

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 526**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2012 PCT/US2012/068037**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13086052**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2012 E 12854682 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2793945**

54 Título: **Anticuerpos útiles en la inmunización pasiva contra la influenza**

30 Prioridad:

05.12.2011 US 201161567046 P

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

18.10.2018

73 Titular/es:

**TRELLIS BIOSCIENCE, LLC (100.0%)
845 Oak Grove Ave, Suite 202
Menlo Park, CA 94025, US**

72 Inventor/es:

**KAUVAR, LAWRENCE M.;
ELLSWORTH, STOTE;
MCCUTCHEON, KRISTA MAUREEN;
PARK, MINHA y
USINGER, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 686 526 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos útiles en la inmunización pasiva contra la influenza

Campo Técnico

5 La invención se refiere al campo de la inmunización pasiva contra la influenza. Más particularmente, se describen anticuerpos específicos que se unen cerca de la secuencia consenso del sitio de escisión de la maduración de HA₀ de la hemaglutinina A de la influenza, que incluye anticuerpos secretados por células humanas.

Antecedentes de la técnica

10 La proteína hemaglutinina (HA) del virus de la influenza tiene un dominio de cabeza globular que es altamente heterogéneo entre las cepas de gripe y una región tallo que contiene un sitio de fusión que es necesario para la entrada en las células. HA está presente como un trímero en la envoltura viral. La forma no escindida de la proteína hemaglutinina (HA₀) se activa mediante la escisión por tripsina en las porciones HA1 y HA2 para permitir que el sitio de fusión tenga efecto sobre la virulencia. Las dos porciones escindidas permanecen acopladas usando puentes disulfuro, pero experimentan un cambio conformacional en el ambiente de pH bajo del compartimento endosomal de la célula huésped que da lugar a la fusión de las membranas de la célula viral y del huésped.

15 El sitio de escisión contiene una secuencia consenso que comparten tanto la influenza A como la influenza B y las diversas cepas de influenza A y B. El trímero de proteína hemaglutinina no escindido (HA₀) se conoce como la forma inactiva, mientras que cuando se escinde en las porciones HA1 y HA2, la proteína hemaglutinina se conoce como que está en la forma activada.

20 Bianchi, E., et al, J. Virol. (2005) 79: 7380-7388 describe una vacuna de influenza B "universal" basada en la secuencia consenso de este sitio de escisión en donde un péptido que comprende este sitio era capaz de generar anticuerpos en ratones cuando se conjugó con el complejo de proteína de membrana externa de Neisseria meningitidis. También se describieron anticuerpos monoclonales que parecen unirse a la secuencia consenso. Además, se observó una transferencia pasiva exitosa de antisuero en ratones. Otras vacunas de la técnica anterior, como las descritas en el documento WO2004/080403 que comprenden péptidos derivados de las proteínas M2 y/o HA de la influenza inducen anticuerpos que son de débil eficacia o no son efectivos en todas las cepas.

25 Los anticuerpos descritos en la técnica que se unen a la región del tallo de HA implican los desarrollados por Crucell, CR6261 y CR8020 descritos en Throsby, M., et al, PLoS One (2008) 3: e3942, Ekiert, D. C., et al., Science (2011) 333: 843-850, y Sui, J., et al., Nat. Struct. Mol. Biol. (2009) 16: 265-273. También se ha desarrollado un MAB contra el antígeno conservado M2E como se describe en Grandea, A. G., et al., PNAS USA (2010) 107: 12658-12663. M2E está en la superficie de células infectadas y también es la diana de la amantadina y la rimantadina. Se ha producido resistencia a los fármacos contra estos antibióticos, lo que sugiere que esta diana no cumple una función esencial.

30 Se ha descrito un anticuerpo adicional por el Grupo Lanzavecchia: Corti, D., et al., Science (2011) 333: 850-856 que une y neutraliza las cepas de influenza A del Grupo 1 y Grupo 2, pero la potencia no es tan alta como las descritas en esta memoria como se muestra en los ejemplos a continuación. Además, un MAB que es inmunorreactivo contra la influenza A y B como se describe en Dreyfus, C., et al., Science (2012) 337: 1343-1348 tiene una potencia menor que los que se describen a continuación.

35 La publicación de la solicitud PCT N° WO2011/160083 describe anticuerpos monoclonales que se derivan de células humanas y útiles en vacunas pasivas. Los anticuerpos muestran altas afinidades de unión al HI del clado viral de la influenza, que está en el Grupo 1, y algunos de los anticuerpos también muestran altas afinidades para H9, también en el Grupo 1 y/o para H7 en el Grupo 2 y/o H2 en el Grupo 1. Algunos de los anticuerpos descritos se unen solo a la forma de trímero inactivado, presumiblemente a la región consenso de escisión, mientras que otros son capaces de unirse a la proteína de hemaglutinina activada que ya se ha escindido.

40 Sigue existiendo la necesidad de anticuerpos que unan clados adicionales y muestren una afinidad mejorada a los mismos.

45 Descripción de la invención

La invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a un virus de influenza A que comprenden una cadena pesada que comprende la secuencia QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKTSGYTFTAYTIHW VRQAPGQRLIEWMGWINAGNGHTKYQRFRKGRVTITRDTARSRTTYMELRSLTSEDALYFCARGPETYDYDKTNW LNSHPDEYFQHWGHGTQVTVSS y una cadena ligera que comprende la secuencia
 50 DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQTINNYLAWYQQKPKAPKLLIYKASSLE
 SGVPSRFSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQEQYNNDSPLTFGGGTKVEIK. Dichos anticuerpos son capaces de conferir inmunidad pasiva en el caso de una pandemia causada, por ejemplo, por una cepa de influenza sin identificar previamente o una cepa contra la cual no se confiere protección mediante las vacunas estacionales actualmente disponibles. Como al menos algunos de los anticuerpos se unen a muchas cepas, indicativos de que se dirigen a un sitio esencial, es probable que se unan incluso previamente a cepas no encontradas. Dichos
 55

anticuerpos también son útiles para mejorar o prevenir la infección en sujetos para quienes la vacunación no produjo una respuesta totalmente protectora o que están en alto riesgo debido a un sistema inmune debilitado (p. ej., los muy jóvenes, los ancianos, pacientes trasplantados, pacientes de cáncer o con VIH tratados con quimioterapia).

5 Por lo tanto, en un aspecto, la invención se dirige a anticuerpos monoclonales que son ampliamente reactivos con el virus de influenza A del Grupo 1 que incluye H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H13, H16 o Grupo 2 que incluye H3 y H7 como especímenes tipo, o que muestran reactividad cruzada de Grupo. Algunos de los anticuerpos descritos a continuación se unen específicamente a un epítipo contenido en la proteína HA₀ y reconocen la forma trimérica nativa de HA, así como la forma activada.

10 Particularmente importantes son los anticuerpos biespecíficos que son capaces de aumentar el intervalo de clados virales a los que se pueden unir específicamente.

Como se entiende bien en la técnica, las proteínas no basadas en inmunoglobulinas pueden tener propiedades de reconocimiento de epítopos similares a las de los anticuerpos y también pueden proporcionar realizaciones adecuadas, que incluyen agentes de unión basados en fibronectina, transferrina o lipocalina. Los restos basados en ácidos nucleicos, como aptámeros también tienen estas propiedades de unión.

15 En otros aspectos, la invención está dirigida a métodos para usar los anticuerpos de la invención para inhibir pasivamente la infección viral en sujetos que ya están expuestos al virus o que ya están infectados. La invención también se dirige a materiales y métodos recombinantes para producir anticuerpos.

Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 muestra la clasificación conocida en la técnica del virus de la influenza en grupos de clados significativos.

La Figura 2 muestra los resultados de la unión por MAB579 in vitro a varias cepas H7 y H3, ambas representando el Grupo 2.

Las Figuras 3A y 3B muestran dos mAbs principales, MAB53 (Grupo 1) y MAB579 (Grupo 2) tienen afinidad a través de los clados que abarcan los respectivos Grupos.

25 Las Figuras 4A y 4B contrastan la actividad neutralizante de MAB486 y MAB579. Como se muestra en la Figura 4A, MAB486, así como una preparación policlonal a partir de la inmunización de conejos, son eficaces para neutralizar H1N1 solo en ausencia de tripsina. Por el contrario, la Figura 4B muestra que MAB579 es eficaz tanto en presencia como en ausencia de tripsina.

La Figura 5 es un diagrama del anticuerpo biespecífico que comprende las regiones variables de MAB579 y MAB53.

30 La Figuras 6A-6E muestran la eficacia in vivo de MAB53, MAB579, mezclas de estos, y el anticuerpo biespecífico que se muestra en la Figura 5.

Modos de llevar a cabo la invención

35 La presente invención proporciona medios útiles, así como eficaces, para identificar células que secretan dichos anticuerpos de forma que las secuencias codificadoras relevantes se pueden recuperar y almacenar para la producción recombinante fácil posterior de dichos anticuerpos.

40 Los anticuerpos de la invención son útiles tanto para la profilaxis como para la terapia. Por lo tanto, se pueden usar para proteger un sujeto contra el desafío del virus, así como para el tratamiento de sujetos que ya están expuestos o infectados con influenza. Los sujetos de mayor interés son los seres humanos y para usar en sujetos humanos, formas humanas o formas humanizadas de los anticuerpos naturales tradicionales preferidos. Sin embargo, cuando se usan en estudios animales de laboratorio los anticuerpos que contienen características de unión apropiadas según lo dictado por las regiones CDR pueden retener características no humanas. Los anticuerpos empleados en los estudios de los ejemplos a continuación, aunque se realizan en ratones, contienen, no obstante, regiones tanto variables como constantes que son humanas.

45 Los sujetos para los cuales los anticuerpos de la invención son útiles en terapia y profilaxis incluyen, además de seres humanos, cualquier sujeto que sea susceptible a la infección por gripe. Por lo tanto, diversos mamíferos, como bovinos, porcinos, ovinos y otros mamíferos, incluyendo caballos y mascotas domésticas, se beneficiarán del uso profiláctico y terapéutico de estos restos de unión. Además, se sabe que la influenza infecta especies aviares que también se beneficiarán de las composiciones que contienen los anticuerpos de la invención.

50 Los métodos de uso para la profilaxis y terapia son convencionales y generalmente bien conocidos. Los anticuerpos se proporcionan típicamente mediante inyección, aunque también se entiende que son eficaces las vacunas orales. Los niveles de dosificación y el momento de la administración se optimizan fácilmente y dentro de la habilidad de la técnica.

5 Se pueden identificar las células humanas que secretan anticuerpos útiles usando, en particular, el método CellSpot™ descrito en la patente de E.E.U.U. 7.413.868. Brevemente, el método es capaz de detectar células individuales obtenidas de sujetos humanos (u otros) en ensayos de alto rendimiento que aprovechan el marcaje con marcadores particulares y observación al microscopio. En una realización ilustrativa, incluso una sola célula puede analizarse para anticuerpos que secreta permitiendo que los anticuerpos que secreta se absorban en, o se acoplen a, una superficie y después tratar la superficie con antígenos deseados acoplados cada uno a un marcador de partículas característico. Por lo tanto, se puede identificar la huella de una célula con la ayuda de un microscopio. Usando esta técnica, se pueden explorar millones de células para buscar secreciones de anticuerpos deseables e incluso se pueden recuperar anticuerpos raros, como los deseables en esta memoria para la inmunización pasiva contra la influenza a través de las cepas. Dado que los sujetos humanos tienen anticuerpos existentes contra al menos algunas cepas de influenza, y dado que los anticuerpos obtenidos mediante el método de la invención se unen a una secuencia conservada, estos anticuerpos sirven para abordar nuevas cepas, así como cepas con las que las poblaciones humanas tienen experiencia.

10 Los métodos para obtener anticuerpos adecuados no están limitados a la técnica CellSpot™, ni están limitados a sujetos humanos. Las células que producen anticuerpos adecuados pueden identificarse por diversos medios y las células pueden ser de animales de laboratorio como ratones u otros roedores. Se pueden aislar las secuencias de ácido nucleico que codifican estos anticuerpos y se pueden producir una variedad de formas de anticuerpos, que incluyen formas quiméricas y humanizadas de anticuerpos producidos por células humanas. Además, los anticuerpos recombinantes producidos incluyen anticuerpos monocatenarios o regiones Fab o Fab2 de ellos. Los anticuerpos humanos también se pueden obtener usando huéspedes como XenoMouse® con un sistema inmune humanizado. Son bien conocidos en la técnica los medios para la producción de anticuerpos para seleccionar características de unión adecuadas.

De manera similar, también se conocen en la técnica los medios para construir aptámeros con patrones de unión deseados.

25 Como se indicó anteriormente, los anticuerpos pueden unir la forma activada, la forma inactivada o ambas de la proteína hemaglutinina. Es ventajoso en algunos casos que el epítipo esté en el sitio de escisión de esta proteína, ya que está relativamente conservada a través de las cepas, aunque el resto de unión se une preferiblemente tanto al trímero como la forma activada.

30 Se conoce el sitio de escisión para diversas cepas de influenza A e influenza B. Por ejemplo, el artículo citado anteriormente de Bianchi, et al., muestra en la Tabla 1 la secuencia alrededor del sitio de escisión de varias de dichas cepas:

Tabla 1. Secuencia consenso de la región expuesta al disolvente de los sitios de escisión madurativos del virus de la influenza A y B

Virus/subtipo	Cepa	Secuencia ^a		
A/H3/HA ₀	Consenso	NVPEKQTR (SEQ ID N°: 51)	↓	GIFGAIAGFIE (SEQ ID N°: 52)
A/H1/HA ₀	Consenso	NIPSIQSR (SEQ ID N°: 53)	↓	GLFGAIAGFIE (SEQ ID N°: 54)
B/HA ₀	Consenso ^b	PAKLLKER (SEQ ID N°: 55)	↓	GFFGAIAGFLE (SEQ ID N°: 56)

^a La posición de escisión entre HA1 y HA2 está indicada por la flecha.

^b El consenso es el mismo para los linajes Victoria y Yamagata.

35 Como se indica, se da un consenso estricto comenzando con el residuo de arginina corriente arriba del sitio de escisión y, por lo tanto, las secuencias consenso preferidas incluidas en los péptidos de prueba de la invención tienen la secuencia RGI/L/F FGAIAGFLE (SEQ ID N°: 57). Puede ser posible usar solo una porción de esta secuencia en los péptidos de prueba.

40 Como se indicó anteriormente, una vez que se han identificado las células que secretan los anticuerpos deseados, es sencillo recuperar las secuencias de nucleótidos que las codifican y producir los anticuerpos deseados a gran escala de forma recombinante. Esto también permite la manipulación de los anticuerpos para que puedan producirse, por ejemplo, como anticuerpos monocatenarios o desde el punto de vista de sus regiones variables solamente.

45 Los ácidos nucleicos recuperados pueden almacenarse físicamente y recuperarse para la producción recombinante posterior y/o puede recuperarse la información de secuencia en lo que se refiere a la secuencia codificadora para el anticuerpo y almacenarse para permitir la síntesis posterior de los ácidos nucleicos apropiados. La disponibilidad de la información contenida en las secuencias codificadoras y las técnicas de síntesis y clonación rápidas junto con los

métodos conocidos de producción recombinante permiten la producción rápida de los anticuerpos necesarios en caso de una pandemia u otra emergencia.

5 Como referencia, se han descrito las secuencias de las regiones constantes humanas de ambas cadenas pesada y ligera y se exponen en esta memoria como SEQ ID Nos: 1-3. En el documento WO2011/160083 mencionado anteriormente, se han recuperado diversos anticuerpos monoclonales con regiones variables de determinadas secuencias de aminoácidos y secuencias codificadoras de nucleótidos que se unen con grados de afinidad variables a la proteína HA de diversas cepas de influenza. Las estructuras de las regiones variables, tanto de las cadenas ligeras como las pesadas, de las de particular interés en esta memoria se exponen por conveniencia en esta memoria como SEQ ID Nos: 22-25. Estos anticuerpos incluyen MAB8 y MAB53. MAB53 y MAB8 se unen con particular afinidad a H1; además, MAB53 se une fuertemente a H5, H7 y H9. MAB8 también se une a H7 y a H2. Ninguno de estos anticuerpos se une fuertemente a H3, pero MAB579 se une a H3 descrito en esta memoria. H7 y H3 son dianas particularmente atractivas.

15 Con más detalle, cada uno de estos MABs se une a al menos tres clados diferentes con afinidad razonable o alta. MAB53 se une a HA₀ de los clados H1, H9 y H7 y MAB8 se une a HA₀ de los clados H1, H7 y menos fuertemente a H3, como se demuestra mediante el ensayo de ELISA frente a la proteína HA₀. Las afinidades están en el intervalo nanomolar. La reactividad hacia el trímero nativo de HA de todos los clados del Grupo 1 se verificó usando HA expresada en células HEK293 con unión a anticuerpo medido mediante citometría de flujo.

20 Estos resultados se confirmaron usando un sistema de ensayo alternativo, el ensayo de unión basado en la interferometría de bionivel denominado biosensor ForteBio®. Según lo medido por este ensayo más preciso, las afinidades son las siguientes:

MAB53 / H1 = 60 pM, H5 = 6 nM, H7 = 70 pM, H9 = 30 pM;

MAB8 /H1 = 9 nM, H3 = 16 nM, H5 = 0,2 nM.

25 Los anticuerpos específicos adicionales identificados en la presente solicitud, MAB383, MAB486, MAB699, MAB700, MAB708, MAB710, MAB711 y MAB723 están representados por las SEQ ID Nos: 4-7 y 10-21 con respecto a las secuencias de aminoácidos de sus cadenas variables pesada y ligera. Estos anticuerpos se unen con afinidad aumentada a clados adicionales de cepas de influenza. Por ejemplo, MAB579 se une con alta afinidad a H3 y a H7. Por lo tanto, estos anticuerpos se suman al repertorio de anticuerpos útiles en la profilaxis y el tratamiento de la influenza.

30 Ahora existen múltiples tecnologías para fabricar una única molécula similar a un anticuerpo que incorpora dominios de especificidad de antígeno a partir de dos anticuerpos separados (anticuerpo bi-específico). Por lo tanto, se puede construir un único anticuerpo con una reactividad de cepa muy amplia usando los dominios Fab de anticuerpos individuales con amplia reactividad para el Grupo 1 y el Grupo 2 respectivamente. Se han descrito tecnologías adecuadas por MacroGenics (Rockville, MD), Micromet (Bethesda, MD) y Merrimac (Cambridge, MA). (Véase, p. ej., Orcutt KD, Ackerman ME, Cieslewicz M, Quiroz E, Slusarczyk AL, Frangioni JV, Wittrup KD. A modular IgG-scFv bispecific antibody topology, Protein Eng. Des. Sel. (2010) 23: 221-228; Fitzgerald J, Lugovsky A. Rational engineering of antibody therapeutics targeting multiple oncogene pathways. Mabs. (2011) 1: 3(3); Baeuerle PA, Reinhardt C. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. Cancer Res. (2009) 69: 4941-4944).

35 Por lo tanto, es particularmente útil proporcionar anticuerpos u otros restos de unión que se unen a múltiples tipos de proteína hemaglutinina mediante la construcción de anticuerpos biespecíficos. La presente invención está dirigida a combinaciones que combinan la especificidad de unión de MAB53 (H1, H5, H9) con MAB579 (H3, H7).

Todos los anticuerpos descritos incluyen al menos una de las especificidades de unión descritas anteriormente. Estos pueden combinarse con otros diversos anticuerpos, incluidos los que se describieron en el documento WO2011/160083 anteriormente mencionados, así como otros miembros del nuevo grupo de anticuerpos descritos en esta memoria.

45 Mientras que MAB53 se une con alta afinidad a HA₀, no se une a HA₁, lo que implica la unión al fragmento complementario, cuya unión se confirmó. Como MAB53 no se une a HA₀ cuando se analiza mediante Western blot, se supone que el epítipo dominante es al menos en parte conformacional. Se encontró que MAB8 y MAB53 se unen a los mismos epítipos o cercanos como se demuestra por su capacidad para competir entre sí por la unión a la proteína HA₀ del clado H1.

50 Todos los anticuerpos descritos en esta memoria, incluyendo los descritos previamente en el documento WO2011/160083 mencionado anteriormente, se unen al trímero de HA nativo expresado en la superficie de células transfectadas con HA. Esto se verificó usando un plásmido que codifica HA proporcionado por S. Galloway y D. Steinhauer de la Universidad de Emory. Es decir, el trímero expuesto en la superficie de la célula de los clados reconocidos por los diversos MABs de la invención es reconocido por estos anticuerpos.

55 Se demostró que MAB53 y MAB8 difieren en que MAB8 se libera de la proteína HA₀ cuando se baja el pH a 6, mientras que MAB53 no lo hace. Esta diferencia es significativa ya que parece predictiva de la capacidad de

neutralización. En pruebas de la capacidad de neutralizar la infección viral por H1N1 en un ensayo de reducción de placa en células diana MDCK, dosis bajas de MAB53 de 1-5 µg/ml neutralizaron la infección por H1N1, por H7N3, H5N1 y H9N2. Sin embargo, MAB8 no neutraliza la infección por estas cepas. Por lo tanto, se pueden seleccionar preferentemente las cepas neutralizantes lavando el MAB o el fragmento unidos a pH 6 durante la selección primaria, eliminando así los MABs HA₀ que son poco probables que permanezcan unidos mientras el complejo virus-anticuerpo entra en la célula a través del compartimento endosomal y, por lo tanto, se espera que tenga una capacidad reducida para neutralizar el virus. Por ejemplo, en el método CellSpot, HA₀ puede unirse a un soporte sólido (perlas fluorescentes) y captarse mediante el MAB o una mezcla de MABs, después de lavarse a pH 6.

También se demostró que los ratones pretratados con dosis graduales de MAB53 sobreviven al desafío con títulos de virus de H1N1 y de H5N1 de otro modo letales con una protección del 100% frente al desafío con H1N1. La potencia es comparable a un anticuerpo de la técnica anterior descrito por Crucell que no muestra actividad frente a las cepas del Grupo 2. Throsby, M., (supra) 3: e3942. Los anticuerpos de Crucell son anticuerpos monoclonales neutralizantes heterosubtípicos con protección cruzada frente a H5N1 y H1N1 recuperados de células B memoria IgM+ humanas. MAB53 también proporcionó protección completa a 10 mg/kg; 90% de supervivencia a 2 mg/kg y 50% de supervivencia a 0,4 mg/kg. Cuando el desafío con H5N1 se sustituyó por el desafío con H1N1, para MAB53, 10 mg/kg dieron una supervivencia del 80%; 2 mg/kg dieron una supervivencia del 60% y 0,4 mg/kg dieron una supervivencia del 50%.

MAB53 y anticuerpos que se unen al mismo epítipo en las mismas condiciones, es decir, permanecen unidos cuando el pH se baja a 6, son eficaces como vacunas pasivas adecuadas para la protección de poblaciones contra epidemias y pandemias, y para uso profiláctico o terapéutico contra la influenza estacional para pacientes con un sistema inmune debilitado. Las combinaciones de la región de unión al epítipo de MAB53 con los epítopos de unión de alta afinidad de los anticuerpos de la presente invención son particularmente útiles en la construcción de anticuerpos biespecíficos. Esto claramente permite, por ejemplo, la unión eficaz de H7, H3 y H1 en el mismo anticuerpo cuando se incluyen regiones de unión en el anticuerpo MAB579. Esto se muestra en la Tabla 2, que proporciona los IC₅₀ para diversas cepas de la proteína hemaglutinina de influenza mostradas por MAB579.

Tabla 2. Valores de IC₅₀ de MAB579 para varias cepas de gripe

Subtipo	Cepa	IC ₅₀ (µg/ml)	
H3	A/Perth/16/2009	0,2	
	A/Filipinas/2/82 x-79	0,9	
	A/Udorn/307/1976	1,9	
	A/Nueva York/55/2004*	1,1	
	A/Wisconsin/67/2005	1,0	
	A/Hong Kong/68	2,8	
	A/SW/MN/02719	3,9	
H4	A/Bufflehead	15,5	
H7	A/Canada/rv444/04	1,6	
	A/Holanda/219/03	0,6	
	A/Sanderling/A106-125	>20	} Virus aviares
	A/Redknot/NJ/1523470/06	>20	
	A/Ruddy Turnstone/ A106-892	>20	
H10	A/Northern Shoveler	0,8	

Estos valores se obtuvieron en el ensayo de micro neutralización de monocapa de MDCK. En la Figura 2 también se muestra una representación gráfica de la afinidad de MAB579 por diversas cepas. Como se muestra, mientras H3 y H7 están fuertemente unidos, se encuentra una afinidad de unión insignificante para H1. Por lo tanto, es particularmente ventajoso combinar la región de unión de MAB579 con la de un MAB con alta unión a H1. En este caso, entonces, tanto el Grupo 1 como el Grupo 2 están representados. Una realización de la invención incluye un anticuerpo biespecífico que se une tanto al epítipo unido por MAB53 como al unido por MAB579.

Además de los anticuerpos biespecíficos per se, la invención contempla el uso de la cadena pesada solo en construcciones para la neutralización de la infección viral; tales anticuerpos también pueden ser biespecíficos. Se entiende en la técnica que la especificidad viene conferida principalmente por las regiones variables de la cadena pesada, y en algunas situaciones, las cadenas pesadas solas han tenido éxito como ingredientes activos en las vacunas. Alternativamente, la cadena pesada de especificidad apropiada puede asociarse con diversas formas de cadena ligera para potenciar la afinidad o capacidad de neutralizar el virus.

Se destaca particularmente que la región CDR3 de las cadenas pesadas de los anticuerpos descritos en esta memoria se extiende y contiene múltiples residuos de tirosina. Se entiende que tales residuos de tirosina pueden sulfonarse como un evento post-traducciona. Por lo tanto, se describen vacunas que comprenden las regiones CDR3 de las cadenas pesadas de MAB579, MAB699, MAB700, MAB708, MAB710, MAB711 o MAB723 en donde uno o más de los residuos de tirosina en dicha región está opcionalmente sulfonado. Estas regiones con o sin sulfonación también pueden usarse solas como vacunas pasivas. La sulfonación de la región CDR3 es consistente con los criterios de sulfonación descritos por Monigatti, F., et al, *Bioinformatics* (2002) 18: 769-770. Otros casos en los que las regiones CDR3 de cadenas pesadas se han usado con éxito solas en la neutralización de la infección viral se describen en Pejchal, R., et al, *PNAS* (2010) 107: 11483-11488 y por Liu, L., et al, *J. Virol.* (2011) 85: 8467-8476.

Como se usa en esta memoria, el término "anticuerpo" incluye fragmentos inmunoreactivos de anticuerpos tradicionales. Los anticuerpos, por lo tanto, incluyen fragmentos Fab, anticuerpos Fv monocatenarios que contienen regiones variables sustancialmente únicas, anticuerpos biespecíficos y sus diversas formas fragmentadas que aún conservan inmunoespecificidad y proteínas en general que imitan la actividad de anticuerpos "naturales" que comprenden secuencias de aminoácidos o secuencias de aminoácidos modificadas (es decir, pseudopéptidos) que se aproximan a la actividad de las regiones variables de anticuerpos naturales más tradicionales.

Estructuras de anticuerpos

Estas se presentan en el siguiente orden:

1. Secuencias de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana, kappa constante humana y lambda constante humana;
2. Secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de MAB 383, 486, 579, 699, 700, 708, 710, 711 y 723 (Las regiones CDR están subrayadas en los MABs 579, 699, 700, 708, 710, 711 y 723.);
3. Secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y ligera de MAB8 y MAB53 descritas en WO2011/160083 (Las secuencias LC mostradas en '083 también contenían la región constante y esta se ha eliminado);
4. Secuencias de nucleótidos que codifican la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana, kappa constante humana y lambda constante humana;
5. Secuencias de nucleótidos que codifican secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de las regiones variables de las cadena pesada y ligera de MAB 383, 486, 579, 699, 700, 708, 710, 711 y 723;
6. Secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y ligera de MAB8 y MAB53.

Con respecto a las regiones CDR indicadas, debe observarse que hay más de un sistema para identificar CDRs. El sistema usado más frecuentemente es el sistema de Kabat originalmente establecido en Wu, T. T., et al, *J. Exp. Med.* (1970) 132: 211-250. Kabat es un sistema ampliamente adoptado que identifica posiciones específicas asociadas con CDRs. Un sistema adicional, el esquema de numeración de Clothia proporciona resultados ligeramente diferentes. Se describe en Al-Lazikani, B., et al, *J. Molec. Biol.* (1997) 273: 927-948. Dependiendo de qué sistema se use, se indican resultados para CDRs ligeramente diferentes. Por ejemplo, en MAB53 el CDR de la cadena pesada según Kabat es KYAI mientras que el sistema Clothia designa GG IIRKYAI. La región CDR2 de la cadena pesada tiene una G adicional en el extremo N-terminal y el CDR3 una AR adicional en el extremo N-terminal. Para la cadena ligera, las designaciones de CDR son idénticas en ambos sistemas.

Algunos colegas han criticado ambos sistemas; por lo tanto, se entiende que las regiones CDR según se designan en esta memoria pueden variar ligeramente. Siempre que las regiones variables resultantes conserven su capacidad de unión, no es significativa la localización precisa de las regiones CDR, y se debe considerar que las regiones designadas en las reivindicaciones incluyen CDRs identificados mediante cualquier sistema aceptado.

Secuencia de aminoácidos de la región constante de HC de la IgG1 humana (SEQ ID N°: 1)

ES 2 686 526 T3

ASTKGP SVFPLVPS SKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQS SGLYSLSSWTVP SS
SLGTQTYICNVHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VF SC SVMHEALHNHYTQKSL SL SPGK

Secuencia de aminoácidos de la región constante kappa de la LC humana (SEQ ID N°: 2)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de aminoácidos de la región constante lambda de la LC humana (SEQ ID N°: 3)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
PSKQSNKYAAASSYLSTPEQWVSHRYSQCQVTHEGSTVEKTPAEC

5

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la HC de MAB383 (SEQ ID N°: 4)

QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCRASGYFTSFGFSWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGD
TKSPQKLGQGRVTMTDTSTNTAYMELRSLISDDTAVYYCARAPPLYSSWSSDYWGQ GTLLTVSS

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la LC de MAB383 (SEQ ID N°: 5)

DIQMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWYQQKHGQAPRPLIYGASRRAT
DVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPRTFGQGTKEIK

10 Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la HC de MAB486 (SEQ ID N°: 6)

QVQLVESGGGMVQPGGSRRLSCAASGFSFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGEK
QYYLDSVKGRTISRDNKDTLYLQMNSLTAEDTAVYYCVKESARRLLRYFEWLLSS PFDNWGQALVTVSS

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la LC de MAB486 (SEQ ID N°: 7)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYTSNKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYTSPYTFGQGTKEIK

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la HC de MAB579 (SEQ ID N°: 8)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKTSGYFTAYTIHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGH
TKYSQRFKGRVTITRDTSARTTYMELRSLTSEDALYFCARGPETYYYDKTNWLNH PDEYFQHWGHGTQVTVSS

15

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la LC de MAB579 (SEQ ID N°: 9)

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQTINNYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFAVYYCQYNNDSPLTFGGGTKEIK

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la HC de MAB699 (SEQ ID N°: 10)

QLQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYFTSYTLHWVRQAPGQTLEWMGWINAGNGK
TKYPPKFRGRVTITRDTSATTVDMHLSLTSSEDTAVYFCARGPESYYYDRSDWLNH PDEYFQYWGQGLVIVSS

20 Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la LC de MAB699 (SEQ ID N°: 11)

DIQMTQSPSTLSASVGDRTIACRASQSISSWYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASQLESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTINSLQPDFAVYYCQLYNVYSPLTFGGGTRVDIK

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la HC de MAB700 (SEQ ID N°: 12)

QVQLVESGADVKKPGASVTVSCKASGYFTFRSFTMHVVRQVPGQRLEWMGWINAGNGK
TKYSQKFGQGRVIVTRDTSASTAYMELSSLTSEDTAVYFCARGPETYYYDSSNWLNH PDEYLYWGQGTPTVSS

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la LC de MAB700 (SEQ ID N°: 13)

DIVLTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQEYNNNSPLTFGGGKVEIK

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la HC de MAB708 (SEQ ID N°: 14)

QVQLVQSGADVKKRPGASVTVSCKASGYTFRSFTMHVWRQVPGQRLEWMGWINAGNGK
TKYSQKFQGRVIVTRDTSANTAYMELSSLTSEDVAVYYCARGPETYYDSSNWLNSH PDEYFQHWGQGTPTVTVSS

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la LC de MAB708 (SEQ ID N°: 15)

DIQMTQSPSTLPASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQEYNNNSPLTFGGGKVEIK

5

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la HC de MAB710 (SEQ ID N°: 16)

QVQLQESGAEVKKPGASVQVSKASGYTFTSYSVHWVRQAPGQRPEWMGWINAGNGK
TKYPQKFKGRVTITRDTLARTV IHLSSLTSEDVAVYFCARGPDSYDDRNWLNSH PDEYFQHWGQGTWIVSS

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la LC de MAB710 (SEQ ID N°: 17)

DIVMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSIDSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASNLESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQLYNVHLITFGGGTRVDIK

10 Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la HC de MAB711 (SEQ ID N°: 18)

QVQLVESGAEVKKPGASVKITCEASGYTFNTYTIHWLRQAPGQRLEWMGWINAANGH
TKYSRKLRSRVTIKRDTARTSYMELSSLGSEDTAVYYCARGPETYYFDKTNWLNSH PDEYFQHWGQGLTIVTVSS

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la LC de MAB711 (SEQ ID N°: 19)

DIVMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISTWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASNLESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQEYNNNSPLILGGGTTVEIK

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la HC de MAB723 (SEQ ID N°: 20)

QVQLVQSGAAVNKPGASVKVSKASGYSTSYTLHWVRQAPGQRPEWIGWINAGNGK
VKYPRKLQGRITITRDVSATTVMELRSLTSEDGLYCYARGPESYFFDTSNHLNSH PDEYFQFWGQGLTIVTVSS

15

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la LC de MAB723 (SEQ ID N°: 21)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASNLESG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQEYNNNSPLTFGAGTKVEIK

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la HC de MAB8 (SEQ ID N°: 22)

EVQLVESGGGLVKGPGSLRSLCAASGFTSTYTMWVRQAPGQGLEWVSSITRTSSN
IYYADSVGRFTISRDNKNSLYLQMHSRVEDTAVYYCARISGWGPVDFYWGQG TLITVSS

20 Secuencia de aminoácidos de la LC de MAB8 (SEQ ID N°: 23)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQTISKYLNWYQQKPGRAPKLLIYSASSLQSG
VPSRFTGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQSYRPSQITFGPGTKVDIK

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la HC de MAB53 (SEQ ID N°: 24)

QVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSKVSGGIIRKYAINWVRQAPGQGLEWMMGGI IAIFNT
ANYAQKFQGRVTITADESTVYMESSLRSEDALYYCARGMNYSDYFDYWGQGS LVTVSP

Secuencia de aminoácidos de la LC de MAB53 (SEQ ID N°: 25)

ES 2 686 526 T3

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVRSNNLAWYQHKPGQAPRLLIFGASSRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSSPALTFGGGTKVEIK

Secuencia de nucleótidos de la región constante de la HC de la IgG1 humana (los intrones están subrayados) (SEQ ID N°: 26)

GCCTCCACCAAGGGCCCATCAGTCTTCCCCCTGGCACCCCTACCAAGAGCACCTCT
GGGGGCACAACGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACG
GTGTCGTGGAACCTAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTA
CAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACCAAGGTGGAC
AAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCT
CAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGTCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGC
AGGCCCGTCTGCCTTTCACCCGGAGGCCTCTGCCCGCCCACTCATGCTCAGGGA
GAGGGTCTTCTGGCTTTTTCCCGAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAA
CCCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATAT
CCGGGAGGACCTGCCCTGACCTAAGCCCAACCCAAAGGCCAAACTCTCCAATCCC
TCAGCTCGGACACCTTCTCTCCTCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTGC
AGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGC
CCAGGCCTCGCCCTCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCA
GGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTTCTCTCAGCACCTG
AACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCA
TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACAGCGTCTCACCGTCC
TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGC
GAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCT
GTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
CCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC

TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
TACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTATAGCAAG
CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCGGGTAAA TGA

5 Secuencia de nucleótidos de la región constante kappa de la LC humana (SEQ ID N°: 27)

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAAGTGTAGCGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
GTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAA
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAA
GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGC
TCGCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG

Secuencia de nucleótidos de la región constante lambda de la LC humana (SEQ ID N°: 28)

GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTGTCACTCTGTTCCCGCCCTAGCGAGGAGCTT
CAAGCCAACAAGGCCACTGGTGTGTCTATAAGTACTTC TACCCGGGAGCCGTG
ACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACA
CCCTCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCT
GAGCAGTGGAAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACC
GTGGAGAAGACAGTGGTCCCTGCAGAATGCTCT

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la HC de MAB383 (SEQ ID N°: 29)

ES 2 686 526 T3

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAGGCCTGGGGCCTCAGTGAAG
GTCTCCTGCAGGGCTTCTGGTTACACCTTACTAGCTTCGGTTTCAGCTGGGTGCGA
CAGGCCCCAGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGGTGGATCAGCGCTTACAATGGTGAC
ACAAAGTCTCCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACTACAGACACATCCACG
AACACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTCATATCTGACGACACGGCCGTGATTAT
TGTGCGAGAGCCCCCTGTATTACAGTAGCTGGTCTCAGACTACTGGGGCCAG
GGAACCTGCTCACCGTCTCCTCA

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la LC de MAB383 (SEQ ID N°: 30)

GATATCCAGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGAGTACACTACTTAGCCTGGTACCAG
CAGAAACATGGCCAGGCTCCAGGCCCTCATCTACGGTGCATCCAGAAGGGCCACT
GACGTCCAGACAGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCATC
AGCAGACTGGAACCTGAAGATTTTGCAGTGTATTATTGTCAGCAGTATGGTAGTTCA
CCTCGAACTTTTGGCCAGGGGACCAAACCTGGAATCAAAC

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la HC de MAB486 (SEQ ID N°: 31)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCATGGTCCAGCCGGGGGGTCCCGGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGAGTTCAGTACCTATGGCATGCACTGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATTTATATGATGGAGAAAAG
CAATATTATCTAGACTCCGTGAAGGGACGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG
GACACCCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGACAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTAC

TGTGTGAAGGAATCAGCGCGTCGATTATTACGATATTTTGTGAGTGGTTATTAAGTTCC
CCTTTTGACAACCTGGGGCCAGGGAGCCCTAGTCACCGTCTCCTCA

5

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la LC de MAB486 (SEQ ID N°: 32)

GATATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTTTGGGCGAGAGGGCC
ACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGACTGTTTTATACACCTCCAACAAGAAAAATTAC
TTAGCCTGGTACCAACAGAAGCCAGGGCAGCCTCCTAAACTGCTCATTTACTGGGCA
TCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTGAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGAT
TTCACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAGGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAG
CAATATTATACGTCTCCCTACACATTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la HC de MAB579 (SEQ ID N°: 33)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG
GTTTCCTGCAAGACTTCTGGATACACCTTACAGCCTATACTATACTGGGTGCGC
CAGGCCCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACGCTGGCAATGGTCAC
ACGAAATATTCACAGAGGTTCAAGGGCAGAGTCACCATACCAGGGACACATCCGCG
AGGACAACCTACATGGAGCTGCGCAGTCTGACATCTGAGGACACGGCTCTATATTT
TGTGCGAGAGGGCCCGAGACATATTATTATGATAAAACCAATTGGCTGAACTCCCAT
CCAGATGAATACTTCCAGCACTGGGGCCACGGCACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

10 Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la LC de MAB579 (SEQ ID N°: 34)

GATATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCAGGGCCAGTCAGACTATTAATAACTACTTGGCCTGGTATCAGCAG AAAC C
AGGGAAAGCCC C TAAACTCTGAT C TAT AAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGG
GTCCCATCAAGATTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAATTCCTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAGCCTGATGATTTTGAACCTTATTACTGCCAAGAATATAATAATGATTCT
CCCCTAACTTTGCGCGGAGGGACCAAAGTGGAGATCAA

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la HC de MAB699 (SEQ ID N°: 35)

ES 2 686 526 T3

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG
CTTCCTGCAAGGCTTCTGGGTACACCTTCACTTCTATACTCTACATTGGGTGCGC
CAGGCCCCGGACAGACACTTGAGTGGATGGGATGGATCAACGCTGGCAACGGTAAA
ACAAAATATCCACCGAAGTTCAGGGGACAGATCACCATTACCAGGGACACGTCCGCG
ACCACAGTCGACATGCATCTAAGCAGCCTGACATCTGAAGACACGGCTGTGTATTC
TGTGCGAGAGGGCCGAAAGTTATTACTATGATAGAAGTGATTGGCTGAACTCCCAT
CCAGATGAATACTTCCAGTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCATCGTCTCCTCA

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la LC de MAB699 (SEQ ID N°: 36)

GATATCGTGTGACGAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGGGACAGAGTACCATCGCTTGCCGGGC
CAGTCAGAGTATTAGCAGCTGGCTGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAACTCCTGATCTAC
AAGGCGTCTCAGTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGATTCAGCGGCAGCGGATCTGGGACAGAGTTCCTCTC
ACCATCAACAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACTTTATAATGTTTATTCTCCGCTCACTT
TCGGCGGGGGACAGGGTGGACATCAA

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la HC de MAB700 (SEQ ID N°: 37)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGACGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGACG
GTTTCCTGCAAGGCTCAGGATACACCTCAGGAGTTTTACTATGCATTGGGTGCGC
CAGGTCCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACGCTGGCAATGGTAAA
ACAAAGTATTCTCAGAAGTTCAGGGGACAGATCATCGTTACCAGGGACACATCCGCG
AGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTAACATCTGAAGACACGGCTGTTTATTAC
TGTGCGAGAGGGCCGAAACATATTACTATGATAGTAGTAATTGGCTGAATTCCCAT
CCAGATGAATATCTCCAGTACTGGGGCCAGGGCACCCCGGTCACCGTCTCCTCA

5

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la LC de MAB700 (SEQ ID N°: 38)

GATATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCGTCTGTAGGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAG AAAC C AGGGAAAGC
C C C T AAAC T C C T GAT C TAT AAGGC G T C T A C T T T AGAAAG T GGG
GTCCATCCAGGTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAAGAGTATAATAATAATTCT
CCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la HC de MAB708 (SEQ ID N°: 39)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGACGTGAAGAGGCCTGGGGCCTCAGTGACG
GTTTCCTGCAAGGCTCAGGATACACCTCAGGAGCTTTACTATGCATTGGGTGCGC
CAGGTCCCCGGACAAAGGCTGGAGTGGATGGGATGGATCAACGCTGGCAATGGTAAA
ACAAAATATTCCAGAAGTTTCAGGGGACAGATCATCGTTACCAGGGACACATCCGCG
AACACGGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGACATCTGAAGACACGGCTGTTTATTAC
TGTGCGAGAGGGCCGAAACATATTATTATGATAGTAGTAATTGGCTGAACTCCCAT
CCAGATGAATATTTCCAGCACTGG

10 Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la LC de MAB708 (SEQ ID N°: 40)

GATATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGCCTGCGTCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGCCGGGC
CAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAACTTCTGATCTAT
AAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCCAGGTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAGGAGTATAATAATAATTCTCCGCTCACTT
TCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la HC de MAB710 (SEQ ID N°: 41)

ES 2 686 526 T3

CAAGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGCAG
GTTTCCTGCAAGGCTTCTGGGTACACCTTCACGTCCTATAGCGTACATTGGGTGCGC
CAGGCCCCCGACAAAGGCCTGAGTGGATGGGATGGATCAACGCTGGCAACGGAAAG
ACAAAATATCCACAGAAGTTCAAGGGCAGAGTCACCATAACCAGAGACACATTAGCG
CGCACTGTCAACATACATCTAAGCAGCCTGACATCCGAAGACACGGCTGTGTATTTC
TGTGCGAGAGGGCCGATAGTTACTATGATAGAAATGATTGGCTGAACTCCCAT
CCAGATGAATACTTCCAGCACTGGGGCCAGGGCACCCGTGGTCATCGTCTCCTCA

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la LC de MAB710 (SEQ ID N°: 42)

GATATCGTGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTC
ACCATCTCTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTGACAGTTGGTTGCCTGGTATCAGCAG
AAACCAGGGAAAGCCCCCTAACTCCTGATCTATAAGGCGTCTAATTTAGAAAAGTGGG
GTCCCATCAAGATTCAGCGGCAGCGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAGCTTACTTACTGCCAACTCTATAATGTTCAATTTG
ATCACTTTCGGCGGAGGGACCAGGGTGGACATCAAA

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la HC de MAB711 (SEQ ID N°: 43)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG
ATCACCTGCGAGGCTTCTGGATACACTTTCAATACCTATACTATACTTGGCTGCGC
CAGGCCCCCGACAAAGACTTGAGTGGATGGGGTGGATCAACGCTGCCAATGGTCAT
ACAAAATATTCACGGAAGCTCAGGTCCAGAGTCACCATTAAGAGGGACACATCCGCG
AGGACAAGTTACATGGAGCTGAGCAGCCTGGGATCTGAAGACACGGCTGTCTATTAC
TGTGCGAGAGGGCCGAAACATATTACTTTGATAAGACGAATTGGCTGAACTCCCAT
CCAGATGAATACTTCCAGCACTGGGGCCAGGGCACCCGTGGTCACCGTCTCCTCA

5

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la LC de MAB711 (SEQ ID N°: 44)

GATATCGTGATGACGCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTCTACCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAG
AAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCCAATTTAGAAAAGTGGG
GTCCAGCAAGATTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCCTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTACTTACTGCCAAGAATATAATAATGATTCT
CCGCTGATTTTAGGCGGAGGGACCACGGTGGAGATCAAA

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la HC de MAB723 (SEQ ID N°: 45)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGCGGTGAACAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG
GTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACAGCTTCACTAGTTACTTTGCATTGGGTGCGC
CAGGCCCCCGACAAAGGCCTGAGTGGATAGGGTGGATCAACGCTGGCAATGGTAAA
GTAAAATATCCACGGAAGTTGCAGGGCAGAATCACCATAACCAGGGACGTATCCGCT
ACGACAGTTCACATGGAAGTGGAGCCTGACATCTGAGGACACGGGTCTATATTAC
TGTGCGAGAGGGCCGAAAGTTACTTCTTTGATACTTCTAATCATCTGAACTCCCAT
CCAGATGAATACTTCCAGTCTGGGGCCAGGGCACCCGTGGTCACCGTCTCCTCA

10 Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la LC de MAB723 (SEQ ID N°: 46)

GATATCGTGCTGACGCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGTTACTTGGCCTGGTATCAACAG
AAACCAGGGAAAGCCCCCTAACTCCTGATCTATAAGGCGTCTAATTTAGAAAAGTGGG
GTCCCATCAAGATTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTATTGCCAAGAATATAATAATAACTCT
CCGCTCACTTTCGGCGCAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la HC de MAB8 (SEQ ID N°: 47)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
 CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGTTTCACTTTCAGTACCTATACTATGAGTTGGGTCCGC
 CAGGCTCCAGGGCAGGGGCTAGAGTGGGTCTCGTCCATTACTAGGACTAGTAGTAAT
 ATATACTACGCAGACTCAGTGGAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
 AACTACTGTATCTGCAGATGCATAGCCTGAGAGTGAAGACACGGCTGTGTATTAC
 TGTGCGAGAATCAGCGGGGTAGTGGGACCTGTCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGA
 ACCCTGATCACCGTCTCCTCT

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la LC de MAB8 (SEQ ID N°: 48)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC
 ACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGACCATTAGCAAGTATTTAAATTGGTATCAGCAG
 AAGCCAGGGAGAGCCCCTAAACTCTGATCTACTCTGCGTCCAGTTTGCAAAGTGGG
 GTCCCATCAAGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACC
 AGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGACCCTCC
 CAGATCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGATATCAAA

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la HC de MAB53 (SEQ ID N°: 49)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGGAAGCCGGGGTCCCTCGGTGAAG
 GTCTCCTGCAAGGTTTCTGGAGGCATCATTAGGAAATATGCTATCAACTGGGTGCGA
 CAGGCCCGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCGCTATCTTTAATACA
 GCAAATATGCACAGAAATCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAGTCCACG
 AGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCCCTTTATTAC
 TGTGCGAGAGGAATGAATTACTACAGTGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAGC
 CTTGTACCGTCTCCCA

5

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la LC de MAB53 (SEQ ID N°: 50)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
 ACCCTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGAAAGCAACAATTAGCCTGGTACCAG
 CACAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTTTGGTGCATCCAGCAGGGCCACT
 GGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATC
 AGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTATATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCA
 CCTGCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Se ofrecen los siguientes ejemplos para ilustrar, pero no para limitar la invención.

10 **Ejemplo 1**

Afinidad de MAB53 y MAB579

Se comunicó la afinidad de MAB53 en la publicación PCT citada anteriormente. Este anticuerpo se une fuertemente a HA de los clados H5, H7, H1 y H9, con menos afinidad por H2 y H3. MAB579 se une a HA con alta afinidad con respecto a H7 y a H3. Las Figuras 3A y 3B muestran típicos resultados usando el ensayo ForteBio™ estándar para cada anticuerpo.

15

Ejemplo 2

Neutralización de la infección por MAB486 y MAB579

Se ensayaron los MABs 486 y 579 para la inhibición de la infección por H1N1 y H3N2 (A/Perth/16/2009) y de la formación de placa en monocapas de células MDCK en presencia o ausencia de tripsina en la fase inicial de la infección. MAB484 y pAb x CP (un anticuerpo policlonal generado contra la secuencia consenso del sitio de escisión) neutralizan H1N1 (A/California/04/2009) solamente en ausencia de tripsina como se muestra en la Figura 4A, y no son capaces de inhibir la infección y la formación de placa si el virus se activa primero con tripsina. Esto muestra que los anticuerpos dirigidos a la región de fusión con epítopos que se basan en el péptido de fusión intacto (es decir, susceptible a proteasa) no son tan eficaces para controlar la infección viral. Como se muestra en la Figura 4B, MAB579 inhibe la infección tanto en presencia como en ausencia de tripsina.

20

25

La capacidad de MAB53 para neutralizar la infección se comunicó anteriormente, pero en la Tabla 3 a continuación una comparación de las afinidades y EC₅₀ para la neutralización in vitro se comparan con las de los anticuerpos monoclonales Crucell CR6261.

Tabla 3. Potencia in vitro de mAbs de Trellis frente a mAbs clonados a partir de patentes de Crucell

	Cepa	MAB53 K _D (nM)	EC ₅₀ de MAB53 (µg/ml)	EC ₅₀ de "CR6261" (µg/ml)	Diferencia de Potencia	
	H1N1	A/CA/07/09	0,1	0,14	4,0	30x
	H5N1	A/VN/1204	0,5	0,10	3,7	40x
	N2N2	A/Mallard/MN/2008	nd	1,20	nd	
	H9N2	Mallard/MN/98	nd	0,10	nd	
	Cepa	MAB579 K _D (nM)	EC ₅₀ de MAB579 (µg/ml)	EC ₅₀ de "CR8020" (µg/ml)	Diferencia de Potencia	
	H3N2	A/Wisconsin/67/2005	nd	1,0	3,5	3x
	H3N2	A/Perth/16/2009	0,8	0,05	2,0	40x
	H3N2	A/Nueva York/55/2004	0,2	2,0	10,0	5x
	H3N2	A/Hong Kong/8/68	0,2	2,0	7,6	3x
	H7N7	A/Holanda/219/03	0,4	0,7	13,1	20x
	H7N3	A/Canada/rv444/04	0,6	0,5	Nd	
	H4N4	A/Bufflehead	nd	15,0	>40	3x
	H10N7	A/Northern Shoveler	nd	0,8	nd	

5

Los valores de EC₅₀ se obtuvieron como se describió anteriormente

Ejemplo 3. Determinación de epítomos

Se usó la tecnología Pepscan CLIPS™ para mapear los sitios de unión de MAB53 y MAB579. Se sintetizaron aproximadamente 6.000 péptidos únicos de longitudes variables y con conectores de longitud variable para restringir los extremos de cada péptido para imitar la estructura nativa para H1 y para H3. Se confirmó la unión a la región del tallo por MAB53 y MAB579 usando sueros de conejo para la cabeza globular o el tallo como competidores, y mediante la unión directa a péptidos de la región del tallo. Como se ha señalado anteriormente, MAB486 se une tanto al Grupo 1 como al Grupo 2, pero solo en el estado pre activado antes de la escisión por la proteasa de HA₀ a HA1 y HA2 unidos por puentes disulfuro. Se concluyó que el epítomo para la unión a través de los clados es un epítomo discontinuo que abarca dos monómeros de la HA₀ trimérica nativa.

Ejemplo 4

Potencia in vivo (MAB53) y farmacocinéticas (MAB53 y MAB579)

Las cepas usadas en estos experimentos fueron:

H1N1: A/CA/04/09;

20 H5N1: A/Vietnam/1203/04/HPA1;

H3N2: A/Perth/16/09;

H7N3: A/Red Knot/NJ/1523470/06.

Para probar la profilaxis, se proporcionó MAB53 a ratones en una única dosis intraperitoneal de 10 mg/kg en el Día -1, que se continuó en el Día 0 con una dosis de virus 10 veces mayor que la LD₅₀ administrada por vía intranasal. Se determinó que la potencia exhibía un EC₅₀ a 0,4 mg/kg en comparación con el anticuerpo CR6261 de Crucell que,

25

según se informa, presenta un EC₅₀ de 1-1,5 mg/kg (Koudstaal, W., et al., J. Infect. Dis. (2009) 200: 1870-1873).

Para probar la eficacia terapéutica, se administró MAB como una única dosis intraperitoneal de 10 mg/kg en el Día +3 para la mayoría de las cepas o en el Día +1 para la H7N3. MAB53 fue completamente eficaz con respecto a H1N1 y H5N1, mientras que esencialmente todos los ratones de control estaban muertos el Día 10. Esencialmente MAB579 fue completamente eficaz contra H3N2 y H7N3 mientras que prácticamente todos los ratones de control estaban muertos antes del Día 10.

Se midió también la pérdida de peso y la disminución no fue peor que el 20% en los ratones tratados.

En comparación con el tratamiento con Tamiflu® (fosfato de oseltamivir), los ratones (10 por grupo) se anestesiaron y se infectaron por vía intranasal con 10 veces la dosis LD₅₀ de virus (Influenza H1N1 A/Ca/04/09). Se administró i.p. MAB53 (o IgG control humana de isotipo igualado) en el Día +1 después de la infección. Se administró Tamiflu® a través de sonda oral dos veces al día durante 4 días a partir del Día +1 después de la infección. Tanto la mortalidad como la morbilidad (evaluadas mediante la pérdida de peso) fueron mucho más severas para la cohorte del Tamiflu® en comparación con la cohorte de MAB53.

Para los controles, todos los ratones murieron ocho días después de la infección. Para aquellos tratados con Tamiflu®, todos los ratones menos dos murieron antes de los ocho días posteriores a la infección; estos dos ratones sobrevivieron al menos hasta el Día 14. En el grupo tratado con MAB53, ocho de los diez ratones sobrevivieron después del Día 8 hasta el Día 14.

Con respecto a la pérdida de peso, el grupo control bajó de peso al 70% de su peso inicial después de ocho días. Las disminuciones de peso se revirtieron el Día 4 para los ratones tratados con MAB53 y se superó el peso original el Día 14. En los ratones tratados con Tamiflu®, se revirtió la pérdida de peso el Día 6, pero sólo se obtuvo el 92% del peso original el Día 14.

También se examinó la farmacocinética en ratones para MAB53 y MAB579. Estos muestran una vida media en ratones de aproximadamente 7-14 días correspondientes a una vida media en seres humanos de 3-4 semanas. Esto corresponde a la típica para un MAB IgG κ. El anticuerpo biespecífico MAB579/53Bi (véase Ejemplo 5) muestra una vida media similar.

Ejemplo 5

Construcción de MAB579/53Bi

La construcción de MAB579/53Bi proporciona una porción scFv de MAB53 acoplada a la región constante de MAB579 como se muestra en la Figura 5. La construcción de dichos anticuerpos biespecíficos es bien conocida en la técnica (Marvin, J. S., Acta Pharmacologica Sinica (2005) 26: 649-658). Por lo tanto, MAB579/53Bi proporciona unión bivalente en ambos extremos de la molécula junto con una región Fc intacta. La Tabla 4 muestra que el anticuerpo biespecífico conserva la afinidad de los anticuerpos independientes medida mediante ForteBio™ en nM. El anticuerpo biespecífico conserva además la capacidad de neutralización de los anticuerpos individuales de los que está compuesto y tiene una EC₅₀ de 3,5 µg/ml frente a H1N1; 6,0 5 µg/ml frente a H5N5, y 2,2 µg/ml frente a H3N2.

Tabla 4. Afinidad mediante ForteBio™ (nM)

	Cepa	MAB53	MAB579	Bi-específico
H1	Calif/07/09	0,2		0,3
H5	Vietnam/1203/2004	0,5		2,5
H3	Hong Kong/8/1968		0,2	0,2
H3	Perth 16/09		0,7	1,3
H7	Holanda/219/03		0,4	0,3

Ejemplo 6

Potencia in vivo de MAB579/53Bi

Se midió la eficacia in vivo como se describe de modo general en el Ejemplo 4 con los resultados que se muestran en las Figuras 6A-6E.

Como se muestra en la Figura 6A y 6C, los ratones se infectaron con A/Ca/04/09 (H1N1) (que representa al Grupo 1

5 de Influenza) en el Día 0, y se trataron con inyección IP con 10 mg/ml de MAB53 solo, 10 mg/ml de MAB579 solo o una mezcla de MAB53 y MAB579 (Figura 6A) o el anticuerpo biespecífico (Figura 6C) en el Día 2, (la Figura 6C también muestra curvas de la pérdida de peso). Los controles recibieron IgG a 20 mg/Kg. Se administró la mezcla de MABs a 10 mg/kg cada uno y el anticuerpo biespecífico se administró a 10 mg/kg. Como se muestra en la Figura 6A, la mezcla de MAB53 y MAB579, así como MAB53 solo, fueron protectores, mientras que MAB579 y el control no dieron lugar a supervivientes después de 10 días. Como se muestra en la Figura 6C, el anticuerpo biespecífico fue igual de eficaz que la mezcla.

10 Se obtuvieron resultados similares en el protocolo análogo para ratones infectados con un representante del Grupo 2 Filipinas 2/82 (H2N3) como se muestra en las Figuras 6B y 6D. (La Figura 6D también muestra curvas de pérdida de peso). Como se muestra en Figura 6B, la mezcla fue eficaz contra este virus como lo fue MAB579, pero MAB53 solo y el control dio como resultado la muerte después de 10 días. En la Figura 6D, se demuestra que el anticuerpo biespecífico es igualmente eficaz que la mezcla.

15 La Figura 6E muestra los resultados del tratamiento de la infección usando el protocolo análogo en el que el desafío fue con representantes del Grupo 1 y del Grupo 2, H1N1 y H2N3, que infectaron al mismo ratón. Fue completamente protectora una combinación de MAB579 y MAB53 cada uno a 3 mg/kg y a 1 mg/kg cada uno protegió el 80% de los ratones. Esto es significativo porque la co-infección ocurre en la naturaleza, lo que da como resultado virus recombinados que pueden causar una pandemia.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal que se une a un virus de influenza A que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKTSGYTFYAYTIHWVRQAPGQRLEWMGWIN
AGNGHTKYSQRFKGRVTITRDTSARTTYMELRSLTSEDYALYFCARGPETYYDYDKT
NW LNSHPDEYFQHWGHGTQVTVSS

5 y una cadena ligera que comprende la secuencia

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQTINNYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLE
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLPDDFATYYCQEQYNNDSPLTFGGGTKVEIK

2. El anticuerpo de la reivindicación 1 que es un anticuerpo biespecífico o un fragmento y contiene además una región variable de cadena pesada que comprende

CDR1 de la secuencia KYAIN, y

10 CDR2 de la secuencia GIIAIFNTANYAQKFQG, y

CDR3 de la secuencia GMNYYSDYFDY, y

una región variable de cadena ligera que comprende

CDR1 de la secuencia RASQSVRSNNLA, y

CDR2 de la secuencia GASSRAT, y

15 CDR3 de la secuencia QQYGSSPALT.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1 que es un anticuerpo biespecífico que comprende además una cadena pesada que comprende

a)

QVQLVQSGAEVRKPGSSVKVCKVSGGIIRKYAINWVRQAPGQGLEWMGGI
IAIFNTANYAQKFQGRVTITADESTSTVYMESSLRSEDYALYYCARGMNYY
SDYFDYWG QGSLVTVSP

20 o

b)

EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSTYTMWVRQAPGQGLEWVSSI
TRTSSNIYYADSVGRFTISRDNKNSLYLQMHSRVEDTAVYYCARISGVV
GPVDFDYWGQGTLITVSS

y

en a) comprende una cadena ligera que comprende la secuencia

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRSNNLAWYQHKPGQAPRLLIFGASSR
25 ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPALTFFGGGTKVEIK,

o

en b) comprende una cadena ligera que comprende la secuencia

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQTISKYLNWYQQKPGRAPKLLIYSASSLQ
SGVPSRFTGSGSGTDFTLTISSLPDDFATYYCQQSYRPSQITFGPGTKVDIK .

4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que es humano o humanizado.

30 5. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para usar en un método para el tratamiento o profilaxis de la infección por influenza en un sujeto.
7. Un sistema de expresión recombinante que comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican la región variable de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 ligado operativamente a secuencias de control para la expresión.
8. Células huésped recombinantes modificadas para contener el sistema de expresión de la reivindicación 7.
9. Un método para producir un anticuerpo monoclonal inmunoreactivo frente al virus de la influenza cuyo método comprende cultivar las células de la reivindicación 8 en condiciones en donde se expresa dicha secuencia de nucleótidos.

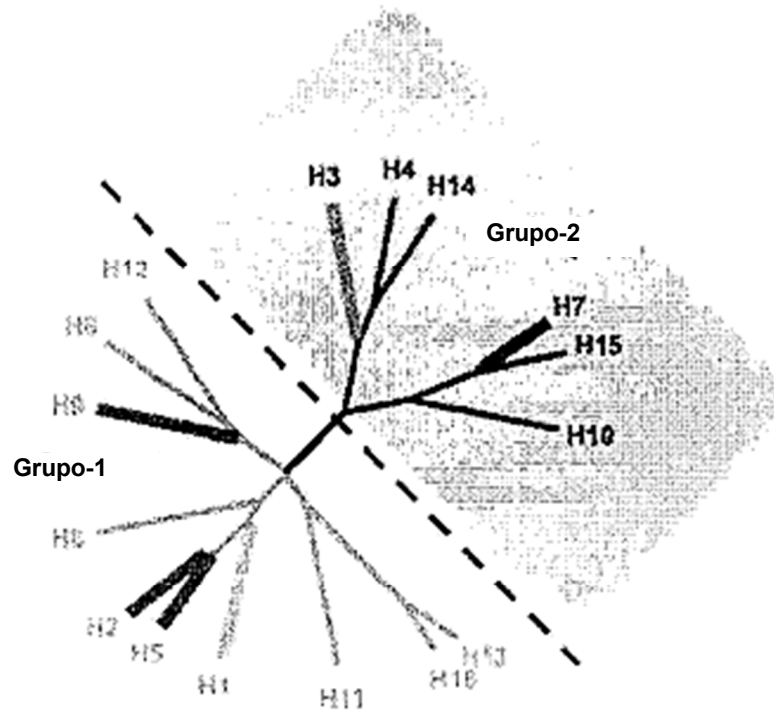


Figura 1

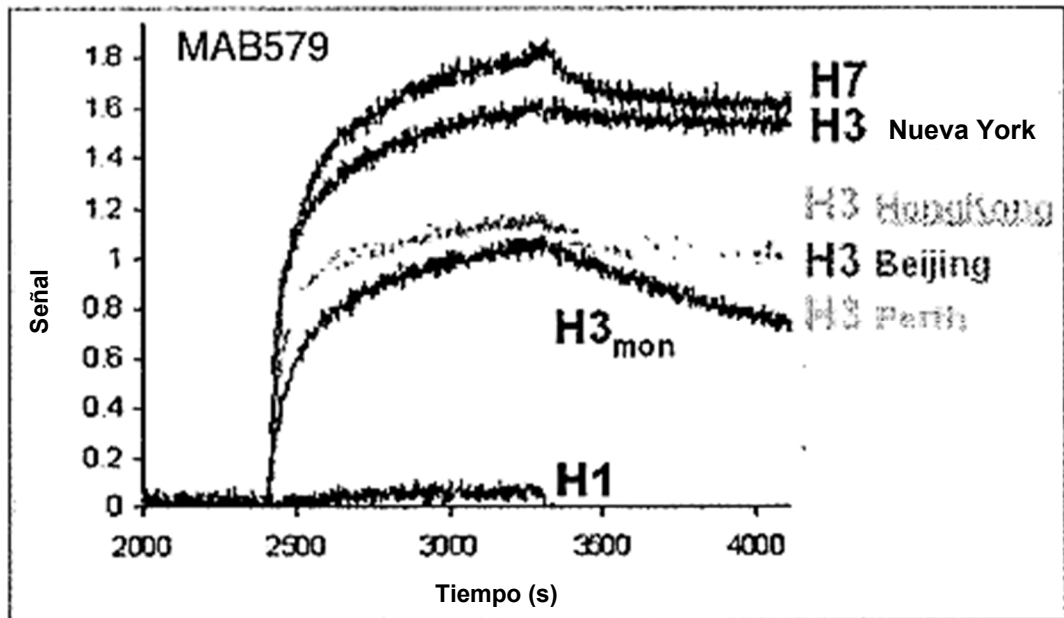


Figura 2

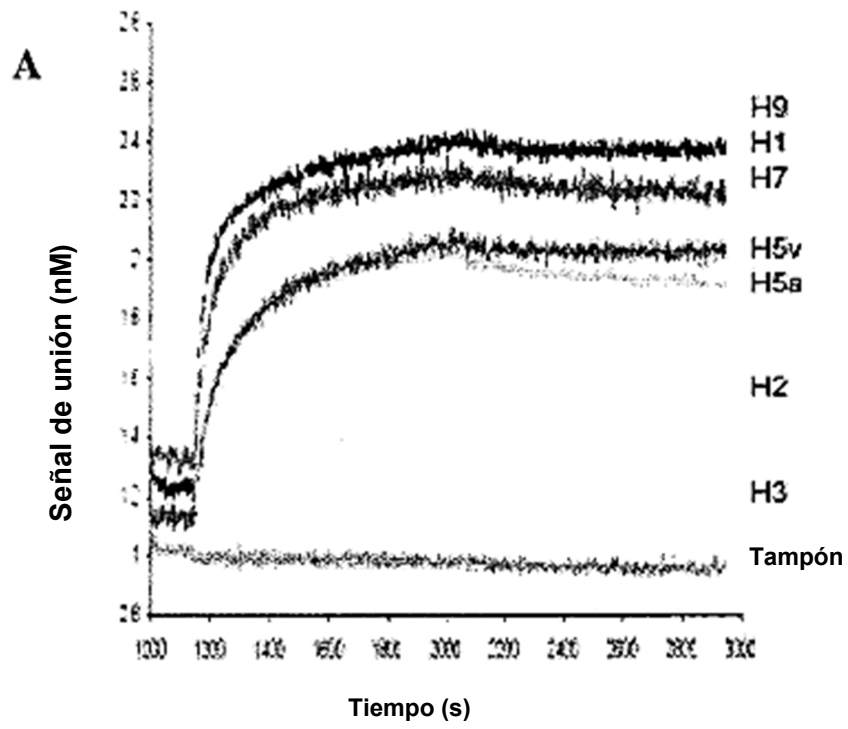


Figura 3A

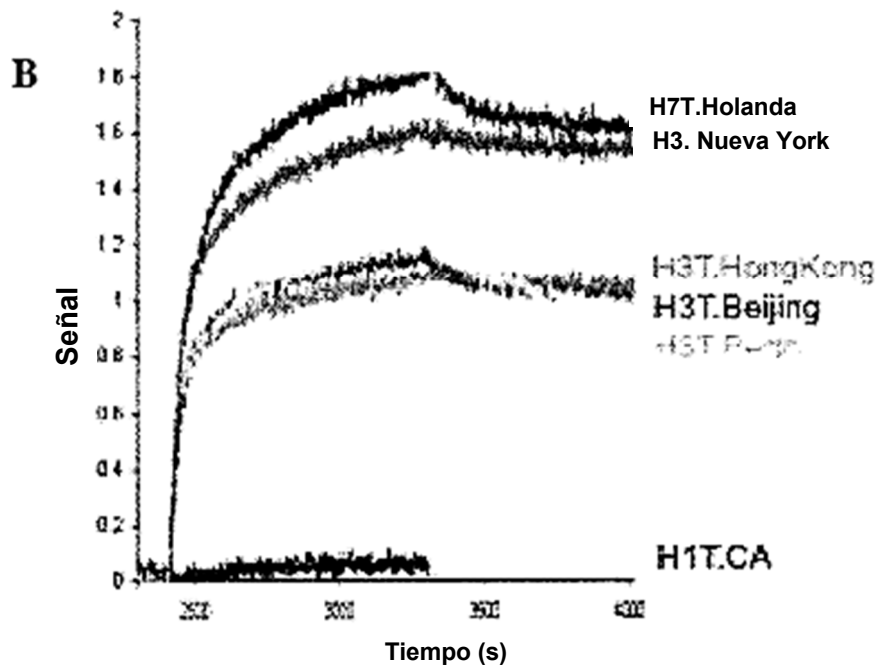


Figura 3B

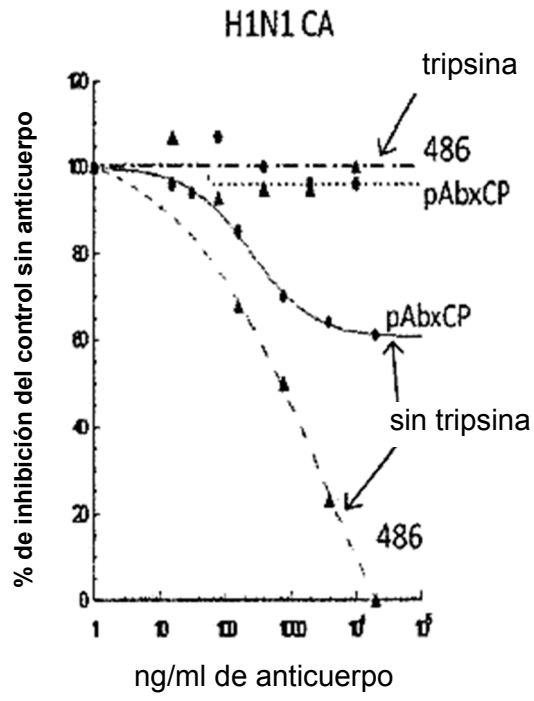


Figura 4A

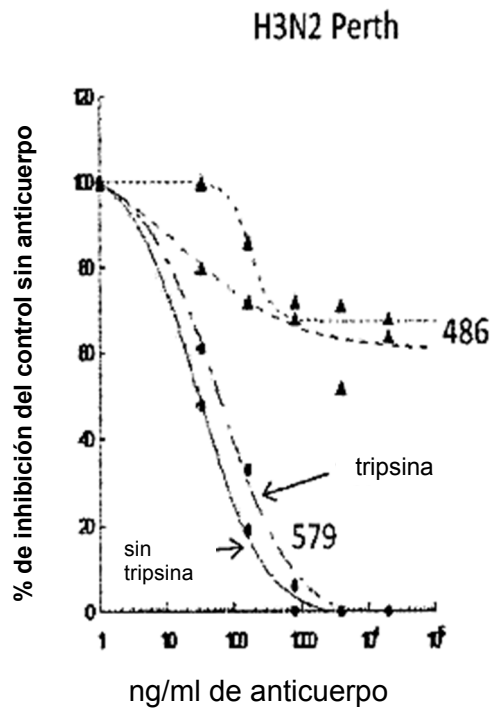


Figura 4B

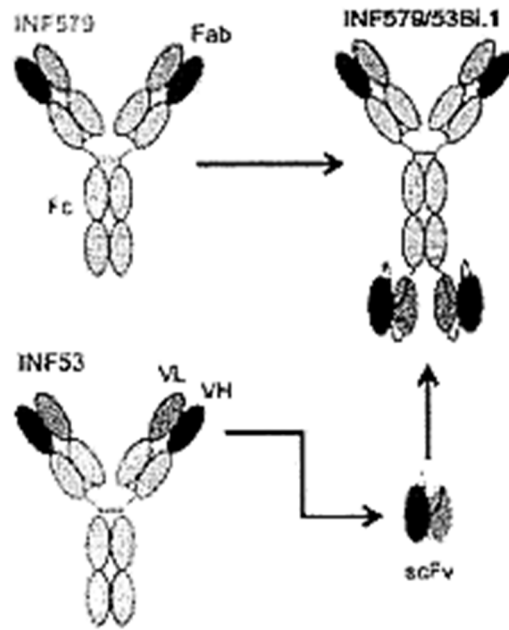


Figura 5

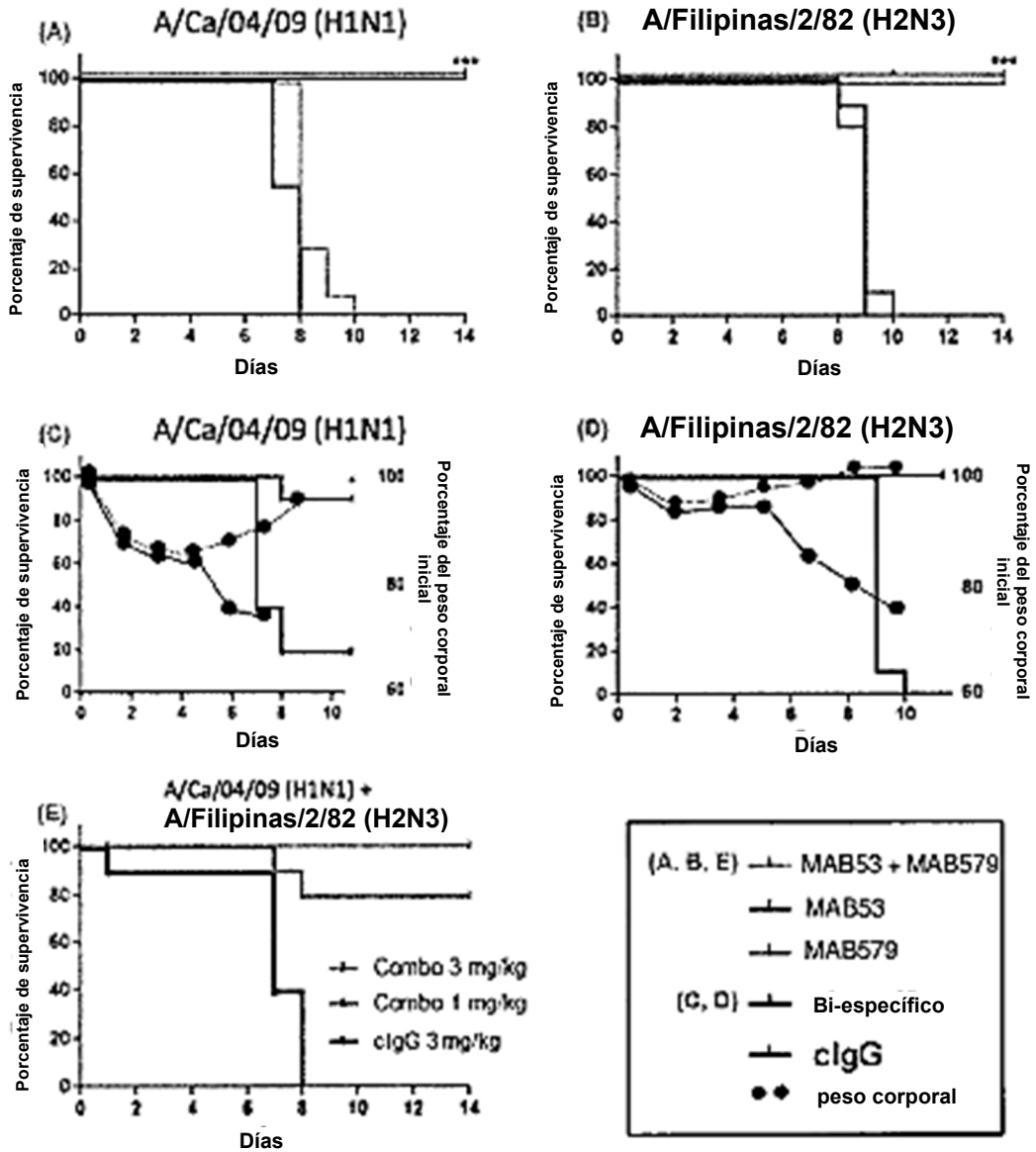


Figura 6A-6E