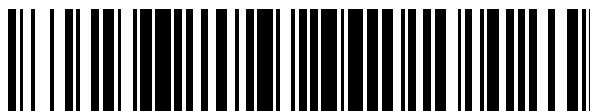


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 899**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2012 PCT/GB2012/052164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13030604**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2012 E 12756552 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2750708**

54 Título: **Composiciones de anticuerpos contra el virus de la gripe**

30 Prioridad:

02.09.2011 GB 201115214

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

06.02.2019

73 Titular/es:

**THE SECRETARY OF STATE FOR HEALTH
(100.0%)**

**Richmond House, 79 Whitehall
London SW1A 2NS, GB**

72 Inventor/es:

HUFTON, SIMON

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones :

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

ES 2 698 899 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

Composiciones de anticuerpos contra el virus de la gripe

- 5 La presente divulgación se refiere a composiciones de anticuerpos y al uso de los mismos para prevenir o tratar una infección por gripe. La presente divulgación también se refiere al uso de dichas composiciones de anticuerpos para evaluar la reactividad cruzada y el contenido de antígeno de hemaglutinina de vacunas contra la gripe en ensayos de potencia de la vacuna.
- 10 La aparición de cepas virales de gripe altamente patógenas supone una seria amenaza para la salud pública a escala mundial. Aunque las vacunas son el pilar de la infección, el control del espacio entre la aparición de nuevas cepas virales y una vacuna clínicamente aprobada presenta, está aumentando una seria preocupación en particular como la resistencia a fármacos antivirales existentes, tales como oseltamavir™ y zanamivir™.
- 15 Una estrategia actual es la inmunoterapia pasiva con suero de pacientes convalecientes. Esta estrategia, sin embargo, tiene limitaciones importantes para la aplicación en toda la población, tal como el coste prohibitivo, alto riesgo de toxicidad, dosificación incierta y dificultad en la administración.
- 20 Otra estrategia es almacenar anticuerpos monoclonales recombinantes para su despliegue inmediato tras la aparición de una nueva amenaza de pandemia. A modo de ejemplo, informes recientes han descrito el aislamiento de anticuerpos humanos funcionales de los supervivientes de la pandemia de gripe de 1918 (Kashyap et al., 2008), de individuos vacunados estacionales (Ekiert et al., 2009) y de bibliotecas de anticuerpos humanos sin tratamiento previo (Sui et al., 2009). Sin embargo, aunque los anticuerpos monoclonales convencionales son generalmente considerados como una clase exitosa de fármaco, su alto coste y complejidad son una limitación
- 25 importante. Además, en vista de la epidemiología rápidamente cambiante del virus de la gripe, dicha estrategia con anticuerpos monoclonales requeriría la provisión de un anticuerpo monoclonal que demuestre la reactividad a través de diferentes subtipos virales. Este problema presenta actualmente un gran desafío para la tecnología de anticuerpos monoclonales.
- 30 La gripe pandémica se produce cuando aparece un nuevo virus e infecta una población humana global que tiene poca o ninguna inmunidad preexistente. El más reciente H1N1 2009 pandémico, a pesar de una considerable carga económica, no dio lugar a las mismas tasas de mortalidad que las pandemias anteriores como la “gripe española” pandémica de 1918, lo que dio lugar a una estimación de 50 millones de muertes en todo el mundo. El virus de la gripe aviar H5N1 altamente patógeno ha mostrado tasas de mortalidad del 60% en seres humanos infectados y pone
- 35 de relieve claramente el riesgo que presenta la gripe pandémica.
- Las opciones de tratamiento actuales se dividen en dos categorías; fármacos antivirales o vacunas. Los fármacos antivirales actuales reconocen la neuraminidasa viral (por ejemplo Oseltamavir™) o el canal iónico M2 (por ejemplo Amantadina™); los cuales pueden llegar a ser ineficaces con el tiempo debido a la creciente resistencia. Las
- 40 vacunas son la piedra angular del control de la infección, pero tienen limitaciones en que se necesita un tiempo significativo para desarrollar una vacuna tras la aparición de una nueva cepa viral, no actúan rápidamente, no son eficaces en todos los grupos de población (por ejemplo, pacientes inmunocomprometidos), la protección es ampliamente específica de la cepa y hay una capacidad de producción limitada en todo el mundo. Por lo tanto, existe una clara necesidad de nuevas opciones de tratamiento.
- 45 Otro problema en la técnica es la necesidad de estandarización y control de vacunas de la gripe estacional y pandémica. Actualmente, el ensayo de inmunodifusión radial simple (SRD) se considera un ensayo “estándar de oro” para determinar el contenido de antígeno de HA en vacunas contra la gripe. Este ensayo requiere el desarrollo de antisuero de referencia para cada nueva cepa viral, que habitualmente puede agregar 2-3 meses a la línea de desarrollo de vacunas. Naturalmente, la eliminación de este retardo sería muy valiosa en el montaje de una
- 50 respuesta rápida a una emergencia pandémica. Con este fin, hay una necesidad de un reactivo de “anticuerpo universal”, que comprenda anticuerpos de reacción cruzada que puedan usarse en un ensayo de SRD o en otros formatos de ensayo relacionado basados en, por ejemplo, ELISA, resonancia de plasmón superficial (SPR) o espectrometría de masas.
- 55 Por tanto, existe una necesidad urgente de opciones de tratamiento alternativo del virus de la gripe para un ensayo de detección robusto del virus de la gripe y/o para un ensayo de potencia de la vacuna basado en el antígeno del virus de la gripe.
- 60 La presente divulgación se dirige a uno o más de los problemas anteriores proporcionando un anticuerpo tal como se describe en el presente documento. La presente invención se define por las reivindicaciones. Estos aspectos/casos de la presente divulgación que constituyen la presente invención se definen por las reivindicaciones.
- 65 Una característica principal de los anticuerpos de la presente divulgación es que poseen una región determinante de complementariedad (CDR), por ejemplo una secuencia de aminoácidos de CDR3, de un anticuerpo de un único dominio V_{HH} de alpaca.

En un caso, la presente divulgación comprende o consiste en un anticuerpo de un único dominio de camélido (por ejemplo un anticuerpo de un único dominio de alpaca); dichos anticuerpos tienen una estructura proteica muy simple y robusta y muestran varias ventajas sobre los anticuerpos monoclonales convencionales, tales como: (i) tamaño: los anticuerpos de un único dominio son aproximadamente 1/10º el tamaño de los anticuerpos monoclonales. Como resultado, dichos anticuerpos tienen la capacidad de acceder a epítomos enterrados u ocultos que normalmente estarían en silencio para el sistema inmunitario humano (por ejemplo, acceso a epítomos más conservados enterrados en la región del tallo de hemaglutinina); (ii) producción a coste significativamente menor que los anticuerpos monoclonales convencionales; (iii) procedimientos más simples para diseñar anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos; (iv) bucles de CDR3 más largos que los anticuerpos convencionales, lo que facilita acceder más fácilmente a hendiduras y ranuras en las superficies antigénicas; y/o (v) alta estabilidad estructural.

En un caso, un anticuerpo de la divulgación se une a un virus de la gripe H1 (por ejemplo, un virus de la gripe H1N1), por ejemplo un virus de la gripe H1 (por ejemplo, H1N1) pandémica. En un caso, el anticuerpo se une a la cepa A/California/06/09 y/o A/California/07/2009 y/o A/Brisbane/59/2007.

En un caso un anticuerpo de la divulgación tiene una CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1-19; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en el que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 1-19. En este sentido, las SEQ ID NOS 1-19 se definen de acuerdo con la nomenclatura de Kabat convencional.

En otro caso, un anticuerpo de la divulgación tiene una CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 20-38; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en el que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 20-38. En este sentido, las SEQ ID NOS 20-38 se definen de acuerdo con la sistema de información internacional ImMunoGeneTics convencional para la nomenclatura de inmunoglobulinas o anticuerpos (IMGT).

Un anticuerpo de la divulgación puede incluir además una CDR2, en el que dicha CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 39-57; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en el que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 39-57. En este sentido, las SEQ ID NOS 39-57 se definen según la nomenclatura de Kabat convencional. Alternativamente, dicha CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 58-76; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 58-76. En este sentido, las SEQ ID NOS 58-76 se definen de acuerdo con la nomenclatura IMGT convencional.

Simplemente a modo de ilustración, un anticuerpo de la divulgación puede comprender combinaciones de CDR3 y CDR2, tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, basadas en las siguientes combinaciones de SEQ ID NOS:

1 más 39 o 58; 20 más 39 o 58;
 2 más 40 o 59; 21 más 40 o 59;
 3 más 41 o 60; 22 más 41 o 60;
 4 más 42 o 61; 23 más 42 o 61;
 5 más 43 o 62; 24 más 43 o 62;
 6 más 44 o 63; 25 más 44 o 63;
 7 más 45 o 64; 26 más 45 o 64;
 8 más 46 o 65; 27 más 46 o 65;
 9 más 47 o 66; 28 más 47 o 66;
 10 más 48 o 67; 29 más 48 o 67;
 11 más 49 o 68; 30 más 49 o 68;
 12 más 50 o 69; 31 más 50 o 69;
 13 más 51 o 70; 32 más 51 o 70;
 14 más 52 o 71; 33 más 52 o 71;
 15 más 53 o 72; 34 más 53 o 72;
 16 más 54 o 73; 35 más 54 o 73;
 17 más 55 o 74; 36 más 55 o 74;
 18 más 56 o 75; 37 más 56 o 75;
 19 más 57 o 76; 38 más 57 o 76.

Además de la característica de CDR3 mencionada anteriormente (y, opcionalmente, además de la característica de CDR2 mencionada anteriormente), un anticuerpo de la divulgación puede incluir además un CDR1, en el que dicha CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 77-95; o una

secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 77-95. En este sentido, las SEQ ID NOs 77-95 se definen según la nomenclatura de Kabat convencional. Alternativamente, dicha CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 96-114; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 96-114. En este sentido, las SEQ ID NOs 96-114 se definen de acuerdo con la nomenclatura IMGT convencional.

10 Simplemente a modo de ilustración, un anticuerpo de la divulgación puede comprender combinaciones de CDR3 y CDR1, tal como se ha definido anteriormente, basadas en las siguientes combinaciones de SEQ ID NOs:

- 1 más 77 o 96; 20 más 77 o 96;
- 2 más 78 o 97; 21 más 78 o 97;
- 3 más 79 o 98; 22 más 79 o 98;
- 15 4 más 80 o 99; 23 más 80 o 99;
- 5 más 81 o 100; 24 más 81 o 100;
- 6 más 82 o 101; 25 más 82 o 101;
- 7 más 83 o 102; 26 más 83 o 102;
- 8, más 84 o 103; 27 más 84 o 103;
- 20 9 más 85 o 104; 28 más 85 o 104;
- 10 más 86 o 105; 29 más 86 o 105;
- 11 más 87 o 106; 30 más 87 o 106;
- 12 más 88 o 107; 31 más 88 o 107;
- 13 más 89 o 108; 32 más 89 o 108;
- 25 14 más 90 o 109; 33 más 90 o 109;
- 15 más 91 o 110; 34 más 91 o 110;
- 16 más 92 o 111; 35 más 92 o 111;
- 17 más 93 o 112; 36 más 93 o 112;
- 18 más 94 o 113; 37 más 94 o 113;
- 30 19 más 95 o 114; 38 más 95 o 114.

Una vez más, simplemente a modo de ilustración, un anticuerpo de la divulgación puede comprender combinaciones de CDR3 más CDR2 y CDR1, tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, basadas en las siguientes combinaciones de SEQ ID NOs:

- 35 1 más 39 más 77; 20 más 58, más 96;
- 2 más 40 más 78; 21 más 59 más 97;
- 3 más 41 más 79; 22 más 60 más 98;
- 4 más 42 más 80; 23 más 61, más 99;
- 5 más 43 más 81; 24 más 62 más 100;
- 40 6 más 44 más 82; 25 más 63 más 101;
- 7 más 45 más 83; 26 más 64 más 102;
- 8 más 46 más 84; 27 más 65 más 103;
- 9 más 47 más 85; 28 más 66 más 104;
- 10 más 48, más 86; 29 más 67 más 105;
- 45 11 más 49 más 87; 30 más 68 más 106;
- 12 más 50, más 88; 31 más 69 más 107;
- 13 más 51, más 89; 32 más 70 más 108;
- 14 más 52 más 90; 33 más 71 más 109;
- 15 más 53, más 91; 34 más 72 más 110;
- 50 16 más de 54 más 92; 35 más 73, más 111;
- 17 más 55 más 93; 36 más 74 más 112;
- 18 más 56, más 94; 37 más 75 más 113;
- 19 más 57, más 95; 38 más 76 más 114.

55 En un caso, un anticuerpo de la divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 115-133. En un caso relacionado, dicho anticuerpo conserva la secuencia de aminoácidos de CDR3 precisa, tal como se ha definido anteriormente, y opcionalmente la secuencia de aminoácidos de CDR1 precisa y/o la secuencia de aminoácidos de CDR2 precisa, tal como se define anteriormente en el presente documento.

60 En un segundo aspecto relacionado, un anticuerpo de la divulgación se une no sólo al virus de la gripe H1 (tal como se describe anteriormente en el presente documento), sino también a un virus de la gripe H5 (por ejemplo, H5N1 o H5N3), por ejemplo un virus de la gripe H5 pandémico. En un caso, el anticuerpo se une a la cepa A/Vietnam/1203/2004 y/o A/Vietnam/1194/2004 y/o A/Vietnam/119/2004 y/o A/Hong Kong/213/2003 y/o A/pavo/Turquía/1/2005 y/o A/Indonesia/05/2005 y/o A/Pato/Singapur-Q/119-3/97. En un caso, de este aspecto, un anticuerpo de la divulgación tiene una CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo

que consiste en: SEQ ID NO: 3-4, 6-7, 10, 13 o 15; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la correspondiente secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3-4, 6-7, 10, 13 o 15. Alternativamente, dicha CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 22-23, 25-26, 29, 32 o 34; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la correspondiente secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22-23, 25-26, 29, 32 o 34.

Un anticuerpo del segundo aspecto puede incluir además una CDR2, en la que dicha CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 41-42, 44-45, 48, 51 o 53; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la correspondiente secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41-42, 44-45, 48, 51 o 53. Alternativamente, dicha CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 60-61, 63-64, 67, 70 o 72; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la correspondiente secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60-61, 63-64, 67, 70 o 72.

Simplemente, a modo de ilustración, un anticuerpo del segundo aspecto puede comprender combinaciones de CDR 3 y CDR2, tal como se han definido anteriormente en el presente documento, para el segundo aspecto basado en las siguientes combinaciones de SEQ ID NOS:

3 más 41 o 60; 22 más 41 o 60;
4 más 42 o 61; 23 más 42 o 61;
6 más 44 o 63; 25 más 44 o 63;
7 más 45 o 64; 26 más 45 o 64;
10 más 48 o 67; 29 más 48 o 67;
13 más 51 o 70; 32 más 51 o 70;
15 más 53 o 72; 34 más 53 o 72.

Un anticuerpo del segundo aspecto, además de la característica de CDR3 mencionada anteriormente (y, opcionalmente, además de la característica de CDR2 mencionada anteriormente), puede incluir además una CDR1, en la que dicha CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 79-80, 82-83, 86, 89 o 91; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la correspondiente secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79-80, 82-83, 86, 89 o 91. Alternativamente, dicha CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 98-99, 101-102, 105, 108 o 110; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 98-99, 101-102, 105, 108 o 110.

Simplemente, a modo de ilustración, un anticuerpo del segundo aspecto puede comprender combinaciones de CDR3 y CDR1, tal como se han definido anteriormente en el presente documento para el segundo aspecto, basadas en las siguientes combinaciones de SEQ ID NOS:

3 más 79 o 98; 22 más 79 o 98;
4 más 80 o 99; 23 más 80 o 99;
6 más 82 o 101; 25 más 82 o 101;
7 más 83 o 102; 26 más 83 o 102;
10 más 86 o 105; 29 más 86 o 105;
13 más 89 o 108; 32 más 89 o 108;
15 más 91 o 110; 34 más 91 o 110.

Una vez más, simplemente a modo de ilustración, un anticuerpo del segundo aspecto puede comprender las combinaciones CDR3 más CDR2 y CDR1, tal como se han definido anteriormente para el segundo aspecto, basadas en las siguientes combinaciones de SEQ ID NOS:

3 más 41 más 79; 22 más 60 más 98;
4 más 42 más 80; 23 más 61, más 99;
6 más 44 más 82; 25 más 63 más 101;
7 más 45 más 83; 26 más 64 más 102;
10 más 48, más 86; 29 más 67 más 105;
13 más 51, más 89; 32 más 70 más 108
15 más 53, más 91; 34 más 72 más 110.

Un anticuerpo del segundo aspecto puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 117-118, 120-121, 124, 127 o 129. En un caso relacionado, dicho anticuerpo conserva la secuencia de aminoácidos de CDR3 exacta, tal como se ha definido antes en el presente documento, y opcionalmente la

secuencia de aminoácidos de CDR1 exacta y/o la secuencia de aminoácidos de CDR2 exacta, tal como se ha definido antes en el presente documento.

En un tercer aspecto relacionado, un anticuerpo de la divulgación se une no sólo a un virus de la gripe H1 y a un virus de la gripe H5 (tal como se han descrito anteriormente en el presente documento), sino también a 1) un virus de la gripe H2 (por ejemplo, H2N2 o H2N3), tales como a un virus de la gripe H2 pandémico (por ejemplo, H2N2 o H2N3), y a 2) un virus de la gripe H9 (por ejemplo, H9N2), tales como un virus de la gripe H9 pandémico (por ejemplo, H9N2). Por ejemplo, el anticuerpo se une a una cepa del virus de la gripe H2 A/Japón/305/1957 y/o al A/Mallard/Eng/727/06. Por ejemplo, el anticuerpo se une a una cepa del virus de la gripe H9 A/Hong Kong/1073/99. En un caso de este aspecto, un anticuerpo de la divulgación tiene una CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3, 4, 7 o 10; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la correspondiente secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4, 7 o 10. Alternativamente, dicha CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 22, 23, 26 o 29; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 22, 23, 26 o 29.

Un anticuerpo del tercer aspecto puede incluir además una CDR2, en la que dicha CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 41, 42, 45 o 48; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la correspondiente secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41, 42, 45 o 48. Alternativamente, dicha CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 60, 61, 64 o 67; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 60, 61, 64 o 67.

Simplemente a modo de ilustración, un anticuerpo del tercer aspecto puede comprender combinaciones de CDR 3 y CDR2, tal como se han definido anteriormente en el presente documento para el tercer aspecto, basadas en las siguientes combinaciones de SEQ ID NOs:
3 más 41 o 60; 22 más 41 o 60;
4 más 42 o 61; 23 más 42 o 61;
7 más 45 o 64; 26 más 45 o 64;
10 más 48 o 67; 29 más 48 o 67.

Un anticuerpo del tercer aspecto, además de la característica de CDR3 mencionada anteriormente (y, opcionalmente, además de la característica de CDR2 mencionada anteriormente), puede incluir además una CDR1, en la que dicha CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 79, 80, 83 o 86; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la correspondiente secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 80, 83 o 86. Alternativamente, dicha CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 98, 99, 102 o 105; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 98, 99, 102 o 105.

Simplemente a modo de ilustración, un anticuerpo del tercer aspecto puede comprender combinaciones de CDR3 y CDR1, tal como se han definido anteriormente en el presente documento para el tercer aspecto, basadas en las siguientes combinaciones de SEQ ID NOs:
3 más 79 o 98; 22 más 79 o 98;
4 más 80 o 99; 23 más 80 o 99;
7 más 83 o 102; 26 más 83 o 102;
10 más 86 o 105; 29 más 86 o 105.

Una vez más, simplemente a modo de ilustración, un anticuerpo del tercer aspecto puede comprender combinaciones de CDR3 más CDR2 y CDR1, tal como se han definido anteriormente en el presente documento para el tercer aspecto, basadas en las siguientes combinaciones de SEQ ID NOs:
3 más 41 más 79; 22 más 60 más 98;
4 más 42 más 80; 23 más 61 más 99;
7 más 45 más 83; 26 más 64 más 102;
10 más 48, más 86; 29 más 67 más 105;
15 más 53, más 91; 34 más 72 más 110.

Un anticuerpo del tercer aspecto puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de

identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 117, 118, 121 o 124. En un ejemplo relacionado, dicho anticuerpo conserva la secuencia de aminoácidos de CDR3 exacta, tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, y opcionalmente la secuencia de aminoácidos de CDR1 exacta y/o la secuencia de aminoácidos de CDR2 exacta, tal como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En un cuarto aspecto relacionado, un anticuerpo de la divulgación se une no sólo a un virus de la gripe H1 y a un virus de la gripe H5 (tal como se describe anteriormente en el presente documento), sino también a un virus de la gripe H2 (por ejemplo, H2N2 o H2N3), por ejemplo a un virus de la gripe H2 pandémico (por ejemplo, H2N2 o H2N3). A modo de un ejemplo específico de virus de la gripe H2, el anticuerpo se une a la cepa A/Japón/305/1957 y/o a A/Mallard/Eng/727/06. En un caso de este aspecto, un anticuerpo de la divulgación tiene una CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 6 o 15; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 6 o 15. Alternativamente, dicha CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 25 o 34; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 25 o 34.

Un anticuerpo del cuarto aspecto puede incluir además una CDR2, en la que dicha CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 44 o 53; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 44 o 53. Alternativamente, dicha CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 63 o 72; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 63 o 72.

Simplemente a modo de ilustración, un anticuerpo del cuarto aspecto puede comprender combinaciones de CDR3 y CDR2, tal como se han definido anteriormente en el presente documento para el cuarto aspecto, basadas en las siguientes combinaciones de SEQ ID NOs:
6 más 44 o 63; 25 más 44 o 63;
15 más 53 o 61; 34 más 53 o 61.

Un anticuerpo del cuarto aspecto, además de la característica de CDR3 mencionada anteriormente (y, opcionalmente, además de la característica de CDR2 mencionada anteriormente), puede incluir además una CDR1, en la que dicha CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 82 o 91; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 62 o 91. Alternativamente, dicha CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 101 o 110; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 101 o 110.

Simplemente a modo de ilustración, un anticuerpo del cuarto aspecto puede comprender combinaciones de CDR3 y CDR1, tal como se han definido anteriormente en el presente documento para el cuarto aspecto, basadas en las siguientes combinaciones de SEQ ID NOs:
6 más 82 o 101; 25 más 82 o 101;
15 más 91 o 110; 34 más 91 o 110.

Una vez más, simplemente a modo de ilustración, un anticuerpo del cuarto aspecto puede comprender combinaciones de CDR3 más CDR2 y CDR1, tal como se han definido anteriormente en el presente documento, para el cuarto aspecto basadas en las siguientes combinaciones de SEQ ID NOs:
6 más 44 más 82; 25 más 63 más 101;
15 más 53 más 91; 34 más 72 más 110.

Un anticuerpo del cuarto aspecto puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 120 o 129. En un ejemplo relacionado, dicho anticuerpo retiene la secuencia de aminoácidos de CDR3 exacta, tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, y opcionalmente la secuencia de aminoácidos de CDR1 exacta y/o la secuencia de aminoácidos de CDR2 exacta, tal como se define anteriormente en el presente documento.

En un quinto aspecto relacionado, un anticuerpo de la divulgación se une no sólo a un virus de la gripe H1 y a un virus de la gripe H5 (tal como se describe anteriormente en el presente documento), sino también a un virus de la

gripe H9 (por ejemplo, H9N2), por ejemplo a un virus de la gripe H9 pandémica (por ejemplo, H9N2). A modo de ejemplo específico de virus de la gripe H9, el anticuerpo se une a la cepa A/Hong Kong/1073/99. En un caso de este aspecto, un anticuerpo de la divulgación tiene una CDR3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 13; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 13. Alternativamente, dicha CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 32; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 32.

Un anticuerpo del quinto aspecto puede incluir además una CDR2, en la que dicha CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 51 o 70; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 51 o 70.

Simplemente a modo de ilustración, un anticuerpo del quinto aspecto puede comprender combinaciones de CDR3 y CDR2, tal como se han definido anteriormente en el presente documento para el quinto aspecto, basadas en las siguientes combinaciones de SEQ ID NOs: 13 más 51 o 70; 32 más 51 o 70.

Un anticuerpo del quinto aspecto, además de la característica de CDR3 mencionada anteriormente (y, opcionalmente, además de la característica de CDR2 mencionada anteriormente), puede incluir además una CDR1, en la que dicha CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 89 o 108; o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en la que dicha secuencia de aminoácidos variante posee un máximo de sustitución, delección o inserción de 1 o 2 aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de SEQ ID NO: 89 o 108.

Simplemente a modo de ilustración, un anticuerpo del quinto aspecto puede comprender las combinaciones de CDR3 y CDR1, tal como se han definido anteriormente en el presente documento para el quinto aspecto, basadas en las siguientes combinaciones de SEQ ID NOs: 13 más 89 o 108; 32 más 89 o 108.

Una vez más, simplemente a modo de ilustración, un anticuerpo del quinto aspecto puede comprender CDR3 más CDR2 y CDR1 combinaciones como se han definido para el quinto aspecto basado en las siguientes combinaciones de SEQ ID NOs: 13 más 51, más 89; 32 más 70 más 108.

Un anticuerpo del quinto aspecto puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 127. En un ejemplo relacionado, dicho anticuerpo conserva la secuencia de aminoácidos de CDR3 exacta, tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, y opcionalmente la secuencia de aminoácidos de CDR1 exacta y/o la secuencia de aminoácidos de CDR2 exacta, tal como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En un caso, los anticuerpos de la divulgación se unen y preferiblemente neutralizan todos los virus de la gripe de hemaglutinina del Grupo I (por ejemplo, virus de la gripe H1, H2, H5, H6, H11, H13, H16, H9, H8 y/o H12). En un caso relacionado, los anticuerpos de la divulgación se unen y neutralizan preferiblemente A/California/07/09 (H1N1) y/o A/Vietnam/1194/04 (H5N1).

En un caso, el anticuerpo puede ser humanizado. Ejemplos de técnicas de humanización convencionales se describen en Jones P.T. et al. (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse; Nature, 321 (6069): pág. 522-525. En un caso, la secuencia de aminoácidos de V_{HH} de CDR3 de la presente divulgación puede insertarse (por ejemplo, sustituir) una secuencia de aminoácidos de V_{HH} de CDR3 presente en un anticuerpo humano. Alternativamente, toda la secuencia de aminoácidos de V_{HH} de un anticuerpo de la presente divulgación puede alinearse en la secuencia con un anticuerpo humano correspondiente y mapear las diferencias de aminoácidos. Después de dicho mapeo, las diferencias de aminoácidos identificadas en la secuencia de anticuerpos de la presente divulgación presentes pueden entonces modificarse para imitar la secuencia humana correspondiente. En este sentido, las regiones CDR están preferiblemente no se modifican. Por ejemplo, las diferencias identificadas en las regiones FR de un anticuerpo de la presente divulgación, opcionalmente sujetas a los residuos 'Hallmark' (Vincke et al, 2008, J. Biol. Chem., 284 (5), pág. 3.273-3.284) pueden modificarse para imitar la secuencia humana correspondiente. Simplemente con fines ilustrativos, se describe un protocolo de humanización a modo de ejemplo 10.

Puramente a efectos ilustrativos, un anticuerpo humanizado de la divulgación puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia a un anticuerpo VH humano, por ejemplo un anticuerpo VH3 humano tal como es codificada por los genes de la línea germinal VH3 DP51 o DP53.

En un caso, un anticuerpo (opcionalmente humanizado) de la presente divulgación consiste en o comprende un anticuerpo de un único dominio.

En otro caso, un anticuerpo (opcionalmente humanizado) de la presente divulgación puede comprender dos o más dominios únicos, tal como se han definido anteriormente en el presente documento. Dichos dominios únicos pueden ser los mismos o diferentes. Cuando se emplean el primero y segundo (o más) dominios únicos diferentes, el primer dominio único tiene habitualmente una afinidad de unión, avidez y/o especificidad que es diferente del segundo de un único dominio.

En un caso, un anticuerpo (opcionalmente humanizado) de la presente divulgación consiste o comprende un anticuerpo biespecífico o multiespecífico.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo tal como se define en el presente documento anteriormente, para usar en la prevención o el tratamiento de infección por el virus de la gripe. En un aspecto relacionado, la presente divulgación proporciona un procedimiento que comprende la administración de una cantidad profilácticamente eficaz o terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, tal como se ha definido anteriormente a un paciente. Estos aspectos incluyen el uso de dos o más de dichos anticuerpos definidos anteriormente en el presente documento.

Los pacientes típicos que se benefician del aspecto anterior de "inmunoterapia pasiva" incluyen individuos "en riesgo" en la aparición de una nueva cepa de virus de la gripe (por ejemplo, una nueva cepa pandémica, tal como una nueva cepa de la gripe del Grupo 1). Ejemplos de dichos pacientes "en riesgo" incluyen: no respondedores de la vacuna; pacientes inmunocomprometidos; y profesionales de la salud. Una ventaja particular de la estrategia de la inmunoterapia pasiva de la presente divulgación es que no se añade a los crecientes problemas asociados con la resistencia a fármacos antivirales.

En un caso, el anticuerpo o combinaciones de anticuerpos de la presente divulgación proporcionan reactividad cruzada heterosubhabitual y/o la neutralización contra la gripe subtipos H1, H1 y H5, y/o subtipos H1 y H2 y H5 y H9, y/o todos los subtipos de hemaglutinina del grupo I (por ejemplo, virus de la gripe H1, H2, H5, H6, H11, H13, H16, H9, H8 y/o H12).

Un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un procedimiento para el diseño de una "vacuna universal" para provocar la respuesta inmunitaria heterosubhabitual. Simplemente con fines ilustrativos, se describen protocolos adecuados en el Ejemplo 14.

Un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona ensayos y reactivos de diagnóstico de "campo" robustos. Simplemente con fines ilustrativos, se describen protocolos adecuados en el ejemplo 13.

Un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona anticuerpos de reacción cruzada para la determinación de potencia de la vacuna. Simplemente para fines ilustrativos se describen protocolos adecuados en el Ejemplo 13.

Suministro de anticuerpos

En el uso, la presente divulgación emplea una composición farmacéutica, que comprende la composición de anticuerpos de la presente divulgación en una forma adecuada para la administración parenteral, generalmente intravenosa. Los anticuerpos intactos purificados, o sus fragmentos, se formulan para dicho suministro. Por ejemplo, un anticuerpo, o su fragmento, a una concentración entre 5-50 o 15-50 o 25-50 g/litro se puede formular en un tampón. Ejemplos de componentes de tampón adecuados incluyen sales fisiológicas, tales como citrato de sodio y/o ácido cítrico. Los tampones preferidos contienen 100-200 o 125-175 o aproximadamente 150 mM (por ejemplo, 153 mM) de sales fisiológicas, tales como cloruro de sodio. Los tampones preferidos mantienen la composición farmacéutica a un pH que está cerca del pH fisiológico del paciente - por ejemplo, a un pH de 5,5 a 6,4, o a un pH de 5,6 a 6,3, o a un pH de 5,7 a 6,2, o a un pH de 5,8 a 6,2. Las composiciones que contienen anticuerpos de la presente divulgación excluyen preferiblemente un adyuvante o adyuvantes, ya que no es deseable para estimular una respuesta inmunitaria contra dichos anticuerpos en el paciente.

Los anticuerpos de la divulgación se pueden formular para, pero no limitado a, administración intramuscular, subcutánea, intranasal o intravenosa. Las composiciones adecuadas para inyección intramuscular, subcutánea o intravenosa incluyen soluciones acuosas estériles. Tales soluciones acuosas deben tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido de hace primero isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Las composiciones de anticuerpos de la presente divulgación pueden formularse por separado como formulaciones orales.

Las composiciones adecuadas para inyección pueden estar en forma de soluciones, suspensiones o polvos secos que se disuelven o suspenden en un vehículo adecuado antes de su uso.

En la preparación de soluciones de los anticuerpos o sus fragmentos, se pueden disolver en el vehículo, la solución

se hace isotónica si es necesario mediante la adición de cloruro de sodio y se esteriliza por filtración a través de un filtro estéril utilizando técnicas asépticas antes del llenado en viales o ampollas estériles adecuadas y sellado. Ventajosamente, aditivos tales como tampón, solubilizantes, estabilizantes, agentes conservantes o bactericidas o de suspensión y/o anestésicos locales se pueden disolver en el vehículo.

Los polvos secos, que se disuelven o suspenden en un vehículo adecuado antes de su uso, se pueden preparar por llenado de ingredientes preesterilizados en un recipiente estéril utilizando una técnica aséptica en un área estéril. Alternativamente, los ingredientes se pueden disolver en contenedores adecuados utilizando técnicas asépticas en un área estéril. El producto se liofiliza a continuación y los recipientes se sellan asépticamente.

Los intervalos de dosificación para la administración de los anticuerpos de la presente divulgación son aquellos para producir el efecto terapéutico deseado. Se entenderá que el intervalo de dosificación requerido depende de la naturaleza precisa del anticuerpo o composición, la ruta de administración, la naturaleza de la formulación, la edad del paciente, la naturaleza, extensión o gravedad de la afección del paciente, contraindicaciones, si las hay, y el juicio del médico que lo atiende. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse usando rutinas empíricas estándar para la optimización.

Las dosis diarias adecuadas están en el intervalo de 5-20 mg por kg de peso corporal. La dosificación unitaria puede variar desde menos de 100 mg, pero habitualmente estará en la región de 250-2000 mg por dosis, que se puede administrar diariamente o con menos frecuencia (por ejemplo, en días alternativos durante un máximo de 1 semana).

También está dentro del alcance de la divulgación utilizar los anticuerpos de la divulgación en procedimientos terapéuticos para la prevención o tratamiento de la infección por virus de la gripe en combinación entre sí, o como un adjunto a, o en conjunción con, otras terapias establecidas normalmente utilizadas en la prevención del tratamiento de la infección por el virus de la gripe. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden administrar en combinación con un antiviral adecuado (por ejemplo Oseltamavir™, Rimantadine™, Zanamavir™ y/o Amantadine™).

El tratamiento de combinación puede llevarse a cabo de cualquier manera que se considere necesaria o conveniente por la persona experta en la técnica y para el propósito de esta memoria, no se contemplan limitaciones con respecto al orden, la cantidad, la repetición o cantidad relativa de los compuestos a utilizar en combinación.

Sección de definiciones

Un anticuerpo que se une a un virus de la gripe de interés es uno capaz de unirse a dicho virus con una afinidad suficiente de manera que el anticuerpo es útil como agente terapéutico y/o reactivo de potencia de la vacuna. A modo de ejemplo, un anticuerpo que se une a un virus de la gripe de interés es uno que puede unirse a un virus de la gripe con una afinidad (K_a) de al menos 10^4 M.

Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del anticuerpo, que cuando se administra solo o en combinación a un paciente para tratar o prevenir la infección de la gripe, o al menos uno de los síntomas clínicos de la infección de la gripe, es suficiente para afectar a dicho tratamiento o prevención de la enfermedad, o síntoma. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo, por ejemplo, del anticuerpo, la infección y/o síntomas de la infección, gravedad de la infección, y/o síntomas de la infección, la edad, peso y/o la salud del paciente a tratar, y el juicio del médico que prescribe. Una cantidad terapéuticamente eficaz apropiada en cualquier caso determinado puede determinarse por los expertos en la técnica o capaz de la determinación mediante experimentación rutinaria. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo es superado por los efectos beneficiosos.

Una cantidad profilácticamente eficaz es cualquier cantidad del anticuerpo que, cuando se administra solo o en combinación a un paciente, inhibe o retrasa la aparición o reaparición de la infección por el virus de la gripe, o al menos uno de los síntomas clínicos de la infección por el virus gripe. En algunos casos, la cantidad profilácticamente eficaz evita la aparición o reaparición de la infección por el virus de la gripe por completo. La inhibición de la aparición significa reducir la probabilidad de aparición de la infección o prevenir la aparición por completo.

Para la comparación de secuencias, habitualmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, a la que las secuencias de prueba se pueden comparar. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas posteriores, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

A lo largo de esta memoria, la referencia a al menos el 80% de identidad de secuencia se utiliza indistintamente con uno o más de al menos 81, al menos 82, al menos 83, al menos 84, al menos 85, al menos 86, al menos 87, al menos 88, al menos 89, al menos 90, al menos 91, al menos 92, al menos 93, al menos 94, al menos 95, al menos 96, al menos 97, al menos 98, al menos 99 y/o 100% de identidad de secuencia.

El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de alineación de homología local de Smith y Waterman [Adv. Appl. Math. 2: 484 (1981)], mediante el algoritmo de Needleman y Wunsch [J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)], mediante la búsqueda del proceso de similitud de Pearson y Lipman [Proc. Nacional. Acad. Sci. USA. 85: 2444 (1988)], mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA - Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis 53705), o mediante inspección visual [ver Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausbel et al, eds, Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, en y John Wiley & Sons, Inc. (1995 Suplemento) Ausubel].

Ejemplos de algoritmos adecuados para determinar el porcentaje de similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 [véase Altschul (1990) J. Mol. Biol. 215: pág. 403-410; y "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/" del National Center for Biotechnology Information].

En una comparación de homología preferida, la identidad existe sobre una región de las secuencias que tiene al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 30 residuos de aminoácidos contiguos de longitud.

Un "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y específicamente cubre anticuerpos y fragmentos de anticuerpos siempre que presenten la actividad biológica deseada. Por ejemplo, un anticuerpo es una proteína que incluye al menos una o dos regiones variables de cadena pesada (H) (abreviada en el presente documento como VHC), y al menos una o dos regiones variables de cadena ligera (L) (abreviada en el presente documento como VLC). Las regiones VHC y VLC pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco" (FR). La extensión de la región marco y CDR se ha definido con precisión (véase, Kabat, E.A., et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest. Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos NIH Publicación No. 91-3242, 1991 y Chothia, C. et al, J. Mol Biol. 196: 901-917, 1987). Preferiblemente, cada VHC y VLC se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal a carboxi terminal en el siguiente orden: FRI, CDRI, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

La cadena VHC o VLC del anticuerpo puede incluir además toda o parte de una región constante de cadena pesada o ligera. En un caso, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas de inmunoglobulina pesadas y dos cadenas de inmunoglobulina ligeras, en el que las cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras están interconectadas por, por ejemplo, enlaces disulfuro. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH2 y CH3, y opcionalmente CH1. La región constante de la cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. La región variable de las cadenas pesadas y ligeras contiene un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos habitualmente median en la unión del anticuerpo a los tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. El término "anticuerpo" incluye inmunoglobulinas intactas de tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como subtipos de las mismas), en el que las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de tipos kappa o lambda.

El término anticuerpo, como se usa en el presente documento, también se refiere a una porción de un anticuerpo que se une a un virus de la gripe, por ejemplo una molécula en la que una o más cadenas de inmunoglobulina no es de longitud completa, pero que se une a un virus de la gripe. Ejemplos de porciones de unión incluidos dentro del término anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VLC, VHC, CL y CHI; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fc que consiste en los dominios VHC y CHI; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VLC y VHC de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al, Nature 341: 544-546, 1989), que consiste en un dominio VHC; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada que tiene un marco suficiente para unirse, por ejemplo, a una porción de unión a antígeno de una región variable. Una porción de unión a antígeno de una región variable de cadena ligera y una parte de unión a antígeno de una región variable de cadena pesada, por ejemplo, los dos dominios del fragmento Fv, VLC y VHC, pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite que pueden producirse como una única cadena de proteína en la que las regiones VLC y VHC se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al (1988) Science 242: 1527-1534; y Huston et al (1988) Proc Natl Acad Sci USA. 85: 5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también se incluyen dentro del término anticuerpo. Éstos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia y las porciones se criban para la utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Del mismo modo, el término anticuerpo abarca armazones proteicos.

Los armazones proteicos proporcionan marcos de unión universales para complementar el repertorio en expansión de anticuerpos monoclonales terapéuticos y derivados, tales como scFv, moléculas Fab, dAb (anticuerpos de un

único dominio), diacuerpos y minicuerpos. Los sistemas de armazones crean o modifican dominios de reconocimiento de proteínas conocidas, ya sea mediante la creación de nuevos armazones o modificación de dominios de unión a proteínas conocidas. Tales armazones incluyen, pero no se limitan a:

(i) armazones a base de proteína A - aficuerpos (Nord, K. et al. 1997 "Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain". Nat Biotechnol 15, 772-777);

(ii) armazones basados en lipocalina - anticalinas (Skerra 2008 "Alternative binding proteins: anticalins – harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities". FEBS J. 275: 2677-83);

(iii) armazones basados en fibronectina - adnectina (Dineen et al 2008 "The Adnectin CT-322 is a novel VEGF receptor 2 inhibitor that decreases tumor burden in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer". BMC Cancer 8: 352.);

(iv) avímeros (Silverman et al 2005 "Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains". Nat Biotechnol 23: 1556-1561.);

(v) armazones basados en anquirina - darpins (Zahnd et al 2006 "Selection and characterization of Her2 binding-designed ankyrin repeat proteins". J Biol Chem 281: 35167-75); y

(vi) armazones de centirina, basados en un pliegue de proteína que tiene homología estructural significativa con los dominios de Ig con bucles que son análogos a CDR. Los dominios de Ig son un módulo común en proteínas humanas y han sido ampliamente aplicados como proteínas de armazones alternativos.

La referencia al término prevenir o tratar puede usarse como sinónimo del término de supresión.

Las secuencias de aminoácidos descritas en este documento pueden incluir sustituciones, deleciones o adiciones de uno o más aminoácidos. Estos cambios son preferiblemente de una naturaleza menor, por ejemplo sustituciones de aminoácidos conservativas (véase más adelante) y otras sustituciones que no afectan significativamente al plegamiento o a la actividad del anticuerpo.

Sustituciones conservativas de aminoácidos

Básicos	arginina lisina histidina
Ácidos	ácido glutámico ácido aspártico
Polares	glutamina asparagina
Hidrófobos	leucina isoleucina valina
Aromáticos	fenilalanina triptófano tirosina
Pequeños	glicina alanina serina treonina metionina

Además de los 20 aminoácidos estándar, los aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y α -metil serina) pueden sustituirse por residuos de aminoácidos de los polipéptidos de la presente divulgación. Un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no son codificados por el código genético y aminoácidos no naturales pueden ser sustituidos por residuos de aminoácidos de polipéptidos naturales. Los polipéptidos de la presente divulgación también pueden comprender residuos de aminoácidos de origen no natural.

Los aminoácidos de origen no natural incluyen, sin limitación, trans-3-metilprolina, 2,4-metano-prolina, cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxiprolina, N-metilglicina, alo-treonina, metil-treonina, hidroxietilhomocisteína, nitro-glutamina, homoglutamina, ácido piperídico, terc-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina, β -naftilalanina, β -piridilalanina, N-guanidino-(butil) homoarginina, N, N-guanidino-(dimetil)homoarginina, N,N'-guanidino-bis-(2,2,2-trifluoroetil)homoarginina, N,N'-guanidino-(metil, hexil homoarginina), N^e-metilisina, N^e-isopropil lisina, aminometilfenilalanina, aminociclohexilalanina, ácido α -aminobutírico, 4-tioprolina, N-metil leucina, ornitina, norleucina, 5-bromo-triptófano, 5-fluoro-triptófano, 5-nitro-triptófano, ácido γ -aminobutírico, J-mercaptopropionilo, acetilo, penicilamina y 4-fluorofenilalanina.

Se conocen varios procedimientos en la técnica para la incorporación de residuos de aminoácidos de origen no natural en proteínas. Por ejemplo, se puede emplear un sistema in vitro en el que las mutaciones sin sentido se suprimen utilizando tARN supresores químicamente aminoacilados. Los procedimientos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar tARN son conocidos en la técnica. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen

mutaciones sin sentido se lleva a cabo en un sistema libre de células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas disponibles comercialmente y otros reactivos. Las proteínas se purifican por cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113: 2722, 1991; Ellman et al., *Methods Enzymol.* 202: 301, 1991; Chung et al, *Science* 259: 806-9, 1993; y Chung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 10145-9, 1993). En un segundo procedimiento, la traducción se realiza en ovocitos de *Xenopus* por microinyección de ARNm mutado y ARNt supresores químicamente aminoacilados (Turcatti et al, *J. Biol Chem* 271: 19991-8, 1996). En un tercer procedimiento, las células de *E. coli* se cultivan en ausencia de un aminoácido natural que va a ser reemplazado (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del aminoácido o aminoácidos no naturales deseados (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido de origen no natural se incorpora en el polipéptido en lugar de su homólogo natural. Véase, Koide et al., *Biochem.* 33: 7470-6, 1994. Los residuos de aminoácidos naturales se pueden convertir en especies no naturales por modificación química in vitro. La modificación química puede combinarse con mutagénesis dirigida al sitio para ampliar aún más la gama de sustituciones (Wynn y Richards, *Protein Sci.* 2: 395-403, 1993).

Un número de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no son codificados por el código genético, aminoácidos de origen no natural y aminoácidos no naturales pueden ser sustituidos por residuos de aminoácidos de polipéptidos de la presente divulgación.

Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos de la presente divulgación pueden ser identificados según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081-5, 1989). Los sitios de interacción biológica también pueden determinarse mediante análisis físico de la estructura, tal como se determina por técnicas, tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, junto con mutación de los posibles aminoácidos del sitio de contacto. Véase, por ejemplo, de Vos et al, *Science* 255: 306-12, 1992; Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224: 899-904, 1992; Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309: 59-64, 1992. Las identidades de los aminoácidos esenciales también pueden deducirse del análisis de homologías con secuencias de anticuerpos relacionadas.

Se pueden realizar múltiples sustituciones de aminoácidos y analizarse usando procedimientos conocidos de mutagénesis y cribado, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (*Science* 241: 53-7, 1988) o Bowie y Sauer (*Proc Natl Acad Sci. USA.* 86: 2152-6, 1989). Brevemente, estos autores describen procedimientos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar el polipéptido funcional y, a continuación, secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permisibles en cada posición. Otros procedimientos que pueden usarse incluyen la expresión en fagos (por ejemplo, Lowman et al, *Biochem.* 30: 10832-7, 1991; Ladner et al, patente de Estados Unidos. No. 5.223.409; Huse, Publicación WIPO WO 92/06204) y mutagénesis dirigida de región (Derbyshire et al, *Gene* 46: 145, 1986; Ner et al, *DNA* 7: 127, 1988).

Se pueden realizar múltiples sustituciones de aminoácidos y analizarse usando procedimientos conocidos de mutagénesis y cribado, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (*Science* 241: 53-7, 1988) o Bowie y Sauer (*Proc Natl Acad Sci. USA.* 86: 2152-6, 1989). Brevemente, estos autores describen procedimientos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar el polipéptido funcional y, a continuación, secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permisibles en cada posición. Otros procedimientos que pueden usarse incluyen la expresión en fagos (por ejemplo, Lowman et al, *Biochem.* 30: 10832-7, 1991; Ladner et al, patente de Estados Unidos. No. 5.223.409; Huse, Publicación WIPO WO 92/06204) y mutagénesis dirigida de región (Derbyshire et al, *Gene* 46: 145, 1986; Ner et al, *DNA* 7: 127, 1988).

SEQ ID NOS

CDR3 (Kabat)

SEQ ID NO: 1 = STTTPPYEY
 SEQ ID NO: 2 = RRDWRDY
 SEQ ID NO: 3 = NPPGNLY
 SEQ ID NO: 4 = DPLSTGWGQYSY
 SEQ ID NO: 5 = STTTPPHEF
 SEQ ID NO: 6 = RDGFFNRYDY
 SEQ ID NO: 7 = SGPGGLNV
 SEC ID NO: 8 = TRWVPTMKADEYNY
 SEQ ID NO: 9 = ASWVASLWSPSEYDY
 SEQ ID NO: 10 = DPPGILY
 SEQ ID NO: 11 = DPVCTAGWYRPSRFDL
 SEQ ID NO: 12 = STLTPPHEY
 SEQ ID NO: 13 = GNTGSSDRSSSYVH
 SEQ ID NO: 14 = KSPLVDNEY
 SEQ ID NO: 15 = KGFAPFLIGCPWGKAEYDY
 SEQ ID NO: 16 = TKAFGIATITADYEL
 SEQ ID NO: 17 = SSTVAPHEY

SEQ ID NO: 18 = SGPGGVEV
SEQ ID NO: 19 = SGPGGVIL

CDR3 (IMGT)

5
SEQ ID NO: 20 = KTSTTTTPPYEY
SEQ ID NO: 21 = NTRRDWRDY
SEQ ID NO: 22 = NLNPPGNLY
SEQ ID NO: 23 = NADPLSTGWGQYSY
10 SEQ ID NO: 24 = KCSTTTTPHEF
SEQ ID NO: 25 = NARDGFFNRYDY
SEQ ID NO: 26 = MASGPGGLNV
SEC ID NO: 27 = AGTRWVPTMKADEYNY
SEQ ID NO: 28 = AAASWVASLWSPSEYDY
15 SEQ ID NO: 29 = NLDPPGILY
SEQ ID NO: 30 = AADPVCTAGWYRPSRFDL
SEQ ID NO: 31 = KISTLTPPEY
SEQ ID NO: 32 = GAGNTGSSDRSSSYVH
SEQ ID NO: 33 = HAKSPLVDNEY
20 SEQ ID NO: 34 = AVKGFAPFLIGCPWGKAEYDY
SEQ ID NO: 35 = AATKAFGIATITADYEL
SEQ ID NO: 36 = KFSSTVAPHEY
SEQ ID NO: 37 = KASGPGGVEV
SEQ ID NO: 38 = KASGPGGVIL

CDR2 (Kabat)

SEQ ID NO: 39 = VIGNYGNTNYADSVKR
SEQ ID NO: 40 = DIASTRGTTNYADSVKG
30 SEQ ID NO: 41 = GITYDDSTNYAGSVKG
SEQ ID NO: 42 = AITSGESTNYADSVKG
SEQ ID NO: 43 = VIGNYGNTNYADSVKG
SEQ ID NO: 44 = AVTTDGSTSYADYAKG
SEQ ID NO: 45 = VIGNGGNTNYAESVKG
35 SEC ID NO: 46 = FITSTSAVTKYADSVKG
SEQ ID NO: 47 = CRASDGNTYYAESLKG
SEQ ID NO: 48 = SIAYDGSTSYADPVKG
SEQ ID NO: 49 = CISPSDSFTEYGDSVKG
SEQ ID NO: 50 = VIGNNDNTVYGDSVQG
40 SEQ ID NO: 51 = AIDWGDGPTTYADSVKG
SEQ ID NO: 52 = SIDGRGTPMYADSVKG
SEQ ID NO: 53 = CMNSRDGTTNYADSVKG
SEQ ID NO: 54 = AITAGGNTYYADSAKA
SEQ ID NO: 55 = VIGNYGNTNYADSVKG
45 SEQ ID NO: 56 = VIGNGGNTNYADSVKG
SEQ ID NO: 57 = VIGNGGTNYADSVKG

CDR2 (IMGT)

50 SEQ ID NO: 58 = IGNYGNT
SEQ ID NO: 59 = IASTRGTT
SEQ ID NO: 60 = ITYDDST
SEQ ID NO: 61 = ITSGEST
SEQ ID NO: 62 = IGNYGNT
55 SEQ ID NO: 63 = VTTDGST
SEQ ID NO: 64 = IGNGGNT
SEC ID NO: 65 = ITSTSAVT
SEQ ID NO: 66 = RASDGNT
SEQ ID NO: 67 = IAYDGST
60 SEQ ID NO: 68 = ISPSDSFT
SEQ ID NO: 69 = IGNNNDNT
SEQ ID NO: 70 = IDWGDGPT
SEQ ID NO: 71 = IDGRGTP
SEQ ID NO: 72 = MNSRDGTT
65 SEQ ID NO: 73 = ITAGGNT
SEQ ID NO: 74 = IGNYGNT

SEQ ID NO: 75 = IGNGGNT
SEQ ID NO: 76 = IGNGGNT

CDR1 (Kabat)

5
SEQ ID NO: 77 = IVTMG
SEQ ID NO: 78 = WYDVG
SEQ ID NO: 79 = RYRMG
SEQ ID NO: 80 = LYTMG
10 SEQ ID NO: 81 = IVTMG
SEQ ID NO: 82 = TYPMS
SEQ ID NO: 83 = FYTMG
SEC ID NO: 84 = NYAIG
SEQ ID NO: 85 = GYAIA
15 SEQ ID NO: 86 = RYRMG
SEQ ID NO: 87 = AYAIA
SEQ ID NO: 88 = IITMG
SEQ ID NO: 89 = LYRVG
SEQ ID NO: 90 = MYMID
20 SEQ ID NO: 91 = NNAIG
SEQ ID NO: 92 = INAMG
SEQ ID NO: 93 = IVTMG
SEQ ID NO: 94 = FYTMG
SEQ ID NO: 95 = FYTMG

CDR1 (IMGT)

SEQ ID NO: 96 = GSISRIVT
SEQ ID NO: 97 = GFTFSWYD
30 SEQ ID NO: 98 = GSFFSRYR
SEQ ID NO: 99 = GSAFSLYT
SEQ ID NO: 100 = GSISRIVT
SEQ ID NO: 101 = GSAVLFSTYP
SEQ ID NO: 102 = NDIFSFYT
35 SEC ID NO: 103 = GFSLDNYA
SEQ ID NO: 104 = GFPFDGYA
SEQ ID NO: 105 = GSFFSRYR
SEQ ID NO: 106 = GFTLGAYA
SEQ ID NO: 107 = GSMSRIIT
40 SEQ ID NO: 108 = VLTFSLYR
SEQ ID NO: 109 = GDIFVMYM
SEQ ID NO: 110 = GSTLNNNA
SEQ ID NO: 111 = GSAFSINA
SEQ ID NO: 112 = GSISSIVT
45 SEQ ID NO: 113 = DNIFSFYT
SEQ ID NO: 114 = TNIASFYT

VHH de longitud completa

50
SEQ ID NO: 115 =
QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSRIVTMGWYRQASGKERELVAVIGNYGNNTNYADSVKGR
FTVSRDNAKDTAYLQMNGLNVEDTAIYYCKTSTTTPPYEYWGQGTQVTVSS
55
SEQ ID NO: 116 =
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYDVGWYRRAPGKERELVADIASTRGTTNYADSVK
GRFTISRDNANKNSVYLQMNSLKPEDTAVYYCNTRRDWRDYWGQGIQVTVSS
60
SEQ ID NO: 117 =
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFFSRYRMGWYRQAPGEQRELVAGITYDDSTNYAGSVKG
RFTISRDNANKNTVHLQMNSLKPEDTAVYYCNLNPPGNLYWGQGTQVTVSS
65

SEQ ID NO: 118 =

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGSFAFLYTMGWYRQAPGNQRELVAAITSGESTNYADSVKG
RFTISRDNNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNADPLSTGWGQYSYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 119 =

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGSISRIVTMGWYRQGPGERELVAVIGNYGNNTNYADSVKGR
FTVSRDNNAKDTAYLMNNLNVEDTAMYYCKCSTTTPPHEFWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 120 =

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGSVAFLSTYPMWYRQAPGKQRELVAAVTTDGTSTYADYA
KGRFTISRDNNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNARDGFFNRYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 121 =

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASNDIFSFTMGWYLQAIGKQREPVAVIGNGGNTNYAESVKGR
FTISRDNNAKNTAYLMNSLKPEDTAVYYCMASGPGGLNVWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 122 =

QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFSLDNYAIGWFRRAPGEEREQVSVFITSTSAVTKYADSVKGR
FTISRDNNAKNTVYLMNTSLKPEDTAVYYCAGTRWVPTMKADEYNYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 123 =

QLQLVESGGGLVQVGGSLRLSCLASGFPFDGYAIAWFRQAPGKEREGVSCRASDGNTYYAESLKG
RLTMSTDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAASWVASLWSPSEYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 124 =

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGSFFSRYRMGWYRQAPGEQRELVASIAYDGSTSYADPVKG
RFTISRDNNAKNTVHLMYSLKPDDTAVYYCNLDPPGILYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 125 =

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTLGAYIAWFRQAPGKEREGVSCISPSDSFTEYGDSVKG
RFTVSRDNNAKNTVYLMNSLQPEDTAVYYCAADPVCTAGWYRPSRFDLWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 126 =

QVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCLASGSMSRIITMGWYRQAPGMERELVAVIGNNDNTVYGDSVQG
RFTVSRDNNAKNTAYLMNSLNAEDTAMYYCKISTLTPPEYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 127 =

QVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCLASVLTFSLYRVGWFRQAPGKEREFVAIDWGDGPTTYADSVKG
RFTISRDNNAERTAYLQINSLKPEDTAVYYCGAGNTGSSDRSSSYVHWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 128 =

QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGDIFVMYMWYRQAPGKQRELVASIDGRGTPMYADSVKGR
FTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYSCHAKSPLVDNEYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 129 =

QLQLAESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTLNNNAIGWFRQAPGKEREGVSCMNSRDGTTNYADSVK
GRFTISRDVAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFCAVKGFAPFLIGCPWGKAEDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 130 =

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSAFSINAMGWYRQAPGEEREFVAAITAGGNTYYADSAKAR
FTISRDNAKNMLYLQMNSLKPEDTAMYYCAATKAFGIATITADYELWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 131 =

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGSISSIVTMGWYRQAPGKERELVAVIGNYGNNTNYADSVKGR
FTVSRDNAKNTVYLQMNSLNVEDTAMYVCKFSSTVAPHEYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 132 =

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASDNIFSFYTMGWYRQSPGKERELVAVIGNGGNTNYADSVKG
RFTISRDNGKNKAHLQMNSLKPEDTAVYYCKASGPGGVEVWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 133 =

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASTNIASFYTMGWYRQTPGQQRDVAVIGNGGNTNYADSVKG
RFTISRDGAKNTAHLQMNSLKPEDTDVYYCKASGPGGVILWGQGTQVTVSS

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes sirven para ilustrar realizaciones seleccionadas de la presente invención. Se entenderá que las variaciones en las proporciones y alternativas en elementos de los componentes mostrados serán evidentes para los expertos en la técnica y están dentro del alcance de las realizaciones de la presente invención.

La invención se refiere a un anticuerpo de un único dominio que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124. Los ejemplos relacionados con otros anticuerpos se proporcionan para referencia y/o con fines comparativos.

Ejemplo 1: Procedimiento de inmunización y el análisis de la respuesta inmunitaria a la gripe

Se mantuvieron alpacas machos jóvenes en el Royal Veterinary College, Hertfordshire, Reino Unido. Todos los experimentos con animales se realizaron de conformidad con la licencia del Ministerio del 80/2117. Se obtuvo una muestra de sangre antes de la inmunización de la vena yugular y esto fue seguido por 4 inyecciones por vía intramuscular en los intervalos de 0 días, 21 días, 43 días y 71 días dividido entre 4 patas. La inmunización primaria consistió en 50 µg de H1 recombinante (A/California/07/09 (H1 N1 pdm) (Protein Sciences™) en 400 µl de PBS estéril y se emulsionó con 800 µl de adyuvante completo de Freund (Sigma) justo antes de la inmunización. De manera similar, se administraron tres inyecciones de refuerzo por separado de 50 µg de H1 recombinante (A/California/07/09 (H1N1pdm) (Protein Sciences™) en adyuvante incompleto de Freund (Sigma). Aproximadamente 3 días después de cada inyección se recogió una muestra de 10 ml de sangre de la que se preparó el suero después de permitir que la sangre coagule durante la noche a 4°C. La respuesta serológica a A/California/07/09 en cada etapa del programa de inmunización se evaluó mediante ELISA, ensayo de inhibición de la hemaglutinación (ensayo HI) en un panel de cepas virales inactivadas y ensayos de microneutralización (ensayos MN) utilizando la cepa viral de H1 N1 pandémica A/California/07/09 (Tabla 1). Se observó una respuesta clara para el inmunógeno (H 1N1 pdm) que aumentaba con cada inmunización subsecuente.

Tabla 1. Evaluación de la respuesta inmunitaria serológica en alpacas inmunizadas

Antígeno	Estrategia de inmunización		Día	Título de HI ²					Título de MN ³
	Inmunización	Sangrado		A/California/07/09 (H1N1) pdm	B/Brisbane/60/08 Control	A/Uruguay/716/07 (H3N2)	A/Hong Kong/213/03 (H5N1)	A/Vietnam/1194/04 (H5N1)	
	Primaria	Preinmunitario	0	< 8	< 8	< 8	< 8	< 8	< 10
Rec HA ¹ (H1)	Refuerzo 1	Primer sangrado	21	64	< 8	< 8	ND ⁴	ND	ND
Rec HA (H1)	Refuerzo 2	Segundo sangrado	43	2048	< 8	< 8	ND	ND	ND
Rec HA (H1)	Refuerzo 3	Tercer sangrado	71	8192	< 8	< 8	< 8	< 8	> 1280

¹ Rec HA¹ (H1), hemaglutinina recombinante derivada de la cepa viral H1N1 pandémica de A/California /07/09

² título de HI, ensayo de inhibición de la hemaglutinación y títulos se indican como recíprocos de la dilución en suero mínima a la que se observa inhibición de aglutinación de eritrocitos de pavo.

³ título de MN, el título de microneutralización se proporciona como el recíproco de la dilución mínima a la que se observa inhibición de lisis de células MDCK por la cepa de la gripe A/California/07/09 (pdm H1N1)

⁴ ND no se ha determinado

Ejemplo 2: Construcción de bibliotecas de anticuerpos VHH de un único dominio expresadas en fagos

Para la construcción de bibliotecas de anticuerpos se recogieron muestras de aproximadamente 10 ml de sangre de una alpaca inmunizada (Ejemplo 1) en tubos de heparina. Se purificaron linfocitos de sangre periférica usando un procedimiento de centrifugación con Ficol Hypaque (Sigma). El ARN se extrajo usando el kit de extracción de ARN RiboPure™ (Novagen) según las instrucciones del fabricante y se almacenó a -70°C antes de la síntesis de ADNc. La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). En resumen, se utilizaron hasta 200 ng de ARN total por reacción de síntesis de ADNc cebado con oligo dT que se dejó proceder durante 50 minutos a 50°C, después de lo cual la reacción se terminó por incubación a 85°C durante 5 minutos, seguido de la colocación de la mezcla de reacción en hielo. Las mezclas de reacción se recogieron por centrifugación breve y se añadió 1 µl de ARNasa H a cada tubo y se incubaron durante 20 minutos a 37°C. El ADNc resultante se almacenó a -20°C o se usó inmediatamente en la reacción de PCR primaria para amplificar las secuencias de genes de anticuerpos.

Se realizó una PCR primaria utilizando dos cebadores de oligonucleótidos diseñados para primar universalmente genes de inmunoglobulina de mamífero en el dominio CH2 y también en el extremo 5' de los genes de VHH de alpaca (Harmsen et al., 2000) dentro de la secuencia señal. Se utilizó Taq polimerasa de alta fidelidad (Roche) para toda la amplificación de ADN.

Alp-CH2_Rev

5' CGC CAT CAA GGT ACC AGT TGA

Alp-Fw_VHH

5' GGT GGT CCT GGC TGC

Esto dio lugar a la amplificación de productos génicos de anticuerpos de 600 pb y 900 pb. El producto de 600 pb corresponde a la población de anticuerpos de solo cadena pesada y no contiene un dominio CH1. El producto génico de 900 pb corresponde a la población de anticuerpos con cadena pesada convencional y no es necesario. El producto génico con solo cadena pesada de 600 pb se purificó en gel (QIAGEN) y a continuación se sometió a una etapa secundaria de PCR para amplificar sólo la población de genes de anticuerpos VHH (~ 450 pb) y para añadir sitios de restricción apropiados para la clonación en el vector de expresión en fagos pNIBS-1 (Ejemplo 3). Los cebadores para PCR secundaria fueron diseñados para amplificar todos los genes de VHH mediante hibridación a las regiones de anticuerpo FR1 y FR4. Los sitios de restricción *Sfi*1 y *Not*1 fueron elegidos para la clonación ya que no cortan con frecuencia dentro de los genes de anticuerpos.

Alp_FR1_Sfi1

5' CTG CAG GGA TCC GTT AGC AAG GCC CAG CCG GCC ATG GCA CAG KTG CAG
CTC GTG GAG TCN

Alp_FR4back_Not1

GCT AGT GCA TGG 5' AGC TCA TGC GGC C

Se digirieron aproximadamente 5 µg de ADN de anticuerpo VHH con la enzima de restricción *Sfi*1 (New England Biolabs) en una mezcla de reacción de 200 µl durante la noche a 50°C. Después de purificación adicional (QIAGEN), los genes de VHH se digirieron con *Not*1 en una mezcla de reacción de 100 µl a 37°C durante 6 horas. Los genes de VHH digeridos se ligaron a continuación en el vector de expresión en fagos pNIBS-1 (Ejemplo 3), que se digirió de manera similar con las enzimas de restricción *Sfi*1 y *Not*1. Las ligaciones se establecieron en una proporción de 4:1 de inserción con respecto a vector en una mezcla de reacción de 20 µl, conteniendo cada mezcla reacción aproximadamente 100 ng de vector. Después de la adición de ADN ligasa de T4 (New England Biolabs), las mezclas de reacción se incubaron durante la noche a 16°C. Las ligaciones individuales se reunieron y se purificaron (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. A continuación, la mezcla de ligación purificada se transformó en células electrocompetentes TG1 (Agilent) usando electroporación (BIO-RAD). Las células se recuperaron de las cubetas de electroporación usando 1 ml de medio SOC (Sigma) precalentado a 37°C y después se incubaron a 37°C durante 1 hora con agitación para permitir la expresión de resistencia a antibióticos. Las bibliotecas se extendieron en placas de 22 cm que contenían 2 TY agar con ampicilina (100 µg/ml) y glucosa al 20% v/v. El tamaño de la biblioteca se determinó mediante la preparación de una serie de diluciones contando las colonias viables y fue de 5 x 10⁷ clones independientes. Después de la incubación durante la noche de los placas de 22 cm a 37°C, las bibliotecas se recogieron inundando las placas con 2 TY agar con carbenicilina (100 µg/ml), glucosa al 20% v/v y el raspado de las colonias. Las colonias resuspendidas que representaban la biblioteca de anticuerpos se almacenaron a -70°C en glicerol al 20% v/v.

Ejemplo 3: Construcción del vector de expresión en fagos pNIBS-1

Una secuencia de polienlazador de 1782 pb fue diseñada comprendiendo las características clave siguientes:

(i) Una secuencia señal pelB que acciona la secreción de anticuerpo expresado en el periplasma y cuyo aminoácido

C terminal y la secuencia de ADN es compatible con la codificación de un sitio de restricción *Sfi*1.

(ii) Una etiqueta de hexa-histidina que se fusiona al extremo C-terminal de un anticuerpo VHH clonado y facilita tanto la purificación como la detección de anticuerpos expresados.

(iii) Una etiqueta de epítipo c-Myc unido al extremo C-terminal del anticuerpo clonado después de la etiqueta de hexa-histidina y facilita la detección del anticuerpo expresado

(iv) La secuencia de gen III que codifica la proteína de cubierta 3 del bacteriófago M13 y está en el marco con el cassette de anticuerpo para facilitar la producción de los productos de fusión de anticuerpo-gen III que se pueden expresar en la superficie del fago.

(v) Un codón de terminación de ADN ámbar entre la etiqueta de epítipo c-Myc y la proteína de cubierta del fago del gen III. Este codón se lee como un codón de terminación en *Escherichia coli* pero en cepas que llevan un gen de tARN supresor mutante se lee con frecuencia como un aminoácido de codificación y se lee para producir un producto de fusión de anticuerpo-gen 3. Esto permite la expresión de la fusión anticuerpo-gen 3 en fagos. La supresión del codón ámbar es generalmente de baja eficiencia y esto tiene la ventaja de que el anticuerpo soluble no fusionado al gen 3 puede producirse a partir de la misma célula clon de *E. coli* sin subclonación para eliminar la secuencia del gen 3.

(vi) Se incluyeron sitios de restricción *Sfi*1 y *Not*1 para la clonación de genes de anticuerpos, ya que cortan con poca frecuencia en genes de anticuerpos y se pueden colocar dentro de la secuencia de ADN, mientras que mantienen un casete de expresión funcional. Otro sitio de restricción como *Mfe*1 y *Bst*ElI también se incorporaron, ya que éstos son altamente conservados en los genes de la línea germinal de anticuerpos y pueden ser útiles para la clonación de anticuerpos seleccionados en otros formatos.

La secuencia de polienlazador se sintetizó a partir de oligonucleótidos (Geneart™) como un fragmento *Hind*111/*Eco*R1 y se clonó en el vector fagémido pUC119 estándar para generar pNIBS-1 (Figura 1a y Figura 1b).

Ejemplo 4: Estrategia de selección de la biblioteca de anticuerpos en fagos

La biblioteca de anticuerpos expresados en fagos (Ejemplo 2) se inoculó en 50 ml de medio 2 x TY suplementado con carbenicilina a 100 µg/ml (p/v) y glucosa al 2% v/v (2xTY AG). Se utilizó una inoculación mayor que 10 x tamaño de la biblioteca para asegurar que se mantiene la diversidad de la biblioteca durante el procedimiento de rescate de los fagos [tamaño de la biblioteca 5 x 10⁷ de tamaño, por lo tanto se utilizaron 5 x 10⁸ células como inoculación de partida a partir de una mezcla madre de glicerol]. El cultivo se desarrolló a 37°C hasta una DO600 de 0,5 y se transfirieron 5 ml de cultivo (que corresponde a aproximadamente 7,5 x 10⁸ bacterias) a un tubo estéril de 50 ml que contenía el fago auxiliar M13KO7 (New England Biolabs). La multiplicidad de infección (MOI) fue de aproximadamente 20:1 fagos con respecto a bacterias, de manera que se utilizaron aproximadamente 1,5 x 10¹⁰ fagos para infectar el cultivo bacteriano. Después de añadir el cultivo bacteriano a la cantidad apropiada de fago auxiliar M13KO7, se incubó en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos. Las células infectadas se centrifugaron a continuación durante 10 minutos a 4000 x g, el sobrenadante se extrajo y el sedimento bacteriano se resuspendió en 25 ml de 2 x TY precalentado suplementado con 25 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de ampicilina (2 x TY AK) y se incubó durante la noche a 30°C con agitación. Al día siguiente, las células se sedimentaron por centrifugación durante 15 minutos a 4000 x g y se recogió el sobrenadante que contenía la biblioteca de anticuerpos expresados en fagos. Para purificar los fagos, un 1/5 de volumen polietilenglicol 6000 al 20%, 2,5 M de NaCl (PEG) y se incubaron en hielo durante 1 hora. A continuación, los fagos se sedimentaron en una microcentrífuga y se resuspendieron en 1 ml de PBS estéril. Las bacterias restantes se eliminaron entonces mediante una breve centrifugación y el sobrenadante de fago se transfirió a un nuevo tubo. Se realizó una segunda purificación mediante la adición de 200 µl de PEG e la incubación en hielo durante 20 minutos. Los fagos se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 4°C. Los fagos sedimentados se resuspendieron a continuación en 1 ml de PBS estéril y se eliminó cualquier bacteria contaminante mediante una breve centrifugación adicional. Los fagos purificados se usaron entonces para la selección.

Las selecciones de bibliotecas de anticuerpos en fagos se realizaron en inmunotubos (Nunc) recubiertos con 1 ml de hemaglutinina recombinante 10 µg/ml en PBS durante la noche a 4°C [H1 recombinante [A/California/07/2009 (H1N1 pandémico), H5 recombinante (A/Vietnam/1203/2004) protein sciences™] (Figura 2). La estrategia de selección se diseñó para recuperar ambos anticuerpos específicos de H1 y también anticuerpos de reacción cruzada H1/H5 mediante la alternancia en la selección entre inmunotubos recubiertos con H1 y H5 (Figura 2). También se utilizó una selección paralela con un inmunotubo vacío para monitorear el enriquecimiento específico en antígeno de la biblioteca de anticuerpos de fagos. Al día siguiente, el tubo de los inmunotubos y el tubo de control se bloquearon rellenando completamente con 2% p/v de leche en polvo en PBS estéril (M-PBS), seguido de una incubación de 2 horas a temperatura ambiente. Se añadieron 500 µl de fago concentrado purificado (10¹² - 10¹³ fagos) a 0,5 ml de MPBS al 4% y los fagos se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, el inmunotubo se lavó con PBS Tween 20 (0,1% v/v) y 2 x PBS y la mezcla de fagos se transfirió a los inmunotubos cubiertos con parafilm y se incubaron durante 30 minutos en rotadores y a continuación 1,5 horas de reposo a temperatura ambiente. A continuación, el inmunotubo se lavó 20 veces con PBS Tween (0,1% v/v) y a continuación 20 veces con PBS [se utilizaron 10 lavados para la primera ronda de selección para maximizar el porcentaje de recuperación de anticuerpos de fagos específicos de antígeno]. Los anticuerpos de fagos específicos se eluyeron mediante la adición de 1 ml de trietilamina 100 mM al tubo y el cubrimiento con parafilm fresco, seguido de incubación durante 10

minutos en un rotador a temperatura ambiente. El fago eluido se neutralizó a continuación mediante la transferencia a un microtubo fresco que contenía 0,5 ml de Tris HCl 1 M pH 7,5. Los fagos eluidos se infectaron a continuación en *E. coli* para preparar fagos para una segunda ronda de selección y también para titular la cantidad de fagos recuperados entre las rondas secuenciales de selección.

Se desarrolló un cultivo de células ER2378 de *E. coli* hasta una DO 600 de aproximadamente 0,5. Para amplificar los fagos seleccionados para una siguiente ronda de selección, se mezcló 1 ml de fago eluido con 5 ml de cultivo ER2378 y 4 ml de medio 2 x TY. A continuación, se incubó en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se extendió sobre placas de bioensayo de 22 cm de 2 x TY AG más tetraciclina (20 µg/ml) y se cultivaron durante la noche a 30°C. A continuación, se rascaron las placas de bioensayo y las células recuperadas se utilizaron para una segunda ronda de selección como antes. Con el fin de controlar el progreso de las selecciones entre la ronda secuencial de selección, se determinaron el título de fagos de entrada y fagos de salida. Se realizó una dilución en serie de fagos en 500 µl de 2TY a los que se añadieron 500 µl de cultivo ER2378 de fagos log y se incubaron en un baño de agua durante 30 minutos a 37°C. Las células infectadas se extendieron sobre placas de agar con 2 x TY AG tetraciclina (20 µg/ml) y se contaron las colonias después de la incubación durante la noche a 30°C. El título de fagos antes y después de la selección por tres rondas se calculó como ufp/ml y mostró un aumento en la recuperación de fagos indicativo de enriquecimiento selectivo en antígenos de anticuerpos de fagos específicos (Tabla 2).

Tabla 2. Selección y cribado de una biblioteca de anticuerpos de un único dominio expresados en fagos

Ronda	Antígeno ¹	Título de entrada ² (ufp/ml)	Título de salida ² (ufp/ml)	Número de enlazadores H5 ³	Número de enlazadores H1 ³
R1a	H1	2×10^{13}	$5,6 \times 10^8$	5/24	10/24
R2a	H1	4×10^{13}	4×10^{10}	-	12/24
R2b	H5	4×10^{13}	2×10^{10}	16/24	-
R3a	H1	$2,3 \times 10^{13}$	8×10^{10}	-	12/24
R3b	H5	$2,3 \times 10^{13}$	$4,8 \times 10^{10}$	19/24	-

¹ antígeno recombinante es H1 derivado de A/California/07/09 (pdm H1N1) o H5 derivado de A/Vietnam/1203/04 (H5N1)

² títulos de fagos antes y después de la selección se proporcionan como unidades formadoras de placa por ml (ufp/ml)

³ número de anticuerpos que se unen a H1 recombinante (A/California/07/09) o H5 recombinante (A/Vietnam/1203/04) del número total cribado

Ejemplo 5: Cribado de biblioteca seleccionada para los clones de anticuerpo que se unen a H1 recombinante (A/California/07/09) y H5 recombinante (A/Vietnam/1203/2004)

El cribado primario de anticuerpos seleccionados se realizó utilizando anticuerpos VHH solubles no purificados inducidos en un formato de 96 pocillos. Las colonias individuales de cada ronda de selección se inocularon en 100 µl de 2 x TY AG (2%) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Costar) usando palillos de dientes estériles. Las placas se incubaron durante la noche a 30°C girando a 255 rpm. Al día siguiente, se añadieron 35 ml de glicerol al 60% v/v a cada pocillo y la placa maestra se almacenó a -70°C. A partir de esta placa maestra, se inoculó una nueva placa de fondo redondo de 96 pocillos (Costar) que contenía 120 µl de 2 x TY ampicilina y glucosa al 0,1% p/v, se inoculó y se cultivó durante 6 horas a 37°C hasta que la DO 600 fue de aproximadamente 0,9. Después de esto, se añadieron 30 µl de 2 x TY ampicilina 100 µg/ml, más 5 mM de IPTG (concentración final 1 mM) y se continuó agitando a 37°C durante la noche. Las placas se centrifugaron a continuación a 600 x g durante 10 minutos y el sobrenadante que contenía anticuerpos VHH solubles fue utilizado para analizar la reactividad específica del antígeno en ELISA.

Se recubrió una placa de 96 pocillos (Nunc) con hemaglutinina recombinante a 1 µg/ml durante la noche en PBS a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con PBS y después se bloquearon con 120 µl/pocillo de leche en polvo al 2% p/v en PBS (M-PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron dos veces con PBS al 0,1% en Tween (v/v) y PBS. A cada pocillo, se añadieron 50 µl de leche en polvo al 4% (p/v) en PBS y a continuación 50 µl de sobrenadante de cultivo que contenía VHH soluble. La placa ELISA se incubó a continuación durante 1,5 horas en una plataforma de agitación a temperatura ambiente. Después de esta incubación, las placas se lavaron tres veces cada una con PBS al 0,1% (v/v) en Tween 20 y tres veces con PBS. Para detectar la unión del anticuerpo, se añadieron 100 µl de anti myc 9E10-HRP (dilución 1/1000) (Roche) en MPBS al 2% a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente sobre una plataforma de agitación. A continuación, las placas se lavaron tres veces cada una con PBS al 0,1% (v/v) en Tween 20 y tres veces con PBS y la unión del anticuerpo se reveló utilizando tinción TMB estándar. Después de detener la reacción con 50 µl de ácido sulfúrico 1M, las placas se leyeron a 450 nm. Un ejemplo de un cribado de ELISA primario utilizando anticuerpos VHH solubles no purificados en un formato de ELISA de 96 pocillos se muestra en la Figura 3. Los clones positivos se puntuaron por tener al menos dos veces la señal de fondo y se caracterizaron adicionalmente para analizar la diversidad de

secuencias, en particular, el número de veces que un clon particular se recuperó en los clones cribados (Tabla 3). Usando un análisis de la secuencia y la evaluación por ELISA, se aislaron diecinueve anticuerpos con una secuencia CDR3 de VHH única con especificidad para H1 recombinante y/o H5 recombinante y progresaron para el cribado secundario más detallado (Ejemplo 6).

5

Tabla 3. Secuencias de CDR de anticuerpos únicos específicos a H1N1 pandémico

Clon ¹	SEQ ID ²	Número ³	V _{HH} CDR 1 ⁴	V _{HH} CDR2 ⁴	V _{HH} CDR3 ⁴
R1a G5	1	4	IVTMG	VIGNYGNTNYADSVKR	STTTPPYEEY
R2b D8	2	2	WYDVG	DIASRGTTNYADSVKVG	RRDWRDY
R2b E8	3	4	RYRMG	GITYDDSTNYAGSVKVG	NPPGNLY
R2b D9	4	1	LYTMG	AITSGESTNYADSVKVG	DPLSTGWGQYSY
R1a F4	5	2	IVTMG	VIGNYGNTNYADSVKVG	STTTPPHEF
R1a A5	6	34	TYPMS	AVTTDGSTSYADYAKG	RDGFFNRYDY
R1a C5	7	1	FYTMG	VIGNGGNTNYAESVKG	SGPGLNV
R1a E5	8	3	NYAIG	FITSTSAVTKYADSVKG	TRWVPTMKADEYNY
R1a F5	9	1	GYAIA	CRASDGNTYYAESLKG	ASWVASLWSPSEYDY
R1a B6	10	1	RYRMG	SIAYDGSTSYADPVKG	DPPGILY
R1a E6	11	1	AYAIA	CISPSDSFTEYGDSVKG	DPVCTAGWYRPSRFDL
R1a G6	12	1	IITMG	VIGNNDNTVYGDSVQG	STLTPPHEY
R1a H6	13	1	LYRVG	AIDWGDGPTTYADSVKG	GNTGSSDRSSSYVH
R2a E8	14	1	MYMID	SIDGRGTPMYADSVKG	KSPLVDNEY
R2a G8	15	1	NNAIG	CMNSRDGTTNYADSVKVG	KGFAPFLIGCPWGKAEYDY
R2a B9	16	1	INAMG	AITAGGNTYYADSAKA	TKAFGIATITADYEL
R2a F9	17	1	IVTMG	VIGNYGNTNYADSVKVG	SSTVAPHEY
R2a G9	18	1	FYTMG	VIGNGGNTNYADSVKVG	SGPGGVEV
R2a H9	19	1	FYTMG	VIGNGGTNYADSVKG	SGPGGVIL
¹ Número de identificación de clon					
² Secuencia de identificación					
³ Número de veces que una secuencia particular de CDR3 apareció en el cribado de 62 clones aislados independientemente					
⁴ CDR definido de acuerdo con el esquema de numeración Kabat					

Ejemplo 6: Análisis de anticuerpos VHH de un único dominio purificados en diferentes subtipos de gripe

10

Para un cribado más detallado de la especificidad del anticuerpo, se purificaron anticuerpos VHH solubles purificados a partir del periplasma de *E. coli*. Los diecinueve anticuerpos diferentes identificados en el Ejemplo 4 se inocularon cada uno en 2 ml de medio 2YT suplementado con 100 µg/ml (p/v) de ampicilina, glucosa al 2% (p/v), Tet (5 µg/ml) en un tubo de 10 ml y se cultivaron durante la noche a 37°C con agitación. De este cultivo, se tomó una inoculación de 50 µl en 50 ml de medio 2x TY suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, glucosa al 0,1% (v/v) y se cultivaron hasta una DO de -0,6 a 37°C. La expresión de anticuerpos solubles se indujo con la adición de IPTG 1 mM, seguido de una incubación adicional durante la noche a 30°C. El cultivo de 50 ml se centrifugó durante 20 minutos y el sedimento bacteriano se resuspendió en 2,5 ml de tampón periplásmico (Tris HCl 200 mM, pH 7,5, sacarosa al 20% (v/v), EDTA 1 mM), seguido de incubación en un rotador durante 1 hora a 4°C. Los residuos celulares se eliminaron por centrifugación dos veces y el sobrenadante correspondiente a los anticuerpos VHH solubles recuperado del periplasma bacteriano se dializó (Pierce) en PBS con dos cambios de tampón. Después de la eliminación de EDTA por diálisis, el anticuerpo se purificó por cromatografía de quelatos metálicos (Clontech) según las instrucciones del fabricante. Se utilizó aproximadamente 1 ml de resina por anticuerpo. Después de la incubación de la resina con las preparaciones periplásmicas, se transfirió a una columna de gravedad (BioRad) y se lavó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo purificado se eluyó en dos volúmenes de lecho de tampón de elución que contenía imidazol 100 mM. El anticuerpo se dializó adicionalmente frente a PBS con dos cambios de tampón y la concentración de anticuerpo se determinó usando DO 280.

15

20

25

30

35

Se reconstituyeron preparaciones virales inactivadas en 1 ml de PBS y se incubó una placa de 96 pocillos de ELISA durante la noche a 4°C con 50 µl de antígeno resuspendidos en 10 ml de tampón de bicarbonato 0,5 M pH 9,6. Las placas se lavaron y se procesaron como en el Ejemplo 4, excepto que se utilizó una dilución en serie de anticuerpo purificado de 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01, 0,003, 0,001, 0,0003, 0,0001 µg/ml y se realizaron ensayos por duplicado. Se representaron curvas de dosis-respuesta y se calcularon los valores de EC50 utilizando GraphPad Prism (Tabla 4). A partir de este análisis, los anticuerpos de reacción cruzada se observaron como R2b-E8, R2b-D9, R1a-A5, R1a-C5, R1a-B6, R1a-H6, y R2a-G8.

Tabla 4. Análisis de anticuerpos seleccionados en diferentes subtipos de cepas virales de la gripe

Clon	A/California/7/ 2009 (H1N1) EC50 ¹ (µg/ml)	A/Brisbane / 5 9/2007 (de tipo H1N1) EC50 (µg/ml)	A/Brisbane / 10/2007 (H3N2) EC50 (µg/ml)	B/Brisbane / 60/2008 EC50 (µg/ml)	A/TurkTurk / 1/2005 (H5N1) EC50 (µg/ml)	A/Vietnam / 1 19/2004 (H5N1) EC50 (µg/ml)	A/Hong Kong/ 213/200 3 (H5N1) EC50 (µg/ml)	A/Indonesia / 05/2005 (H5N1) EC50 (µg/ml)	A/Pato/Sing -Q/97 (H5N3) EC50 (µg/ml)	A/Hong Kong/ 1073/99 (H9N2) EC50 (µg/ml)	A/ánade/ Eng/727/0 6 (H2N3) EC50 (µg/ml)
R1a-G5	1,73	0,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R2b-D8	-	14,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R2b-E8	3,64	18,4	-	-	0,89	1,83	1,2	0,80	4,98	5,63	0,002
R2b-D9	0,90	0,80	-	-	0,76	1,81	2,8	0,58	5,64	-	0,06
R1a-F4	0,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R1a-A5	0,31	0,38	-	-	0,13	0,25	0,27	0,15	0,27	-	0,06
R1a-C5	1,71	3,30	-	-	0,15	2,89	2,9	1,17	7,57	4,48	0,06
R1a-E5	3,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R1a-F5	0,55	0,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R1a-B6	0,39	0,58	-	-	0,44	0,82	0,37	0,42	1,32	2,3	0,102
R1a-E6	2,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R1a-G6	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R1a-H6	3,85	-	-	-	-	-	-	-	-	5,7	-
R2a-E8	0,51	1,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R2a-G8	4,11	1,86	-	-	1,93	3,36	6,2	5,7	9,67	-	2,5
R2a-B9	1,00	9,84	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R2a-F9	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R2a-G9	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R2a-H9	0,97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1EC50 es la concentración de anticuerpo en µg/ml que proporciona el 50% del efecto de unión máxima de cada anticuerpo de dominio único VHH purificado en un grupo representativo de los subtipos virales utilizando ELISA. – No se observa unión

Ejemplo 7: Afinidad de los anticuerpos de un único dominio en hemaglutinina recombinante de diferentes subtipos virales de gripe

Se determinó la afinidad de los anticuerpos VHH purificados (Ejemplo 5) utilizando el procedimiento de cinética de un ciclo en una máquina BIAcore T100 (Karlsson et al., 2006). El procedimiento consiste en inyectar secuencialmente una serie de concentraciones de anticuerpos sobre una superficie hemaglutinina sin regeneración entre inyecciones. La hemaglutinina recombinante purificada de subtipo variante (Protein Sciences, E enzymes) se inmovilizó sobre un chip CM5 a aproximadamente 3000 unidades de resonancia (RU). Se hicieron correr una serie de diluciones de anticuerpo de 100 nM, 50 nM, 25 nM, 10 nM 5 nM secuencialmente sobre las diferentes superficies de antígeno sin regeneración. Se restó una superficie de referencia antes de la evaluación de los sensogramas. La afinidad del anticuerpo se determinó usando el procedimiento de cinética de un ciclo del software de evaluación BIA (GE Healthcare) usando un modelo de ajuste 1:1 (Tabla 5). El análisis sobre hemaglutinina recombinante y preparaciones virales (ejemplo 6) mostró que los anticuerpos R2b-E8, R2b-D9, R1a-A5, R1a-C5, R1a-B6, R1a-H6, y R2a-G8 eran anticuerpos de reacción cruzada.

Tabla 5 Análisis de unión en diferentes hemaglutininas recombinantes utilizando resonancia de plasmón superficial

Clon	SEQ ID	H1 ^a (pdm H1N1) Kd (nM)	H5 ^b (H5N1) Kd (nM)	H2 ^c (H2N2) Kd (nM)	H9 ^d (H9N2) Kd (nM)	H3 ^e (H3N2) Kd (nM)	H7 ^f (H7N7) Kd (nM)
R1a-G5	1	24	- ^g	-	-	-	-
R2b-D8	2	- ^g	-	-	-	-	-
R2b-E8	3	8,2	3,6	-	-	-	-
R2b-D9	4	0,4	1,6	-	87	-	-
R1a-F4	5	7,3	-	-	59	-	-
R1a-A5	6	3,3	0,7	186	-	-	-
R1a-C5	7	1,9	2,7	67	22	-	-
R1a-E5	8	0,6	-	-	-	-	-
R1a-F5	9	9,2	-	-	-	-	-
R1a-B6	10	0,7	1,7	43	7,6	-	-
R1a-E6	11	22,8	-	-	-	-	-
R1a-G6	12	4,4	-	-	-	-	-
R1a-H6	13	-	241	-	-	-	-
R2a-E8	14	0,8	-	34	-	-	-
R2a-G8	15	3,1	9	39	-	-	-
R2a-B9	16	0,2	-	-	-	-	-
R2a-F9	17	60	-	-	-	-	-
R2a-G9	18	62	-	-	-	-	-
R2a-H9	19	2,8	-	40	-	-	-
control	-	-	-	-	-	-	-

^a Determinación de la afinidad de un ciclo en los residuos 18-530 de H1 recombinante de longitud completa derivado A/California/06/09. La afinidad se proporciona en nM hasta 1 decimal y es el promedio de al menos dos ensayos separados.

^b H5 A/Vietnam/1203/04 (H5N1) ^c recombinante H2 A/Japón/305/1957 (H2N2) ^d recombinante H9 A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) ^e recombinante H3 A/Brisbane/10/07 (H3N2) ^f recombinante H7 A/Países Bajos/219/03 (H7N7) recombinante.

^g – Sin unión.

Ejemplo 8: Mapeo de epítomos

Evaluación de si los anticuerpos se unían a la cabeza globular de la hemaglutinina se evaluó en BIAcore. Se inmovilizaron el dominio HA1 recombinante de hemaglutinina (18-344) (A/California /06/09) H1N1 y la hemaglutinina total (18-530) (E enzymes) sobre un chip CM5 de BIAcore (GE Healthcare). Se determinó la afinidad usando un procedimiento cinética de un ciclo (Ejemplo 7) y se observó que los anticuerpos de reacción cruzada no se unían al dominio de cabeza globular HA1 y por inferencia probablemente se unían a la región tallo HA2. La región tallo HA2 está más conservada a lo largo de los subtipos virales y como tal, es coherente con la reactividad cruzada de estos anticuerpos.

Se obtuvo una prueba adicional de la localización de anticuerpos de reacción cruzada en la región tallo de hemaglutinina conservada mediante un tratamiento ácido que desencadena un cambio conformacional irreversible en la molécula de HA. Se resuspendió una preparación viral de H1N1 (A/California/06/09) en 1 ml de PBS y se diluyeron 200 µl en 20 ml en PBS y el pH bajó a 2,83 con 1,5 ml de HCl 1M. Después de la incubación durante 2,5 horas a temperatura ambiente el antígeno se neutralizó con 20 ml de tampón bicarbonato 0,5 M para dar un pH final de ~9.0. A continuación, este antígeno tratado con ácido se utilizó para recubrir placas de ELISA durante la noche a 4°C. Las placas de ELISA al día siguiente se bloquearon y se determinó la unión a antígeno como en el Ejemplo 6.

También se realizó un ensayo paralelo con antígeno que no había sido tratado con ácido. Se observó que todos los anticuerpos se unieron a H1N1 que no había sido tratado con ácido, mientras que se observó que varios anticuerpos perdieron la unión después de incluir los anticuerpos de reacción cruzada R2b-E8, R2b-D9, R1a-A5, R1a-C5, R1a-B6, R1a-H6. Los anticuerpos que se unieron a la cabeza globular generalmente retuvieron la unión después del tratamiento con ácido. Esto proporcionó más pruebas de que los anticuerpos de reacción cruzada se unían a la región tallo más conservada de hemaglutinina.

Otra prueba de la unión de anticuerpos de reacción cruzada a la región del tallo conservada se proporcionó mediante el ensayo de la inhibición de la hemaglutinación de eritrocitos de pavo. La hemaglutinina (HA) es la principal proteína de la cubierta viral que media en la unión al ácido siálico de la superficie celular a través del dominio cabeza globular (HA1). Los ensayos de inhibición de la hemaglutinación se realizaron como en Harmon et al., (1988) y se utilizaron para determinar que los anticuerpos podrían bloquear la unión del virus de la gripe a los eritrocitos de pavo, y para indicar la localización del epítipo de anticuerpo al dominio de cabeza globular (HA1). Brevemente, se prepararon diluciones en serie de suero de alpacas inmunizadas o anticuerpos VHH purificados partiendo de 250 µg/ml. Las diluciones en serie se incubaron con 8 unidades de HA de virus por pocillo y se añadieron eritrocitos de pavo a una concentración del 0,5% y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Todos los anticuerpos que mostraron unión al dominio de cabeza globular (HA1) también fueron positivos para la inhibición de la hemaglutinación, excepto R2a-G8. De todos los anticuerpos neutralizantes cruzados H1/H5, sólo se identificó que R1a-C5 mostraba alguna inhibición de la hemaglutinación (Tabla 6).

Tabla 6. Mapeo de epítipos de anticuerpos a la cabeza globular o región tallo de haemaglutinina

Clon	H1 (18-530) ¹ (pdm H1N1) Kd (nM)	HA1 (18-344) ² (pdm H1N1) Kd (nM)	Título HI (µg/ml) H1N1 (X-181) ³	Tratamiento ácido ⁴	Sin tratamiento ácido ⁴
R1a-G5	24	26	> 1,56	+	+
R2b-D8	- ⁹	-	> 25	+	+
R2b-E8	8,2	-	> 25	-	+
R2b-D9	0,4	-	> 25	-	+
R1a-F4	7,3	4,7	> 2,08	+	+
R1a-A5	3,3	-	> 25	-	+
R1a-C5	1,9	734	> 10,40	-	+
R1a-E5	0,6	-	> 25	-	+
R1a-F5	9,2	6,1	> 25	ND	+
R1a-B6	0,7	-	> 25	-	+
R1a-E6	22,8	36	> 25	ND	+
R1a-G6	4,4	4,6	> 1,04	+	+
R1a-H6	-	-	> 25	-	+
R2a-E8	0,8	-	> 25	-	+
R2a-G8	3,1	7,7	> 25	ND ⁴	+
R2a-B9	0,2	-	> 25	-	+
R2a-F9	60	79	> 1,04	+	+
R2a-G9	62	69	> 1,30	+	+
R2a-H9	2,8	4,7	> 1,30	+	+
control	-	-	> 25	-	+

¹ Determinación de la afinidad de un ciclo en los residuos 18-530 de H1 recombinante de longitud completa de A/California/06/09. La afinidad se proporciona en nM hasta 1 decimal

² Determinación de la afinidad de un ciclo en los residuos 18-344 de dominio HA1 de cabeza globular de A/California/06/09. La afinidad se proporciona en nM hasta 1 decimal

³ El ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) se proporcionó como la dilución mínima de anticuerpo a la que la inhibición de la aglutinación de eritrocitos de pavo en µg/ml de anticuerpo purificado. Los valores se dan como un promedio de tres ensayos independientes. Se utilizó la cepa (X-181) de H1N1 adaptada al laboratorio

⁴ ELISA en la preparación viral de A/07/09 (pdm H1N1)/California tratado con ácido y el control correspondiente con ningún tratamiento ácido ⁴ ND No determinado

Ejemplo 9 - humanización de un anticuerpo V_{HH} (ejemplificado por referencia a la secuencia VHH R2a-F9 de camélido)

Las regiones marco (FR) de R2a-F9 se alinearon con la base de datos de secuencia de línea germinal humana utilizando ClustalW y usando secuencias tomados de la base V (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase-ok>), véase la tabla 7. La secuencia de la línea germinal humana más cercana era DP53. La FR4 de R2a-F9 se alineó con las secuencias JH y se escogió JH1. Las regiones FR y CDR se definieron de acuerdo con Kabat et al., (1991). El sistema de numeración IMGT (<http://cines.fr>) define los límites de manera diferente, por ejemplo la cisteína 92 define el inicio de CDR3 de acuerdo con esta nomenclatura.

Los residuos del marco en R2a-F9 diferentes de la secuencia de VH-DP53 de la línea germinal están resaltados en azul (subrayado). La identidad de secuencia en las regiones de marco es del 79%. Hay un total de 17 residuos en los marcos que son diferentes en el gen variable DP53 entre la línea germinal de alpaca y humano.

La estrategia de humanización implica la sustitución de los residuos en FR que no son esenciales para la unión al antígeno y la estabilidad. Esto incluye elegir residuos de camélidos habituales conocidos para ser retenidos en la secuencia final, por ejemplo, “residuos Hallmark” (Vincke et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 284 (5), 3.273-3.284). En R2a-F9, se han identificado cinco residuos “hallmark”, 4 de los cuales están en la FR2. Se realizan una serie de variantes y se evalúa la importancia de cada residuo de lama para la unión del antígeno y la estabilidad.

Las 12 construcciones se ensayan en BIAcore para la unión a H1, rendimiento de expresión y estabilidad térmica, véase la Tabla 8. Las mutaciones en la línea germinal humana que no afectan a la unión al antígeno se combinan en una segunda ronda de construcciones y la prueba se repite hasta que se obtiene una construcción humanizada final con la cantidad mínima de secuencia de anticuerpo de alpaca en las regiones marco.

Combinar todas las mutaciones que no afectan a la función y la estabilidad en construcciones finales para crear un gen de anticuerpo con el máxima contenido de la secuencia humana en las regiones marco. En la tabla 9 se muestran un total de 13 residuos de alpaca se convierten a la línea germinal humana.

Tabla 7

	1	30	CDR1- 3637	49	-----CDR2----- 66
R2a-F9-h	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISS	IVTMG	WYRQAPGKERELVA	VIGNYGN-TNYADSVKG	RFTVSRDRAKNTVYLQMNSLNVEDTAMYVCKF
DP53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYWMH	WYRQAPGKGLVWYS	RNSDGSSTSYADSVKG	RFTISRDNRAKNILYQLMNSLRVEDTAVYY
	94	-CDR3----			
R2a-F9-h	QKF	SSTVAPHEY	WGQGTQVTVSS		
DP53 (96)	CAR	-----	WGQGTQVTVSS		

Tabla 8

Construcciones de mutantes en primera ronda

R2a-F9_Q1E	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISS	IVTMG	WYRQAPGKERELVA	VIGNYGNNTYADSVKG	RFTVSRDRAKNTVYLQMNSLNVEDTAMYVCKF	SSTVAPHEY	WGQGTQVTVSS
R2a-F9_S23A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISS	IVTMG	WYRQAPGKERELVA	VIGNYGNNTYADSVKG	RFTVSRDRAKNTVYLQMNSLNVEDTAMYVCKF	SSTVAPHEY	WGQGTQVTVSS
R2a-F9_S27F	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISS	IVTMG	WYRQAPGKERELVA	VIGNYGNNTYADSVKG	RFTVSRDRAKNTVYLQMNSLNVEDTAMYVCKF	SSTVAPHEY	WGQGTQVTVSS
R2a-F9_I28T	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISS	IVTMG	WYRQAPGKERELVA	VIGNYGNNTYADSVKG	RFTVSRDRAKNTVYLQMNSLNVEDTAMYVCKF	SSTVAPHEY	WGQGTQVTVSS
R2a-F9_S29F	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISS	IVTMG	WYRQAPGKERELVA	VIGNYGNNTYADSVKG	RFTVSRDRAKNTVYLQMNSLNVEDTAMYVCKF	SSTVAPHEY	WGQGTQVTVSS
R2a-F9_E46V	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISS	IVTMG	WYRQAPGKERELVA	VIGNYGNNTYADSVKG	RFTVSRDRAKNTVYLQMNSLNVEDTAMYVCKF	SSTVAPHEY	WGQGTQVTVSS
R2a-F9_A49S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISS	IVTMG	WYRQAPGKERELV	VIGNYGNNTYADSVKG	RFTVSRDRAKNTVYLQMNSLNVEDTAMYVCKF	SSTVAPHEY	WGQGTQVTVSS
R2a-F9_V69I	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISS	IVTMG	WYRQAPGKERELVA	VIGNYGNNTYADSVKG	RFTISRDNRAKNTVYLQMNSLNVEDTAMYVCKF	SSTVAPHEY	WGQGTQVTVSS
R2a-F9_N93R	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISS	IVTMG	WYRQAPGKERELVA	VIGNYGNNTYADSVKG	RFTVSRDRAKNTVYLQMNSLNVEDTAMYVCKF	SSTVAPHEY	WGQGTQVTVSS
R2a-F9_V94A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISS	IVTMG	WYRQAPGKERELVA	VIGNYGNNTYADSVKG	RFTVSRDRAKNTVYLQMNSLRVEDTAMYVCKF	SSTVAPHEY	WGQGTQVTVSS
R2a-F9_M99V	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISS	IVTMG	WYRQAPGKERELVA	VIGNYGNNTYADSVKG	RFTVSRDRAKNTVYLQMNSLNVEDTAMYVCKF	SSTVAPHEY	WGQGTQVTVSS
R2a-F9_M99V	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISS	IVTMG	WYRQAPGKERELVA	VIGNYGNNTYADSVKG	RFTVSRDRAKNTVYLQMNSLNVEDTAVYYVCKF	SSTVAPHEY	WGQGTQVTVSS

Tabla 9

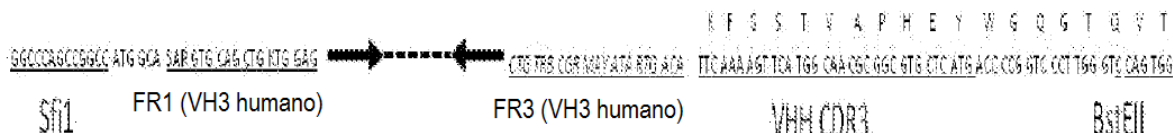
Residuo R2a-F9	Localización	Diversidad distintiva	Línea germinal VH-DP-53	Comentario
Q1	FR1	-	E	Muta Q1E
S23	FR1	-	A	Muta S23A
S27	FR1	-	F	Muta S27F
I28	FR1	-	T	Muta I28T
S29	FR1	-	F	Muta S29F
Y37	FR2	Sí (FYHILV)	V	Retiene
E44	FR2	Sí (GEADQRSL)	G	Retiene
R45	FR2	Sí (LRCILPQV)	L	Retiene

E46	FR2	-	V	Muta E46V
L47	FR2	Sí (WLFAGIMRS)	W	Retiene
A49	FR2	-	S	Muta A49S
V69	FR3	-	I	Muta V69I
V78	FR3	-	L	Muta V78L
N93	FR3	-	R	Muta N93A
V94	FR3	-	A	Muta V94A
M99	FR3	-	V	Muta M99V
Q108	FR4	Sí (QLR)	L	Retiene

Ejemplo 10: Introducción de una secuencia de CDR3 de VHH en un anticuerpo humano

Dado que la CDR3 de VHH es el determinante clave de la especificidad de unión, este bucle se puede incorporar fácilmente en un gen de VH enteramente humano al tiempo que preserva la funcionalidad. El anticuerpo resultante es totalmente humano con una CDR1 y CDR2 humanas, excepto para el bucle CDR3 de VHH que deriva de alpaca. Dicho anticuerpo tiene un menor riesgo de provocar una respuesta inmunitaria adversa cuando se administra como un anticuerpo monoclonal terapéutico debido al mayor contenido de secuencia humana en comparación con el anticuerpo derivado en el Ejemplo 9.

A modo de ejemplo, el bucle CDR3 de VHH se injerta en un gen V humano apropiado mediante el diseño de un oligonucleótido correspondiente a la secuencia de CDR3 de VHH entre paréntesis por la secuencia de línea germinal de anticuerpo humano correspondiente a FR3 y FR4 de cualquiera de una VH humana individual o una colección de secuencias de VH humanas. A continuación se muestra un ejemplo que incluye un oligonucleótido 3' correspondiente a la VHH-CDR3 de R2a-F9 (SEQ ID 36) adjunto con una secuencia degenerada diseñada para cebear a todos los miembros de la familia de genes de VH3 humanos. El gen de VH3 fue seleccionado simplemente porque los anticuerpos VHH de camélidos muestran mayor homología a la familia VH3 humana. El cebador 5' correspondiente es un oligonucleótido degenerado diseñado para hibridarse con FR1 de todos los miembros de genes de VH3 humanos. Estos dos oligonucleótidos se utilizan en una reacción de PCR con genes de VH humanos derivados de ADNc preparado por ejemplo a partir de linfocitos de sangre periférica de los donantes sin tratar utilizando procedimientos establecidos. El diseño mostrado a continuación añade los sitios de restricción Sfi1 y BstEII para facilitar la clonación en el vector de expresión en fagos pNIBS-1 (Ejemplo 3).



Después de la construcción de una biblioteca de expresión en fagos de genes de VH humanos injertados con VHH-CDR3 de R2a-F9, la biblioteca se selecciona a continuación en base a H1 recombinante como en el Ejemplo 4 y los anticuerpos humanizados se criban como en el Ejemplo 5.

Ejemplo 11: Evaluación de la eficacia in vivo

La eficacia de los anticuerpos de reacción cruzada para la inmunoterapia pasiva se evalúa en un modelo de estimulación con ratón. Los siete anticuerpos neutralizantes cruzados H1/H5 (R2b-E8, R2b-D9, R1a-A5, R1a-C5, R1a-B6, R1a-H6, R2a-G8) se ensayan por su capacidad de proteger a los ratones BALB/c de la estimulación con virus H1N1 (A/California/07/09) y H5N1 (A/Vietnam/1203/2004) en un entorno profiláctico. Los anticuerpos VHH se expresan, purifican (Ejemplo 6) y se administran por vía intranasal como agentes monovalentes a 5 mg/kg, 24 horas antes de la estimulación con una dosis letal de virus. Un anticuerpo VHH no relevante y un único brazo de PBS del estudio se incluyen como controles. Se controlan la supervivencia, el peso corporal y los títulos virales en los pulmones y otros tejidos para evaluar la capacidad de los anticuerpos de proteger contra la estimulación letal con los virus H1N1 y H5N1. Dichos anticuerpos demuestran protección contra dicha exposición letal. Los anticuerpos también se evalúan en un entorno terapéutico, donde el anticuerpo se administra 24 horas después de la infección con H1N1 y H5N1. De nuevo, se controlan la supervivencia, el peso corporal y los títulos virales después de la estimulación en los pulmones y otros tejidos. Dichos anticuerpos demuestran protección contra dicha estimulación letal.

Ejemplo 12: Actividad de neutralización de anticuerpos VHH recombinantes sobre H1N1 y H5N1

El ensayo de microneutralización de la gripe se realizó esencialmente como en Harmon et al., (1988). En resumen, el suero de una alpaca inmunizada o anticuerpos VHH purificados (a una concentración de partida de 5 µg/ml) se diluyeron en serie, dos veces, en un volumen de 50 µl de diluyente de ensayo (DMEM con la adición de: 2 mM de glutamina, Pen/Strep 1/100, anfotericina 1/100, aminoácidos no esenciales y FCS 1/200) en una placa de fondo

plano de 96 pocillos (Costar) en columnas duplicadas 1-10. Los reagrupamientos de genética inversa NIBRG-14 (A/Vietnam/1194/04; H5N1) y el virus atenuado reagrupado X-181 (A/California/07/09; H1N1) fueron utilizados en ensayos de neutralización viral. El virus X-181 y los virus NIBRG-14 se utilizaron a una dosis de virus de 10^2 TCID₅₀ por 50 µl de diluyentes de ensayo. En todos los ensayos, se incluyó un control de "virus solo" (VC) y un control de "células solas" (CC). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y se añadieron 100 µl de $1,5 \times 10^5$ /ml de células MDCK (células de riñón canino Madin-Darby) a todos los pocillos. Las placas se incubaron durante 18 horas a 30°C en 5% de CO₂. Las células se fijaron con 100 µl de 0,6% p/v de metanol/peróxido de hidrógeno por pocillo y se dejaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron 3 veces en PBS Tween-20 (0,05% p/v). El crecimiento de virus de la gripe y la liberación de nucleoproteína fue con un anticuerpo monoclonal primario anti- nucleoproteína de gripe A de ratón (Serotec). Se añadieron 100 µl de este anticuerpo a cada pocillo a una dilución 1: 3000 en 6 sal PBS/Tween-20 (0,1%) 5% p/v de leche Marvel. Se añadieron 100 µl de esto a todos los pocillos y las placas y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Se utilizó conjugado con HRP de policlonal de conejo anti-IgG de ratón (DAKO) a una dilución de 1:5000 en 6 sal PBS/Tween-20 (0,1% v/v), 5% (p/v) de leche Marvel en polvo, 1% (v/v) de albúmina de suero bovino y se incubó durante 1 hora a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces y se revelaron utilizando tinción TMB. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 100 µl de HCl 0,5 M a cada pocillo y se leyeron a 450 nm y 620 nm. Los valores de 620 nm se restaron de los valores de 450 nm para corregir para la absorción de la placa. La concentración de anticuerpo a la que se observó un 50% de neutralización viral se determinó utilizando la ecuación;

$$\frac{(\text{promedio de la DO del VC}) - (\text{promedio de la DO de CC}) + (\text{promedia de la DO de CC})}{2} = x$$

Donde x es la DO a la que estaban infectadas el 50% de las células MDCK.

Todos los clones de anticuerpos, excepto R2b-D8, R1a-F4, R1a-E5, R1a-F5 y R1a-E6, fueron capaces de neutralizar X-181 que es una cepa adaptada para laboratorio de H1N1 (Tabla 10). De los anticuerpos neutralizantes de H1N1, R2b-E8, R2b-D9, R1a-A5, R1a-C5, R1a-B6, R1a-H6 y R2a-G8 también fueron capaces de neutralizar NIBRG-14 (H5N1) y fueron considerados como anticuerpos de neutralización cruzados (Tabla 10). Esto fue consistente con los datos de reactividad cruzada que se muestran en los ejemplos 5, 6 y 7. Para los anticuerpos R2b-E8, R2b-D9, R1a-A5, R1a-B6 y R1a-H6 esto fue consistente con la ausencia de actividad de inhibición de la hemaglutinación y la especificidad para epítomos sensibles a ácidos en la región tallo conservada de hemaglutinina (Tabla 6).

Tabla 10. Neutralización por anticuerpos de la infección viral por H1N1 y H5N1 de células MDCK

Clon	Neutralización X-181 A/California/07/09 (H1N1 pdm) EC50 nM	Neutralización NIBRG-14 A/Vietnam/1194/04 (H5N1) EC50 nM
R1a-G5	30 nM	-
R2b-D8	-	-
R2b-E8	54 nM	29 nM
R2b-D9	55 nM	7,8 nM
R1a-F4	-	-
R1a-A5	23 nM	8,0 nM
R1a-C5	23 nM	55 nM
R1a-E5	-	-
R1a-F5	-	-
R1a-B6	31 nM	20 nM
R1a-E6	-	-
R1a-G6	12 nM	-
R1a-H6	53 nM	12 nM
R2a-E8	26 nM	-
R2a-G8	538 nM	> 1 µM
R2a-B9	29 nM	-
R2a-F9	68 nM	-
R2a-G9	62 nM	-
R2a-H9	16 nM	-
control	-	-

Ejemplo 13: Evaluación como "anticuerpo universal" para potencia de la vacuna

Los anticuerpos de reacción cruzada de la divulgación se utilizan en ensayos de potencia para las vacunas de la gripe atenuadas. Los anticuerpos de reactividad cruzada de esta solicitud reaccionan de forma cruzada con (1) muchas/todas las hemaglutininas de un subtipo/tipo de virus de la gripe, o con (2) hemaglutininas de más de un subtipo de virus de gripe A, perteneciendo todos estos subtipos a uno de los dos grupos filogenéticos reconocidos de

la gripe HA, o con (3) HA de ambos grupos filogenéticos, el grupo 1 y grupo 2.

Un anticuerpo que tiene reactividad cruzada como en (1) es útil para la prueba de potencia de vacunas de la gripe multivalentes, preferiblemente trivalentes y tetravalentes. Un anticuerpo que tiene reactividad cruzada como en (2) es útil para la prueba de potencia de vacunas de la gripe multivalentes, preferiblemente trivalentes y tetravalentes; para la prueba de potencia de vacunas de gripe pandémica o prepandémicas que contienen un único subtipo de virus A de la gripe; y para la prueba de potencia de las vacunas que contienen más de un subtipo/tipo, perteneciendo cada componente del virus a un grupo filogenético diferente. Un anticuerpo que tiene reactividad cruzada como en (3) es útil para la prueba de potencia de las vacunas de la gripe monovalentes, preferiblemente vacunas de la gripe pandémicas y prepandémicas.

El uso de dichos anticuerpos de reacción cruzada en las pruebas de potencia elimina la necesidad de cambiar con frecuencia el reactivo anticuerpo como es el caso en los procedimientos utilizados en la actualidad, para los que los antisueros de oveja específicos tienen que ser generados cada vez que se anuncia y aplica un cambio cepa; la producción de un nuevo antisuero para cada virus antígenicamente derivado que se utiliza en las vacunas de la gripe ha sido identificado como un posible cuello de botella en el camino del cambio de cepa del virus a la vacunación con una vacuna contra la gripe actualizada. Para resolver este problema, los anticuerpos de reacción cruzada de esta divulgación se producen por adelantado y están por lo tanto disponibles en todo momento; después de un cambio de cepa en la producción de vacunas de la gripe, (a) anticuerpo/anticuerpos de reacción cruzada se pueden usar inmediatamente, sin tiempo de espera a la disponibilidad de anticuerpos específicos de la cepa.

A modo de ejemplo, se utiliza un anticuerpo de reacción cruzada en un ensayo de inmunodifusión radial simple (SRID o SRD). Siguiendo los protocolos estándar para SRD, el anticuerpo de reacción cruzada se incorpora en una matriz de gel y a continuación se usa en el ensayo. Se forma un anillo de precipitina cuando se deja difundir la hemaglutinina de la gripe en el gel y se puede medir siguiendo protocolos estándar para la visualización del anillo/zona de SRD.

En otro ejemplo, se utilizan anticuerpos de reacción cruzada en ensayos de ELISA para medir cuantitativamente la potencia de las vacunas y las muestras prevacunas, tales como grupos monovalentes. Se pueden utilizar ensayos de ELISA de varios formatos. Por ejemplo, se puede utilizar un ELISA sándwich utilizando un anticuerpo recubierto sobre una superficie sólida para capturar hemaglutinina y un anticuerpo para detectar HA capturada. El anticuerpo de captura y de detección puede ser el mismo anticuerpo, o pueden ser diferentes anticuerpos. Cualquiera de los dos anticuerpos, o ambos, pueden ser anticuerpos de reacción cruzada de la presente divulgación. En otro formato, se utiliza un ELISA de competición. HA se recubre sobre una superficie sólida y reacciona con anticuerpo/anticuerpos de reacción cruzada de la presente divulgación. Un antígeno de referencia, o la muestra a medir, se utiliza como reactivo competitivo. La reducción de la unión del anticuerpo de reacción cruzada a la HA recubierta se puede utilizar para cuantificar la HA en solución usando una curva estándar generada a partir del reactivo antígeno de referencia. Pueden emplearse otros formatos de ensayos ELISA para un efecto similar; en todos los casos, un anticuerpo de reacción cruzada, o una multitud de anticuerpos de reacción cruzada, se utilizan como reactivos específicos para capturar y/o detectar HA.

En otro ejemplo, la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) se utiliza para establecer un ensayo de potencia para vacunas de la gripe atenuadas. Se utilizan anticuerpos de reacción cruzada para detectar y cuantificar proteína/antígeno HA. Se pueden utilizar varios formatos de ensayos basados en SPR. En un ejemplo preferido, se emplea un ensayo competitivo, con antígeno de referencia y anticuerpo de reacción cruzada que compite por la unión a HA que recubre un chip, según sea apropiado para el dispositivo específico utilizado.

En otro ejemplo, se utilizan el anticuerpo/anticuerpos de reacción cruzada en un procedimiento que utiliza proteínas (en particular, HA) inmovilizadas sobre una membrana. La membrana puede ser una membrana de nitrocelulosa, una membrana de PVDF u otra membrana adecuada. La inmovilización de proteínas y HA en la membrana se puede producir a través de diversos procesos, tales como transferencia Western utilizando diversos dispositivos, slot blotting, manchas sobre una membrana, y otros.

En otro ejemplo, se utilizan anticuerpos de reacción cruzada para enriquecer HA a partir de muestras, tales como vacunas o grupos monovalentes. El enriquecimiento puede ser a través del uso de anticuerpos de reacción cruzada en inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, separación magnética (con el anticuerpo que está acoplado por algún medio a sustancias magnéticas, tales como perlas paramagnéticas), o cualquier otro procedimiento inmunológico capaz de unirse y enriquecer HA de una muestra que va a ser, en su mayor parte, un líquido que contiene HA en solución. La HA adsorbida a las sustancias, tales como adyuvantes, también puede someterse a dicho enriquecimiento, ya sea en muestras no tratadas o después del tratamiento para desadsorber la HA. A continuación, puede cuantificarse la HA enriquecida usando cualquier procedimiento adecuado. Los procedimientos adecuados incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masas, en particular espectrometría de masas con dilución de isótopos, tal como se utiliza en "espectrometría de masas por inmunocaptura con dilución de isótopos" (Pierce et al., Analytical Chemistry, 2011 dx.doi.org/10.1021/ac2006526) y HPLC.

Ejemplo 14: Diseño de una vacuna de la gripe que provoca una respuesta inmunitaria de protección cruzada contra

futuras cepas de la gripe del Grupo 1

Se utilizan anticuerpos de reacción cruzada para definir epítomos de hemaglutinina, que se conservan estructuralmente a través de diferentes subtipos virales. Tales epítomos se utilizan a continuación para diseñar una vacuna, que cuando se administra a pacientes provoca una respuesta inmunitaria protectora contra futuros subtipos virales eliminando así la necesidad de la vacunación estacional repetida contra un virus de la gripe en constante evolución.

El mapeo del epítomo de un anticuerpo de reactividad cruzada de esta divulgación se realiza mediante co-cristalización del anticuerpo de reacción cruzada en un complejo con la hemaglutinina y la posterior cristalografía de rayos X. Alternativamente, el anticuerpo de reacción cruzada se construye como una biblioteca de expresión en fagos de fragmentos de gen derivados del gen de HA de un virus de la gripe, tal como un H1N1 pandémico (por ejemplo, A/California/07/2009). El gen H1-HA se sintetiza, se digiere con ADNasa en fragmentos y se clona en el vector de expresión en fagos pNIBS-1. Esta biblioteca expresada en fagos de fragmentos de gen se selecciona a continuación con anticuerpos de un único dominio de reacción cruzada purificados descritos en esta divulgación. El análisis de secuencia de los fragmentos de gen seleccionados se utiliza a continuación para definir el epítomo o epítomos de neutralización cruzada y se mapen contra las secuencias de HA disponibles en las bases de datos públicas para determinar el grado de conservación a través de los 16 subtipos de HA. Para obtener un mapeo de epítomos "más afinado", se utiliza la mutagénesis de barrido de alanina del fragmento del gen de HA expresado en fagos, seguido del cribado de la pérdida de unión de anticuerpo específico, al tiempo que preserva la expresión en fagos. A continuación, se expresa el fragmento de gen de la hemaglutinina mínimo que puede generar un producto correctamente plegado correspondiente al epítomo de anticuerpo de reacción cruzada y se purifica en un sistema de expresión de genes heterólogos o se sintetiza como un péptido usando procedimientos químicos establecidos. Este epítomo de HA recombinante se utiliza a continuación para inmunizar ratones BALB/c y para protegerlos de la estimulación letal con diferentes cepas virales, incluyendo los subtipos virales H5N1 y H1N1.

Alternativamente, los anticuerpos de reacción cruzada de la divulgación se pueden utilizar para aislar anticuerpos anti-idiotípicos que representan un mimético estructural del epítomo de reacción cruzada pertinente en hemaglutinina. Tales anticuerpos anti-idiotípicos cuando se utilizan como una vacuna provocan una respuesta inmunitaria que reacciona de forma cruzada con epítomos pertinentes de hemaglutinina viral. Una ventaja de usar los anticuerpos VHH de un único dominio que se describen en esta divulgación es que son estructuralmente mucho más simple que un anticuerpo convencional, que requiere la asociación estable tanto de un dominio VH como VL para formar el paratopo. A modo de ejemplo, se utiliza un anticuerpo de un único dominio de reacción cruzada (por ejemplo, R1a-B6) para inmunizar una alpaca como en el Ejemplo 1 y se construye una biblioteca de anticuerpos de expresión en fagos como en el Ejemplo 2. A continuación, la biblioteca se selecciona en el anticuerpo de reacción cruzada inicial utilizado para las inmunizaciones (Ejemplo 4). Los anticuerpos anti-idiotípicos se describen como los que se unen al anticuerpo de reacción cruzada (R1a-B6) utilizado para la inmunización y son negativos para otros anticuerpos que llevan diferentes secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 pero que tienen regiones estructurales similares.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Health Protection Agency

<120> Composiciones de anticuerpos contra el virus de la gripe

<130> P37063wo

<150> GB1115214.7

<151> 2011-09-02

<160> 133

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3

<400> 1

Ser Thr Thr Thr Pro Pro Tyr Glu Tyr
1 5

5	<210>	2	
	<211>	7	
	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia artificial	
10	<220>		
	<223>	CDR3	
	<400>	2	
15	Arg Arg Asp Trp Arg Asp Tyr		
	1	5	
20	<210>	3	
	<211>	7	
	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia artificial	
25	<220>		
	<223>	CDR3	
	<400>	3	
30	Asn Pro Pro Gly Asn Leu Tyr		
	1	5	
35	<210>	4	
	<211>	12	
	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia artificial	
40	<220>		
	<223>	CDR3	
	<400>	4	
45	Asp Pro Leu Ser Thr Gly Trp Gly Gln Tyr Ser Tyr		
	1	5	10
50	<210>	5	
	<211>	9	
	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia artificial	
55	<220>		
	<223>	CDR3	
	<400>	5	
60	Ser Thr Thr Thr Pro Pro His Glu Phe		
	1	5	
65	<210>	6	
	<211>	10	
	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	CDR3	
	<400>	6	

Arg Asp Gly Phe Phe Asn Arg Tyr Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CDR3

<400> 7

15 Ser Gly Pro Gly Gly Leu Asn Val
1 5

20 <210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> CDR3

<400> 8

30 Thr Arg Trp Val Pro Thr Met Lys Ala Asp Glu Tyr Asn Tyr
1 5 10

35 <210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> CDR3

<400> 9

45 Ala Ser Trp Val Ala Ser Leu Trp Ser Pro Ser Glu Tyr Asp Tyr
1 5 10 15

50 <210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> CDR3

<400> 10

60 Asp Pro Pro Gly Ile Leu Tyr
1 5

65 <210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR3

<400> 11
 Asp Pro Val Cys Thr Ala Gly Trp Tyr Arg Pro Ser Arg Phe Asp Leu
 1 5 10 15
 5
 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR3
 15 <400> 12
 Ser Thr Leu Thr Pro Pro His Glu Tyr
 1 5
 20
 <210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 13
 30 Gly Asn Thr Gly Ser Ser Asp Arg Ser Ser Ser Tyr Val His
 1 5 10
 35 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> CDR3
 <400> 14
 45 Lys Ser Pro Leu Val Asp Asn Glu Tyr
 1 5
 50 <210> 15
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> CDR3
 <400> 15
 60 Lys Gly Phe Ala Pro Phe Leu Ile Gly Cys Pro Trp Gly Lys Ala Glu
 1 5 10 15
 Tyr Asp Tyr
 65
 <210> 16
 <211> 15

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> CDR3

 <400> 16

 10 Thr Lys Ala Phe Gly Ile Ala Thr Ile Thr Ala Asp Tyr Glu Leu
 1 5 10 15

 <210> 17
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDR3
 20
 <400> 17

 Ser Ser Thr Val Ala Pro His Glu Tyr
 1 5
 25

 <210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDR3
 35 <400> 18

 Ser Gly Pro Gly Gly Val Glu Val
 1 5
 40
 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> CDR3

 <400> 19
 50
 Ser Gly Pro Gly Gly Val Ile Leu
 1 5

 55 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> CDR3

 <400> 20

 65 Lys Thr Ser Thr Thr Thr Pro Pro Tyr Glu Tyr
 1 5 10

5 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 21
 10 Asn Thr Arg Arg Asp Trp Arg Asp Tyr
 1 5
 15 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> CDR3
 <400> 22
 25 Asn Leu Asn Pro Pro Gly Asn Leu Tyr
 1 5
 30 <210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> CDR3
 <400> 23
 40 Asn Ala Asp Pro Leu Ser Thr Gly Trp Gly Gln Tyr Ser Tyr
 1 5 10
 45 <210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> CDR3
 <400> 24
 55 Lys Cys Ser Thr Thr Thr Pro Pro His Glu Phe
 1 5 10
 60 <210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR3
 65 <400> 25
 Asn Ala Arg Asp Gly Phe Phe Asn Arg Tyr Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> CDR3
 <400> 26
 Met Ala Ser Gly Pro Gly Gly Leu Asn Val
 1 5 10
 15
 20 <210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> CDR3
 <400> 27
 Ala Gly Thr Arg Trp Val Pro Thr Met Lys Ala Asp Glu Tyr Asn Tyr
 1 5 10 15
 30
 35 <210> 28
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> CDR3
 <400> 28
 Ala Ala Ala Ser Trp Val Ala Ser Leu Trp Ser Pro Ser Glu Tyr Asp
 1 5 10 15
 45 Tyr

 50 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> CDR3
 <400> 29
 Asn Leu Asp Pro Pro Gly Ile Leu Tyr
 1 5
 65
 <210> 30
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> CDR3
 <400> 30
 5 Ala Ala Asp Pro Val Cys Thr Ala Gly Trp Tyr Arg Pro Ser Arg Phe
 1 5 10 15
 Asp Leu
 10
 <210> 31
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR3
 20 <400> 31
 Lys Ile Ser Thr Leu Thr Pro Pro His Glu Tyr
 1 5 10
 25
 <210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR3
 35 <400> 32
 Gly Ala Gly Asn Thr Gly Ser Ser Asp Arg Ser Ser Ser Tyr Val His
 1 5 10 15
 40
 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 33
 50 His Ala Lys Ser Pro Leu Val Asp Asn Glu Tyr
 1 5 10
 55 <210> 34
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> CDR3
 <400> 34
 65 Ala Val Lys Gly Phe Ala Pro Phe Leu Ile Gly Cys Pro Trp Gly Lys
 1 5 10 15

Ala Glu Tyr Asp Tyr
20

5 <210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CDR3

<400> 35

15 Ala Ala Thr Lys Ala Phe Gly Ile Ala Thr Ile Thr Ala Asp Tyr Glu
1 5 10 15

20 Leu

<210> 36
<211> 11
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR3
30 <400> 36

Lys Phe Ser Ser Thr Val Ala Pro His Glu Tyr
1 5 10

<210> 37
<211> 10
40 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR3
45 <400> 37

Lys Ala Ser Gly Pro Gly Gly Val Glu Val
1 5 10

50 <210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> CDR3

<400> 38

60 Lys Ala Ser Gly Pro Gly Gly Val Ile Leu
1 5 10

65 <210> 39
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2
 5 <400> 39
 Val Ile Gly Asn Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Arg
 1 5 10 15
 10
 <210> 40
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 40
 20 Asp Ile Ala Ser Thr Arg Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 25 Gly
 30
 <210> 41
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 41
 40 Gly Ile Thr Tyr Asp Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 45
 <210> 42
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 42
 55 Ala Ile Thr Ser Gly Glu Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 60
 <210> 43
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 43
 Val Ile Gly Asn Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

5 <210> 44
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> CDR2
 <400> 44
 Ala val Thr Thr Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Tyr Ala Lys Gly
 1 5 10 15

 20 <210> 45
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> CDR2
 <400> 45
 Val Ile Gly Asn Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

 30 <210> 46
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> CDR2
 <400> 46
 40 Phe Ile Thr Ser Thr Ser Ala Val Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 45 Gly

 50 <210> 47
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> CDR2
 <400> 47
 60 Cys Arg Ala Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Leu Lys Gly
 1 5 10 15

 65 <210> 48
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 698 899 T3

<223> CDR2
 <400> 48
 5 Ser Ile Ala Tyr Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 49
 10 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> CDR2
 <400> 49
 20 Cys Ile Ser Pro Ser Asp Ser Phe Thr Glu Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 25
 <210> 50
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR2
 35 <400> 50
 Val Ile Gly Asn Asn Asp Asn Thr Val Tyr Gly Asp Ser Val Gln Gly
 1 5 10 15
 40
 <210> 51
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 51
 50 Ala Ile Asp Trp Gly Asp Gly Pro Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 55 Gly
 <210> 52
 60 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> CDR2
 <400> 52

Ser Ile Asp Gly Arg Gly Thr Pro Met Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

5 <210> 53
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CDR2
<400> 53

15 Cys Met Asn Ser Arg Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

20 Gly

25 <210> 54
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> CDR2
<400> 54

35 Ala Ile Thr Ala Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Ala
1 5 10 15

40 <210> 55
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> CDR2
<400> 55

50 Val Ile Gly Asn Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

55 <210> 56
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> CDR2
<400> 56

65 Val Ile Gly Asn Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

70 <210> 57
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2
 5 <400> 57
 Val Ile Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 10 <210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> CDR2
 <400> 58
 20 Ile Gly Asn Tyr Gly Asn Thr
 1 5
 25 <210> 59
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> CDR2
 <400> 59
 35 Ile Ala Ser Thr Arg Gly Thr Thr
 1 5
 40 <210> 60
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> CDR2
 <400> 60
 50 Ile Thr Tyr Asp Asp Ser Thr
 1 5
 55 <210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> CDR2
 <400> 61
 65 Ile Thr Ser Gly Glu Ser Thr
 1 5
 <210> 62
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> CDR2

 <400> 62

 10 Ile Gly Asn Tyr Gly Asn Thr
 1 5

 <210> 63
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDR2
 20 <400> 63

 Val Thr Thr Asp Gly Ser Thr
 1 5
 25

 <210> 64
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDR2
 35 <400> 64

 Ile Gly Asn Gly Gly Asn Thr
 1 5
 40
 <210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> CDR2

 <400> 65
 50
 Ile Thr Ser Thr Ser Ala Val Thr
 1 5

 55 <210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> CDR2

 <400> 66

 65 Arg Ala Ser Asp Gly Asn Thr
 1 5

	<210>	67
	<211>	7
	<212>	PRT
5	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	CDR2
	<400>	67
10	Ile Ala Tyr Asp Gly Ser Thr	
	1	5
	<210>	68
15	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
20	<223>	CDR2
	<400>	68
25	Ile Ser Pro Ser Asp Ser Phe Thr	
	1	5
	<210>	69
30	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
35	<223>	CDR2
	<400>	69
40	Ile Gly Asn Asn Asp Asn Thr	
	1	5
	<210>	70
45	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
50	<223>	CDR2
	<400>	70
55	Ile Asp Trp Gly Asp Gly Pro Thr	
	1	5
	<210>	71
60	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	CDR2
65	<400>	71
	Ile Asp Gly Arg Gly Thr Pro	
	1	5

5	<210>	72
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
10	<220>	
	<223>	CDR2
	<400>	72
15	Met Asn Ser Arg Asp Gly Thr Thr	
	1	5
20	<210>	73
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
25	<220>	
	<223>	CDR2
	<400>	73
30	Ile Thr Ala Gly Gly Asn Thr	
	1	5
35	<210>	74
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
40	<220>	
	<223>	CDR2
	<400>	74
45	Ile Gly Asn Tyr Gly Asn Thr	
	1	5
50	<210>	75
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
55	<220>	
	<223>	CDR2
	<400>	75
60	Ile Gly Asn Gly Gly Asn Thr	
	1	5
65	<210>	76
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	CDR2
	<400>	76

Ile Gly Asn Gly Gly Asn Thr
1 5

5 <210> 77
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CDR1

<400> 77

15 Ile Val Thr Met Gly
1 5

20 <210> 78
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> CDR1

<400> 78

30 Trp Tyr Asp Val Gly
1 5

35 <210> 79
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> CDR1

<400> 79

45 Arg Tyr Arg Met Gly
1 5

50 <210> 80
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> CDR1

<400> 80

60 Leu Tyr Thr Met Gly
1 5

65 <210> 81
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR1

<400> 81
 Ile Val Thr Met Gly
 1 5
 5
 <210> 82
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR1
 15 <400> 82
 Thr Tyr Pro Met Ser
 1 5
 20
 <210> 83
 <211> 5
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR1
 30 <400> 83
 Phe Tyr Thr Met Gly
 1 5
 35 <210> 84
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> CDR1
 <400> 84
 45 Asn Tyr Ala Ile Gly
 1 5
 50 <210> 85
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> CDR1
 <400> 85
 Gly Tyr Ala Ile Ala
 60 1 5
 <210> 86
 <211> 5
 65 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> CDR1
 <400> 86
 5 Arg Tyr Arg Met Gly
 1 5

 <210> 87
 10 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 15 <223> CDR1
 <400> 87
 Ala Tyr Ala Ile Ala
 20 1 5

 <210> 88
 <211> 5
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDR1
 30 <400> 88
 Ile Ile Thr Met Gly
 35 1 5

 <210> 89
 <211> 5
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDR1
 45 <400> 89
 Leu Tyr Arg Val Gly
 1 5

 50 <210> 90
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> CDR1
 <400> 90
 60 Met Tyr Met Ile Asp
 1 5

 65 <210> 91
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR1
 5 <400> 91
 Asn Asn Ala Ile Gly
 1 5
 10
 <210> 92
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 92
 20
 Ile Asn Ala Met Gly
 1 5
 25
 <210> 93
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 93
 35
 Ile Val Thr Met Gly
 1 5
 40
 <210> 94
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 94
 50
 Phe Tyr Thr Met Gly
 1 5
 55
 <210> 95
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 95
 65
 Phe Tyr Thr Met Gly
 1 5
 <210> 96
 <211> 8

```

    <212>  PRT
    <213>  Secuencia artificial

    <220>
5   <223>  CDR1

    <400>  96

10  Gly Ser Ile Ser Arg Ile Val Thr
    1      5

    <210>  97
    <211>  8
15  <212>  PRT
    <213>  Secuencia artificial

    <220>
    <223>  CDR1
20  <400>  97

    Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr Asp
    1      5

25  <210>  98
    <211>  8
    <212>  PRT
30  <213>  Secuencia artificial

    <220>
    <223>  CDR1
35  <400>  98

    Gly Ser Phe Phe Ser Arg Tyr Arg
    1      5

40  <210>  99
    <211>  8
    <212>  PRT
    <213>  Secuencia artificial
45  <220>
    <223>  CDR1

    <400>  99
50  Gly Ser Ala Phe Ser Leu Tyr Thr
    1      5

55  <210>  100
    <211>  8
    <212>  PRT
    <213>  Secuencia artificial

60  <220>
    <223>  CDR1

    <400>  100

65  Gly Ser Ile Ser Arg Ile Val Thr
    1      5

```

[illegible]

5	<210>	106
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
10	<220>	
	<223>	CDR1
	<400>	106
15	Gly Phe Thr Leu Gly Ala Tyr Ala	
	1	5
20	<210>	107
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
25	<220>	
	<223>	CDR1
	<400>	107
30	Gly Ser Met Ser Arg Ile Ile Thr	
	1	5
35	<210>	108
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
40	<220>	
	<223>	CDR1
	<400>	108
45	Val Leu Thr Phe Ser Leu Tyr Arg	
	1	5
50	<210>	109
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
55	<220>	
	<223>	CDR1
	<400>	109
60	Gly Asp Ile Phe Val Met Tyr Met	
	1	5
65	<210>	110
	<211>	8
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	CDR1
	<400>	110

Gly Ser Thr Leu Asn Asn Asn Ala
1 5

5 <210> 111
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CDR1

<400> 111

15 Gly Ser Ala Phe Ser Ile Asn Ala
1 5

20 <210> 112
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> CDR1

<400> 112

30 Gly Ser Ile Ser Ser Ile Val Thr
1 5

35 <210> 113
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> CDR1

<400> 113

45 Asp Asn Ile Phe Ser Phe Tyr Thr
1 5

50 <210> 114
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> CDR1

<400> 114

60 Thr Asn Ile Ala Ser Phe Tyr Thr
1 5

65 <210> 115
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VHH de longitud completa

ES 2 698 899 T3

<400> 115

5 Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ser Arg Ile Val
20 25 30
10 Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Ser Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
35 40 45
15 Ala Val Ile Gly Asn Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
20 Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Ala Tyr Leu
65 70 75 80
25 Gln Met Asn Gly Leu Asn Val Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Lys
85 90 95
30 Thr Ser Thr Thr Thr Pro Pro Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110
val Thr Val Ser Ser
115

35 <210> 116
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> VHH de longitud completa

<400> 116

45 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10
50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
20 25 30
55 Asp Val Gly Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
35 40 45
60 Ala Asp Ile Ala Ser Thr Arg Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
65 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Thr Arg Arg Asp Trp Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile Gln Val
100 105 110

5 Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 117
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> VHH de longitud completa
<400> 117

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

25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Phe Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

30 Arg Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

35 Ala Gly Ile Thr Tyr Asp Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Gly Ser Val Lys
50 55 60

40 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val His Leu
65 70 75 80

45 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

50 Leu Asn Pro Pro Gly Asn Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

55 Val Ser Ser
115

60 <210> 118
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> VHH de longitud completa
<400> 118

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

75 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Ser Ala Phe Ser Leu Tyr
20 25 30

ES 2 698 899 T3

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 5 Ala Ala Ile Thr Ser Gly Glu Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 10 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 15 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95
 20 Ala Asp Pro Leu Ser Thr Gly Trp Gly Gln Tyr Ser Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 25 Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 30 <210> 119
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ser Arg Ile Val
 20 25 30
 45 Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 50 Ala Val Ile Gly Asn Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 55 Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Ala Tyr Leu
 65 70 75 80
 60 Gln Met Asn Asn Leu Asn Val Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Lys
 85 90 95
 65 Cys Ser Thr Thr Thr Pro Pro His Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 val Thr val ser ser
 115
 65 <210> 120
 <211> 120

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> VHH de longitud completa

 <400> 120

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

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Ser Ala Val Leu Phe Ser
 15 20 25 30

 Thr Tyr Pro Met Ser Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu
 20 35 40 45

 Leu Val Ala Ala Val Thr Thr Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Tyr
 25 50 55 60

 Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val
 30 65 70 75 80

 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 35 85 90 95

 Cys Asn Ala Arg Asp Gly Phe Phe Asn Arg Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
 40 100 105 110

 Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 45 115 120

 <210> 121
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> VHH de longitud completa

 <400> 121

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

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asn Asp Ile Phe Ser Phe Tyr
 55 20 25 30

 Thr Met Gly Trp Tyr Leu Gln Ala Ile Gly Lys Gln Arg Glu Pro Val
 60 35 40 45

 Ala Val Ile Gly Asn Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Glu Ser Val Lys
 65 50 55 60

 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 65 70 75 80

ES 2 698 899 T3

5 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met
 85 90 95
 Ala Ser Gly Pro Gly Gly Leu Asn Val Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 100 105 110
 10 Thr Val Ser Ser
 115
 15 <210> 122
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> VHH de longitud completa
 <400> 122
 25 Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Asn Tyr
 20 25 30
 35 Ala Ile Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Glu Glu Arg Glu Gly Val
 35 35 40 45
 Ser Phe Ile Thr Ser Thr Ser Ala Val Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 40 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 45 Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 50 Ala Gly Thr Arg Trp Val Pro Thr Met Lys Ala Asp Glu Tyr Asn Tyr
 100 105 110
 55 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 60 <210> 123
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VHH de longitud completa
 65 <400> 123
 Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Val Gly Gly
 1 5 10 15

ES 2 698 899 T3

5 Ser Leu Arg Leu₂₀ Ser Cys Ala Ala Ser₂₅ Gly Phe Pro Phe Asp₃₀ Gly Tyr
 Ala Ile Ala₃₅ Trp Phe Arg Gln Ala₄₀ Pro Gly Lys Glu Arg₄₅ Glu Gly Val
 10 Ser Cys₅₀ Arg Ala Ser Asp₅₅ Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala₆₀ Glu Ser Leu Lys
 15 Gly Arg Leu Thr Met Ser₇₀ Thr Asp Asn Ala Lys₇₅ Asn Thr Val Tyr Leu₈₀
 20 Gln Met Asn Ser₈₅ Leu Lys Pro Glu Asp Thr₉₀ Ala Val Tyr Tyr Cys₉₅ Ala
 25 Ala Ala Ser Trp₁₀₀ Val Ala Ser Leu Trp₁₀₅ Ser Pro Ser Glu Tyr₁₁₀ Asp Tyr
 Trp Gly Gln₁₁₅ Gly Thr Gln Val Thr₁₂₀ Val Ser Ser
 30 <210> 124
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> VHH de longitud completa
 40 <400> 124
 Gln Val Gln Leu Val₅ Glu Ser Gly Gly Gly₁₀ Leu Val Gln Pro Gly₁₅ Gly
 45 Ser Leu Arg Leu₂₀ Ser Cys Ala Ala Ser₂₅ Gly Ser Phe Phe Ser₃₀ Arg Tyr
 50 Arg Met Gly₃₅ Trp Tyr Arg Gln Ala₄₀ Pro Gly Glu Gln Arg₄₅ Glu Leu Val
 55 Ala Ser Ile Ala Tyr Asp Gly₅₅ Ser Thr Ser Tyr Ala₆₀ Asp Pro Val Lys
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser₇₀ Arg Asp Asn Ala Asn₇₅ Thr Val His Leu Gln₈₀
 60 Met Tyr Ser Leu Lys₈₅ Pro Asp Asp Thr Ala₉₀ Val Tyr Tyr Cys Asn₉₅ Leu
 65 Asp Pro Pro Gly₁₀₀ Ile Leu Tyr Trp Gly₁₀₅ Gln Gly Thr Gln Val₁₁₀ Thr Val

Ser Ser

5 <210> 125
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> VHH de longitud completa
 <400> 125

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

20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Gly Ala Tyr
 20 25 30

25 Ala Ile Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45

30 Ser Cys Ile Ser Pro Ser Asp Ser Phe Thr Glu Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60

35 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

40 Leu Gln Met Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

45 Ala Ala Asp Pro Val Cys Thr Ala Gly Trp Tyr Arg Pro Ser Arg Phe
 100 105 110

50 Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

55 <210> 126
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> VHH de longitud completa
 <400> 126

65 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
 1 5 10 15

70 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Met Ser Arg Ile Ile
 20 25 30

75 Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Met Glu Arg Glu Leu Val
 35 40 45

ES 2 698 899 T3

Ala Val Ile Gly Asn Asn Asp Asn Thr Val Tyr Gly Asp Ser Val Gln
50 55 60

5 Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
65 70 75 80

10 Gln Met Asn Ser Leu Asn Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Lys
85 90 95

15 Ile Ser Thr Leu Thr Pro Pro His Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

20 <210> 127
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> VHH de longitud completa

30 <400> 127

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15

35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Val Leu Thr Phe Ser Leu Tyr
20 25 30

40 Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

45 Ala Ala Ile Asp Trp Gly Asp Gly Pro Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

50 Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

55 Gly Ala Gly Asn Thr Gly Ser Ser Asp Arg Ser Ser Ser Tyr Val His
100 105 110

60 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

65 <210> 128
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 698 899 T3

<223> VHH de longitud completa

<400> 128

5 Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Asp Ile Phe Val Met Tyr
20 25 30
15 Met Ile Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
20 Ala Ser Ile Asp Gly Arg Gly Thr Pro Met Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
25 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
30 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys His
85 90 95
35 Ala Lys Ser Pro Leu Val Asp Asn Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 129

<211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VHH de longitud completa

<400> 129

5 Gln Leu Gln Leu Ala Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Leu Asn Asn Asn
20 25 30
55 Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45
60 Ser Cys Met Asn Ser Arg Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
65 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Val Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

ES 2 698 899 T3

5 Ala Val Lys Gly Phe Ala Pro Phe Leu Ile Gly Cys Pro Trp Gly Lys
 100 105 110
 10 Ala Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 15 <210> 130
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> VHH de longitud completa
 <400> 130
 25 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ala Phe Ser Ile Asn
 20 25 30
 35 Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Glu Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 40 Ala Ala Ile Thr Ala Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 45 Ala Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 50 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 55 Ala Thr Lys Ala Phe Gly Ile Ala Thr Ile Thr Ala Asp Tyr Glu Leu
 100 105 110
 60 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 65 <210> 131
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VHH de longitud completa
 <400> 131
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Ser Ile Ser Ser Ile Val
 20 25 30

ES 2 698 899 T3

5 Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 10 Ala Val Ile Gly Asn Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 15 Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 20 Gln Met Asn Ser Leu Asn Val Glu Asp Thr Ala Met Tyr Val Cys Lys
 85 90 95
 25 Phe Ser Ser Thr Val Ala Pro His Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 30 <210> 132
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VHH de longitud completa
 35 <400> 132
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asp Asn Ile Phe Ser Phe Tyr
 20 25 30
 45 Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ser Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 50 Ala Val Ile Gly Asn Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 55 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Lys Ala His Leu
 65 70 75 80
 60 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys
 85 90 95
 65 Ala Ser Gly Pro Gly Gly Val Glu Val Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 100 105 110
 70 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 133
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> VHH de longitud completa
 <400> 133
 10 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Thr Asn Ile Ala Ser Phe Tyr
 20 25 30
 20 Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Gln Gln Arg Asp Val Val
 35 40 45
 25 Ala Val Ile Gly Asn Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asn Thr Ala His Leu
 65 70 75 80
 30 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Asp Val Tyr Tyr Cys Lys
 85 90 95
 35 Ala Ser Gly Pro Gly Gly Val Ile Leu Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 100 105 110
 40 Thr Val Ser Ser
 115

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo de un único dominio que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124, y que se une al virus de la gripe H1N1.
2. Anticuerpo, según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo demuestra reactividad cruzada antigénica a:
 - (a) subtipos del virus de la gripe H1 y H5;
 - (b) subtipos del virus de la gripe H2 y H9; y/o
 - (c) uno o todos de subtipos del virus de la gripe H2, H5, H6, H9, H11, H13, H16, H8 y H12.
3. Anticuerpo que comprende o consiste en dos o tres o cuatro o más anticuerpos de un único dominio, tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
4. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo demuestra actividad neutralizante contra:
 - (a) un virus de la gripe H1 (por ejemplo, H1N1), por ejemplo contra la cepa A/California/06/09 y/o A/California/7/2009 y/o A/Brisbane/59/2007;
 - (b) un virus de la gripe H5 (por ejemplo, H5N1 o H5N3), por ejemplo contra la cepa A/Vietnam/1203/2004 y/o A/Vietnam/1194/04 y/o A/Vietnam/119/2004 y/o Hong Kong/213/2003 y/o A/pavo/Turquía/1/2005 y/o A/Indonesia/05/2005 y/o A/Pato/Singapur-Q/119-3/97;
 - (c) un virus de la gripe H2 (por ejemplo, H2N2 o H2N3), por ejemplo contra la cepa A/Japón/305/1957 y/o A/ánade/Eng/727/06; y/o
 - (d) un virus de la gripe H9 (por ejemplo, H9N2), por ejemplo contra la cepa A/Hong Kong/1073/99.
5. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo demuestra actividad neutralizante contra uno, o más, o todos los virus de la gripe de grupo I con hemaglutinina seleccionados del grupo que consiste en los virus de la gripe H1, H2, H5, H6, H11, H13, H16, H9, H8 y/o H12.
6. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para usar en la prevención o el tratamiento de la infección por el virus gripe.
7. Utilización de un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, como reactivo para detectar la presencia de un subtipo del virus de la gripe seleccionado entre:
 - (a) subtipos H1 y H5; o
 - (b) subtipos H1 y H5 y H2 y H9; o
 - (c) subtipos H1 y H5 y H6 y H11 y H13 y H16 y H8 y H12; o
 - (d) un subtipo del virus de gripe del grupo I con hemaglutinina; opara confirmar la ausencia de un subtipo del virus de la gripe seleccionado entre:
 - (a) subtipos H3 y H7;
 - (b) un subtipo del virus de la gripe del grupo II con hemaglutinina.
8. Utilización de un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, como reactivo:
 - (a) en un ensayo *in vitro* para evaluar la potencia de una vacuna contra el virus de la gripe;
 - (b) en un ensayo para evaluar la reactividad cruzada de una vacuna contra el virus de la gripe contra diferentes tipos y/o subtipos del virus de la gripe;
 - (c) para concentrar y/o cuantificar la cantidad de hemaglutinina presente en una muestra;
 - (d) para aislar anticuerpos anti-idiotípicos contra hemaglutinina; o
 - (e) *in vitro* para diseñar una vacuna contra la gripe universal.

Figura 1a

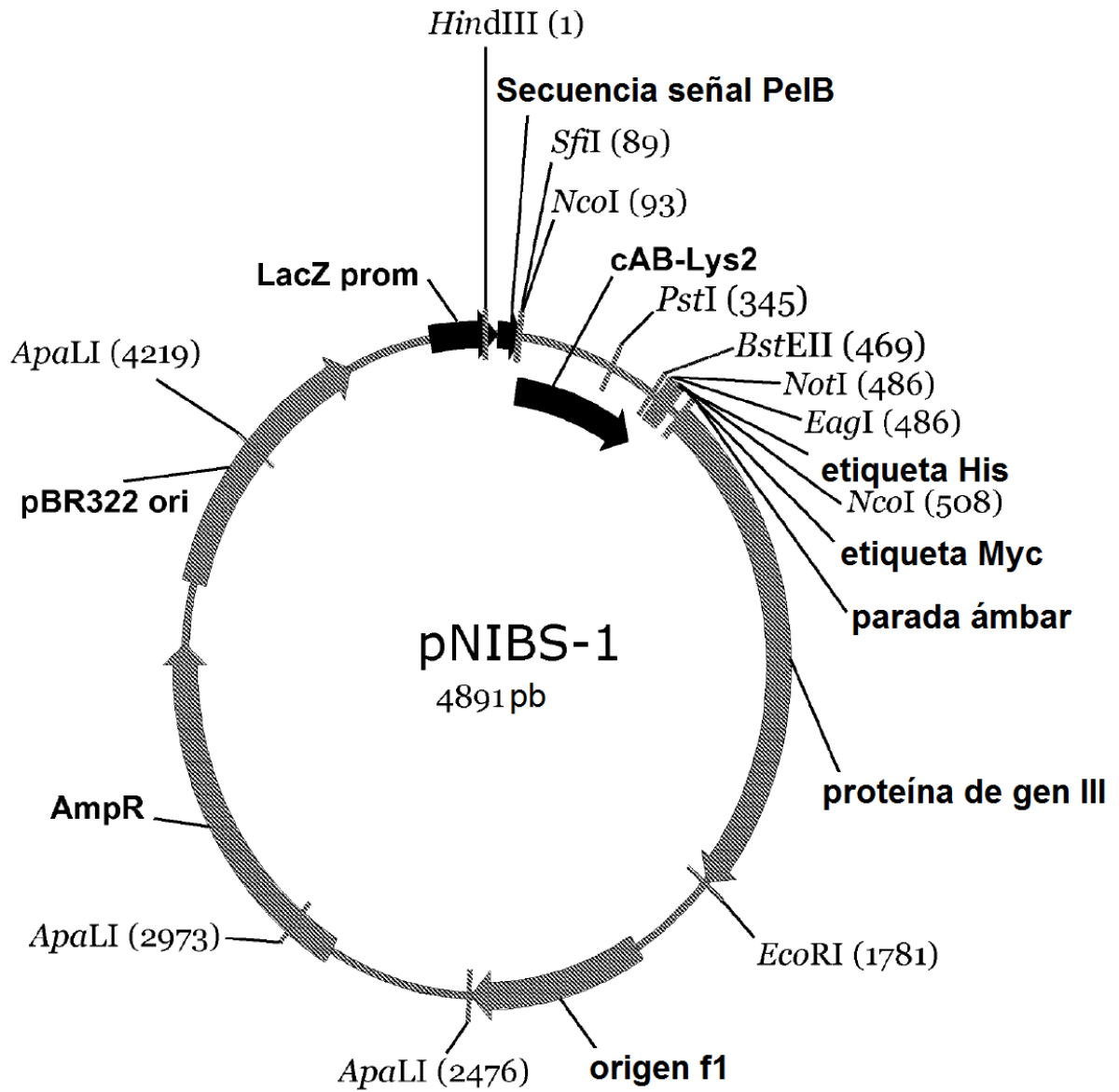


Figura 1b

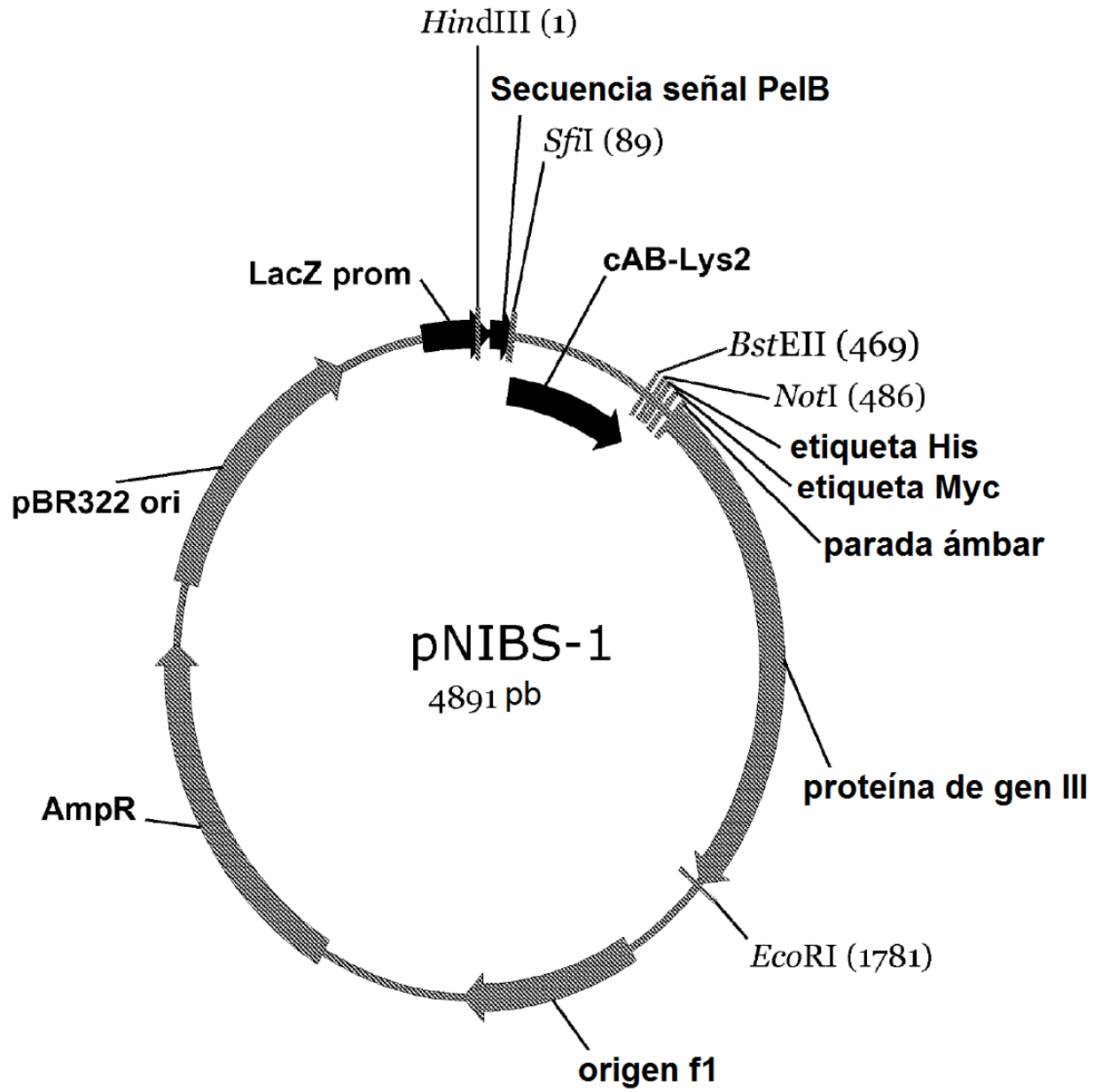


Figura 3

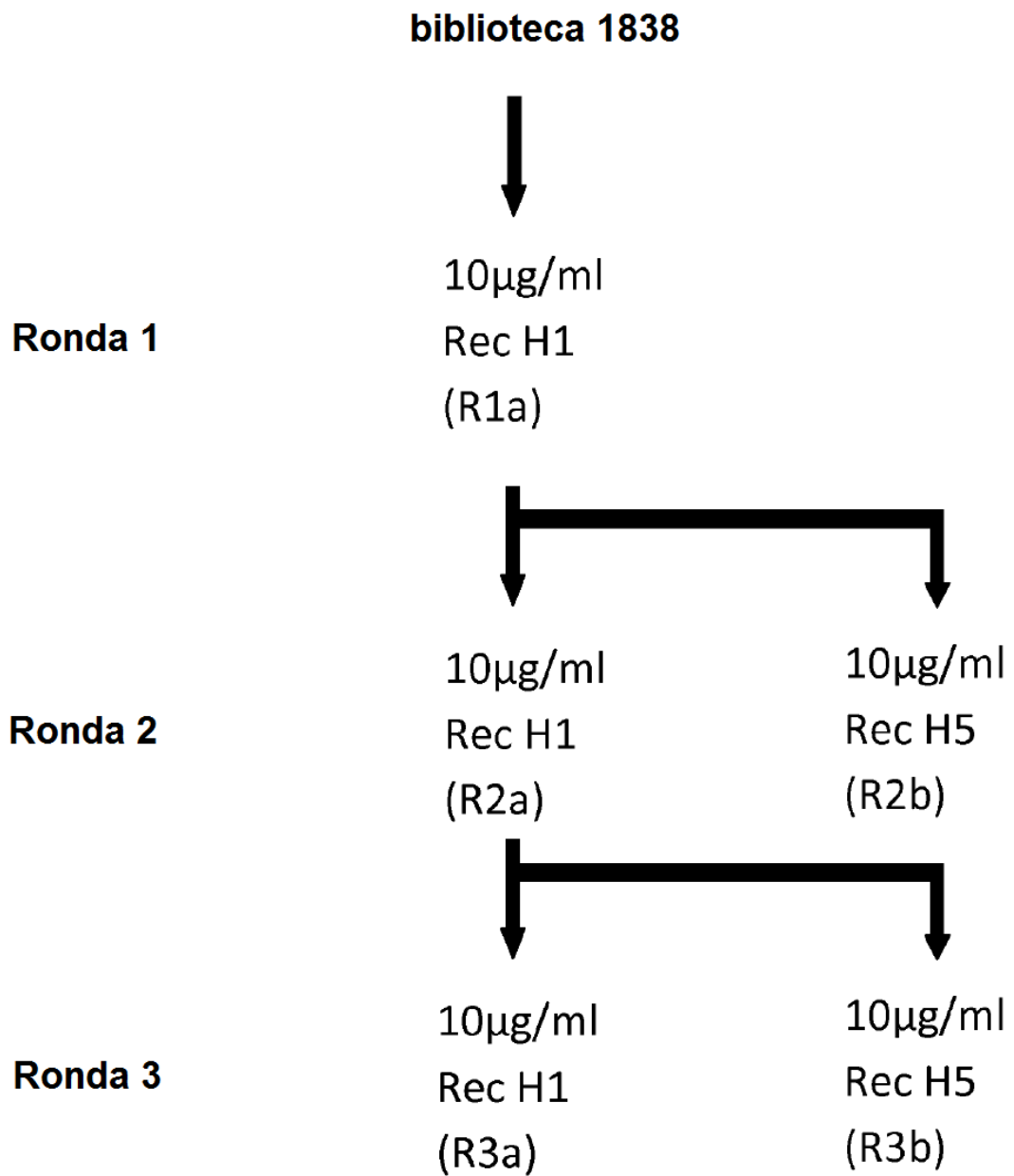


Figura 3--parte 1

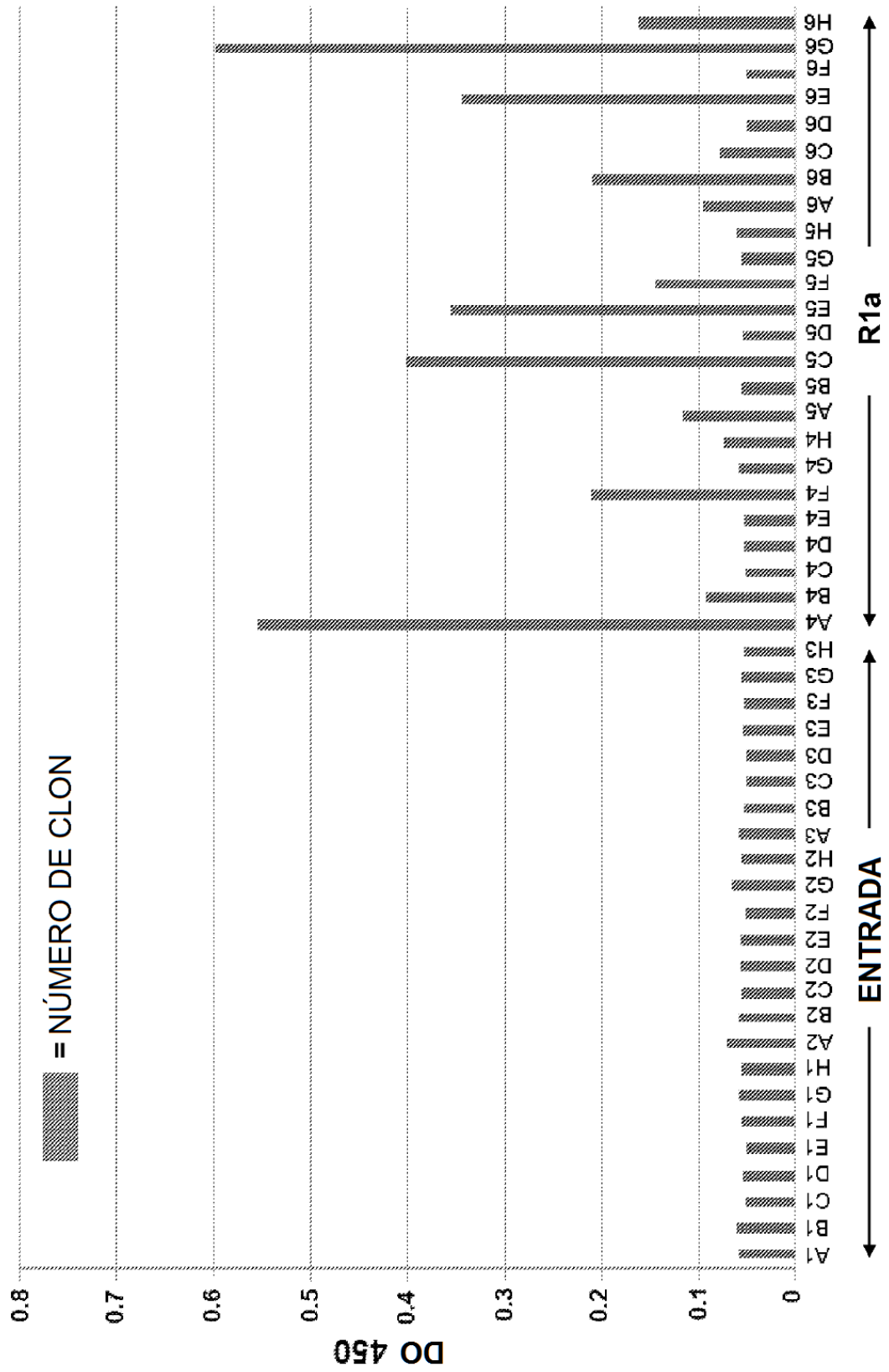


Figura 3 - parte 2

