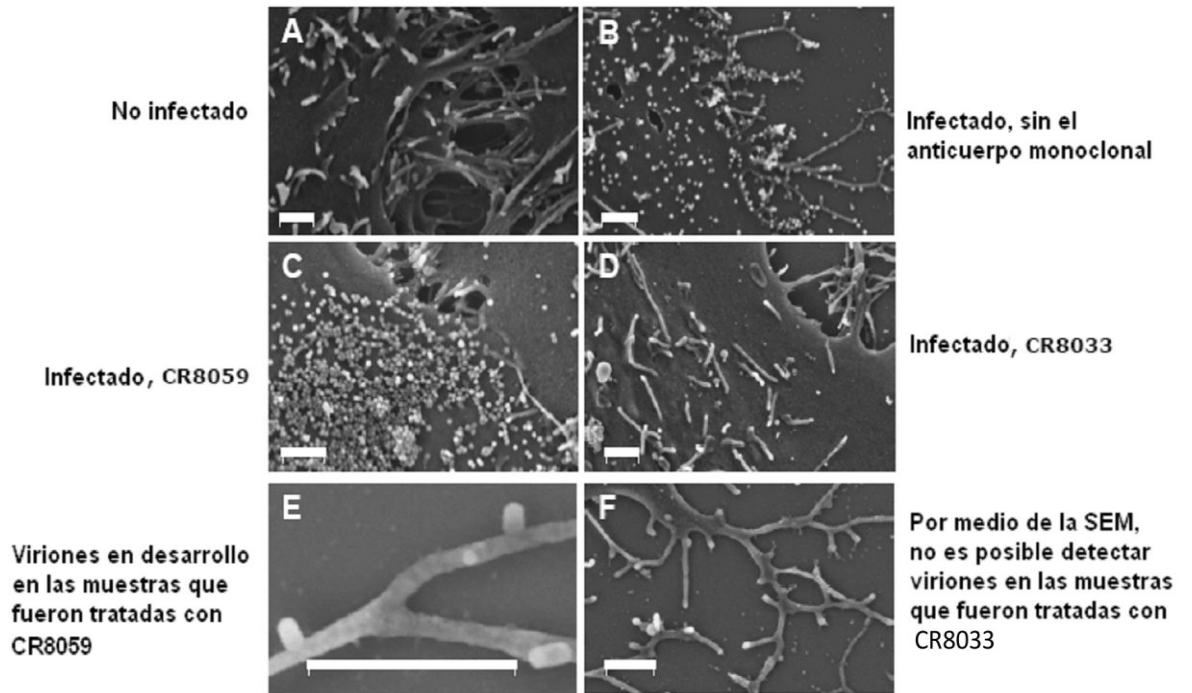


FIG. 4



Las barras de escala representan 1 μ m

FIG. 5

