(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 701 746**

(51) Int. CI.:

A61K 39/42 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2013 PCT/US2013/069567**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14078268**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2013 E 13854201 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2919813**

(54) Título: **Anticuerpos antihemaglutinina y procedimientos de uso**

(30) Prioridad:

13.11.2012 US 201261725859 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2019

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es:

XU, MIN;
BALAZS, MERCEDESZ;
CHAI, NING;
CHIANG, NANCY;
CHIU, HENRY;
JIN, ZHAOYU;
LIN, ZHONGHUA;
LUPARDUS, PATRICK, J.;
NAKAMURA, GERALD, R.;
PARK, HYUNJOO y
SWEM, LEE, R.

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos antihemaglutinina y procedimientos de uso

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona anticuerpos antihemaglutinina, composiciones que comprenden anticuerpos antihemaglutinina y procedimientos de uso de los mismos.

ANTECEDENTES

La infección por el virus de la gripe provoca entre tres y cinco millones de casos de enfermedades graves y entre 250.000 y 500.000 fallecimientos cada año en todo el mundo. Solo en los Estados Unidos, de un 5 % a un 20 % de la población se infecta con el virus de la gripe cada año, provocadas la mayoría de estas infecciones por el virus de la gripe A. (Véase, por ejemplo, Dushoff *et al.*, (2006) Am J Epidemiology 163:181-187; Thompson *et al.*, (2004) JAMA 292:1333-1340; Thompson *et al.*, (2003) JAMA 289:179-186). Aproximadamente 200.000 personas en los Estados Unidos se hospitalizan con complicaciones relacionadas con la gripe cada año, lo que da como resultado de 7.000 a 30.000 fallecimientos anuales. La carga asociada con la infección por el virus de la gripe en los costes asistenciales y la pérdida de productividad es extensa. La hospitalización y los fallecimientos se producen principalmente en grupos de alto riesgo, tales como los ancianos, los niños y los enfermos crónicos.

Los virus de la gripe son virus de ARN de hebra negativa con envoltura de membrana segmentados que pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. El virus de la gripe A consiste en 9 proteínas estructurales y 1 proteína no estructural, que incluye tres proteínas de superficie del virus: hemaglutinina (HA o H), neuraminidasa (NA o N) y proteína de la matriz 2 (M2). La naturaleza segmentada del genoma vírico de la gripe permite que el mecanismo de reagrupamiento genético (es decir, el intercambio de segmentos del genoma) tenga lugar durante la infección mixta de una célula con diferentes cepas víricas de la gripe. Se producen epidemias anuales de gripe cuando se alteran las propiedades antigénicas de las proteínas de superficie vírica hemaglutinina y neuraminidasa. El mecanismo de la antigenicidad alterada es doble: variaciones antigénicas mayores, provocadas por el reordenamiento genético entre virus humanos y animales después de la infección simultánea de células huésped con al menos dos subtipos víricos, que pueden provocar una pandemia; y variaciones antigénicas menores, provocadas por pequeños cambios en las proteínas hemaglutinina y neuraminidasa en la superficie del virus, que pueden provocar epidemias de gripe.

Los virus de la gripe A se pueden clasificar además en diversos subtipos dependiendo de las diferentes proteínas víricas hemaglutinina y neuraminidasa presentadas en su superficie. Cada subtipo del virus de la gripe A se identifica por la combinación de sus proteínas hemaglutinina y neuraminidasa. Existen 16 subtipos de HA (H1 - H16) conocidos y 9 subtipos de NA (N1 - N9) conocidos. Los 16 subtipos de hemaglutinina se clasifican además en dos grupos filogénicos: El grupo 1 incluye los subtipos de hemaglutinina H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 y H16; el grupo 2 incluye los subtipos de hemaglutinina H3, H4, H7, H10, H14 y H15.

La hemaglutinina promueve la unión vírica y la entrada en la célula huésped; la neuraminidasa se requiere para la gemación vírica de la célula infectada. La hemaglutinina del virus de la gripe A comprende dos regiones estructuralmente distintas, una región de cabeza globular y una región de tallo o pedículo. La región de cabeza globular contiene un sitio de unión al receptor que es responsable de la unión del virus a una célula diana. La región del tallo (o pedículo) de la hemaglutinina contiene un péptido de fusión que es necesario para la fusión de membrana entre la envoltura vírica y una membrana endosómica de la célula infectada. (Véase, por ejemplo, Bouvier y Palese (2008) Vaccine 26 Suppl 4: D49-53; Wiley *et al.*, (1987) Ann Rev Biochem 556:365-394).

El tratamiento actual para la infección por el virus de la gripe incluye inhibidores de la neuraminidasa, tales como oseltamivir y zanamivir. Oseltamivir es una opción de tratamiento terapéutico temprano y profiláctico ampliamente usados para la infección por el virus de la gripe A. (Véase, por ejemplo, Kandel y Hartshorn (2001) BioDrugs: Clinical Immunotherapy, Biopharmaceuticals and Gene Therapy 15:303-323; Nicholson *et al.*, (2000) Lancet 355:1845-1850; Treanor *et al.*, (2000) JAMA 283:1016-1024; y Welliver *et al.*, (2001) JAMA 285:748-754). Sin embargo, el tratamiento con oseltamivir debe comenzar en un plazo de 48 horas de la aparición de los síntomas para proporcionar un beneficio clínico significativo. (Véase, por ejemplo, Aoki *et al*. (2003) J Antimicrobial Chemotherapy 51:123-129). Esta obligación compromete la capacidad de oseltamivir para tratar a pacientes gravemente enfermos, que típicamente se encuentran más allá del margen de tratamiento óptimo de 48 horas en el momento de buscar tratamiento. Por lo tanto, recientemente se ha puesto un énfasis significativo en la identificación de medicamentos para el virus de la gripe para tratar a pacientes infectados por el virus de la gripe hospitalizados. Una estrategia se ha centrado en el desarrollo de anticuerpos monoclonales (mAb) humanos que se dirigen a un epítopo altamente conservado en el tallo de la hemaglutinina del virus de la gripe A. (Véase, por ejemplo, Corti *et al*., (2011) Science 333:850-856; Ekiert *et al.*, (2009) Science 324:246-251; Ekiert *et al.*, (2011) Science 333:843-850; Sui *et al.*, (2009) Nature Structural & Molecular Biology 16:265-273; Dreyfus *et al.*, (2012) Science 337:1343-1348; Wu *et al.*, (2012) J Virology 2012.09.034; Clementi *et al.*, (2011) PLoS One 6:1-10. Véanse también las publicaciones de solicitud de patente internacional n.^{os}: WO2009/115972, WO2011/117848, WO2008/110937, WO2010/010466, WO2008/028946, WO2010/130636, WO2012/021786, WO2010/073647, WO2011/160083, WO2011/111966, WO2002/46235 y

WO2009/053604; las patentes de EE. UU. n.os 5.631.350 y 5.589.174).

Varios informes han descrito anticuerpos monoclonales (mAb) que se unen a la hemaglutinina y neutralizan ampliamente el virus de la gripe A. Por ejemplo, Corti *et al.* (*supra*) describieron el anticuerpo FI6v3, que se clonó a partir de una célula de plasma humano y se demostró que neutraliza los virus de la gripe A humanos que pertenecen a los subtipos de hemaglutinina tanto del grupo 1 como del grupo 2. El mAb FI6v3 se descubrió como resultado de un esfuerzo heroico de analizar aproximadamente 104.000 células de plasma humano. Adicionalmente, Dreyfus *et al.* (*supra*) describieron recientemente la identificación del anticuerpo CR9114 por selección negativa de presentación en fagos; se demostró que el anticuerpo CR9114 se une a un epítopo del tallo altamente conservado compartido entre la hemaglutinina del virus de la gripe A y del virus de la gripe B. Además, el documento US2011/274702 divulga anticuerpos que neutralizan el virus de la gripe A de los subtipos del grupo 1 y 2.

A pesar de estos informes, todavía existe una necesidad en la técnica de tratamientos novedosos para el virus de la gripe A eficaces frente a los subtipos del virus de la gripe A del grupo 1 y grupo 2. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona otros beneficios para el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona anticuerpos antihemaglutinina, composiciones que comprenden anticuerpos antihemaglutinina y usos de los mismos. La materia objeto de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

El anticuerpo antihemaglutinina aislado de la presente invención comprende tres regiones hipervariables de la cadena pesada (HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3) y tres regiones hipervariables de la cadena ligera (HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3), en el que:

(a) HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 191;

(b) HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 193;

(c) HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 194;

(d) HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 195;

(e) HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 196; y

(f) HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 197.

En algunos modos de realización, un anticuerpo antihemaglutinina aislado de la presente invención comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 234, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 235.

En algunos modos de realización, un anticuerpo antihemaglutinina aislado de la presente invención comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 235.

En algunos modos de realización, un anticuerpo antihemaglutinina aislado de la presente invención comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 234.

En algunos modos de realización, un anticuerpo antihemaglutinina aislado de la presente invención comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139.

En algunos modos de realización, un anticuerpo antihemaglutinina aislado de la presente invención comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139.

En algunos modos de realización, un anticuerpo antihemaglutinina aislado de la presente invención comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147.

La invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención. La invención también proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico que codifica un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención. La invención también proporciona células huésped que comprenden un ácido nucleico o un vector de la presente invención. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, un vector recombinante, tal como un vector de expresión. Se puede usar cualquiera de una variedad de células huésped. En un modo de realización, una célula huésped es una célula procariota, por ejemplo, *E. coli*. En otro modo de realización, una célula huésped es una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO).

La invención proporciona además un procedimiento de producción de un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención. Por ejemplo, la invención proporciona procedimientos para preparar un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención (que, como se define en el presente documento, incluye un anticuerpo de longitud completa y fragmentos del mismo), comprendiendo el procedimiento expresar en una célula huésped adecuada un vector recombinante de la invención que codifica el anticuerpo antihemaglutinina o fragmentos del mismo para que se produzcan el anticuerpo o fragmentos del mismo. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención (o fragmentos del mismo) para que se exprese el ácido nucleico. El procedimiento puede comprender además recuperar el anticuerpo antihemaglutinina o fragmentos del mismo del cultivo de la célula huésped o del medio de cultivo de la célula huésped.

La invención también proporciona una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La formulación farmacéutica puede comprender además un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un inhibidor de la neuraminidasa, tal como oseltamivir o zanamivir; otro anticuerpo, tal como otro anticuerpo antihemaglutinina o un anticuerpo anti-M2; etc.).

La invención también proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención. La composición puede comprender además un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un inhibidor de la neuraminidasa, tal como oseltamivir o zanamivir; otro anticuerpo, tal como otro anticuerpo antihemaglutinina o un anticuerpo anti-M2; etc.).

La invención también proporciona una composición que comprende un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención para su uso en la prevención de la infección por el virus de la gripe A. En algunos modos de realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención para su uso en la prevención de la infección por el virus de la gripe A. La invención proporciona además una composición que comprende un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención para su uso en el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A. En algunos modos de realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención para su uso en el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A. La invención proporciona además una composición que comprende un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención para su uso en la inhibición de la infección por el virus de la gripe A. En algunos modos de realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención para su uso en la inhibición de la infección por el virus de la gripe A.

Las composiciones que comprenden un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención también se pueden usar en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para su uso en la inhibición, el tratamiento o la prevención de la infección por el virus de la gripe A. En determinados modos de realización, el medicamento puede comprender además un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un inhibidor de la neuraminidasa, tal como oseltamivir o zanamivir; otro anticuerpo, tal como otro anticuerpo antihemaglutinina o un anticuerpo anti-M2; etc.).

La invención también proporciona un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención para su uso en un procedimiento para inhibir la infección por el virus de la gripe A, comprendiendo el procedimiento administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención, inhibiendo, de este modo, la infección por el virus de la gripe A. La invención también proporciona un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención para su uso en un procedimiento para tratar la infección por el virus de la gripe A, comprendiendo el procedimiento administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención, tratando, de este modo, la infección por el virus de la gripe A. La invención también proporciona un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención para su uso en un procedimiento para prevenir la infección por el virus de la gripe A, comprendiendo el procedimiento administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención, previniendo, de este modo, la infección por el virus de la gripe A.

La invención también proporciona una composición que comprende un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención para su uso en un procedimiento para inhibir, tratar o prevenir la infección por el virus de la gripe A, comprendiendo el procedimiento administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención, y administrar al paciente una cantidad eficaz de un agente terapéutico adicional, inhibiendo, tratando o previniendo, de este modo, la infección por el virus de la gripe A. En algunos modos de realización, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de la neuraminidasa, tal como oseltamivir o zanamivir. En otros modos de realización, el agente terapéutico adicional es otro anticuerpo antihemaglutinina. Aún en otros modos de realización, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-M2. En diversos aspectos de dichos tratamientos de combinación, los agentes terapéuticos se administran aproximadamente al mismo tiempo, se administran conjuntamente o se administran de forma secuencial o consecutiva. En modos de realización particulares, se administra un inhibidor antineuraminidasa antes de la administración de un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención.

También se divulga el uso de un vector de expresión de la invención en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para su uso en la inhibición, el tratamiento o la prevención de la infección por el virus de la gripe A. En determinados aspectos de la divulgación, el medicamento puede comprender además un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un inhibidor de la neuraminidasa, tal como oseltamivir o zanamivir; otro anticuerpo, tal como otro anticuerpo antihemaglutinina o un anticuerpo anti-M2; etc.).

También se divulga el uso de una célula huésped de la invención en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para su uso en la inhibición, el tratamiento o la prevención de la infección por el virus de la gripe A. En determinados aspectos de la divulgación, el medicamento puede comprender además un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un inhibidor de la neuraminidasa, tal como oseltamivir o zanamivir; otro anticuerpo, tal como otro anticuerpo antihemaglutinina o un anticuerpo anti-M2; etc.).

También se divulga el uso de un artículo de fabricación de la invención en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para su uso en la inhibición, el tratamiento o la prevención de la infección por el virus de la gripe A. En determinados aspectos de la divulgación, el medicamento puede comprender además un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un inhibidor de la neuraminidasa, tal como oseltamivir o zanamivir; otro anticuerpo, tal como otro anticuerpo antihemaglutinina o un anticuerpo anti-M2; etc.).

También se divulga el uso de un kit de la invención en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para su uso en la inhibición, el tratamiento o la prevención de la infección por el virus de la gripe A. En determinados aspectos de la divulgación, el medicamento puede comprender además un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un inhibidor de la neuraminidasa, tal como oseltamivir o zanamivir; otro anticuerpo, tal como otro anticuerpo antihemaglutinina o un anticuerpo anti-M2; etc.).

En diversos aspectos, un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención se une a hemaglutinina. En algunos aspectos, un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención se une a hemaglutinina del grupo 1 y grupo 2. En otros aspectos, un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención se une a hemaglutinina y neutraliza el virus de la gripe A. En algunos modos de realización, un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención neutraliza el virus de la gripe A *in vitro*, *in vivo* o *in vitro* e *in vivo.*

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figuras 1A y 1B exponen los datos que muestran el análisis FACS de plasmoblastos positivos para antihemaglutinina (hemaglutinina H3+ y hemaglutinina H1+) de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas el día 7 posteriormente a la vacunación antes del enriquecimiento del ratón SCID/beige (figura 1A) y el día 8 posteriormente a la implantación intraesplénica después del enriquecimiento del ratón SCID/beige con y sin premezcla de antígeno (figura 1B) en los paneles superior e inferior, respectivamente.

La figura 2 expone los datos que muestran el análisis de esplenocitos obtenidos el día 8 posteriormente a la implantación intraesplénica de PBMC de ratones SCID/beige individuales sin premezcla de PBMC/antígeno (círculos) y con premezcla de PBMC/antígeno (cuadrados), como porcentaje de plasmoblastos con hemaglutinina $(H1)^{+}/CD38^{alto}$. El rectángulo indica ratones que presentaron plasmoblastos con hemaglutinina $H1^{+}$.

La figura 3 expone los datos que muestran la neutralización *in vitro* de diversas cepas del virus del grupo 1 y grupo 2 de la gripe A por anticuerpos antihemaglutinina.

Las figuras 4A y 4B exponen los datos que muestran la neutralización *in vitro* de diversas cepas del virus del grupo 1 (figura 4A) y grupo 2 (figura 4B) de la gripe A por el anticuerpo monoclonal 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177).

Las figuras 5A y 5B exponen los datos que muestran la neutralización *in vitro* de diversas cepas del virus del grupo 1 (figura 5A) y grupo 2 (figura 5B) de la gripe A por el anticuerpo monoclonal 81.39 SVSH-NYP ("SVSH" divulgado como SEQ ID NO: 171).

La figura 6 expone los datos que muestran la neutralización *in vitro* de diversas cepas del virus del grupo 1 de la gripe A por el anticuerpo monoclonal 39.18 B11.

La figura 7 expone los datos que muestran la neutralización *in vitro* de diversas cepas del virus del grupo 1 y grupo 2 de la gripe A por el anticuerpo monoclonal 36.89.

La figura 8 expone los datos que muestran la neutralización *in vitro* de diversas cepas del virus del grupo 1 y grupo 2 de la gripe A por el anticuerpo monoclonal mAb9 01F3.

La figura 9 expone los datos que muestran la neutralización *in vitro* de diversas cepas del virus del grupo 1 y grupo 2 de la gripe A por el anticuerpo monoclonal mAb23 06C2.

La figura 10 expone los datos que muestran la neutralización *in vitro* de un seudovirus que expresa hemaglutinina H5 por el anticuerpo monoclonal 39.29 NCv1.

La figura 11 expone los datos que muestran la neutralización *in vitro* de un virus de la gripe equina H7N7 por el anticuerpo monoclonal 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177).

Las figuras 12A, 12B, 12C y 12D exponen los datos que muestran el porcentaje de supervivencia de ratones infectados con diversas cepas del virus de la gripe A (A/PR/8/1934 (PR8), figura 12A; A/Port Chalmers/1/1973 (PC73), figura 12B; A/Hong Kong/1/1968 (HK68), figura 12C); y A/Aichi/2/1968 (Aichi68), figura 12D) y a los que se administraron diversas cantidades de anticuerpo monoclonal 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177).

La figura 13 expone los datos que muestran el porcentaje de supervivencia de ratones infectados con el virus de la gripe A A/PR/8/1934 y a los que se administraron diversas cantidades de anticuerpo monoclonal 39.29 NCv1.

La figura 14 expone los datos que muestran el porcentaje de supervivencia de ratones infectados con el virus de la gripe A A/Hong Kong/1/1968 (un virus de la gripe A que tiene una alta CI50) y a los que se administraron diversas cantidades de anticuerpo monoclonal 39.29 NCv1.

La figura 15 expone los datos que muestran el porcentaje de supervivencia de ratones infectados con el virus de la gripe A A/Port Chalmers/1/1973 y a los que se administraron diversas cantidades de anticuerpo monoclonal 39.29 NCv1.

La figura 16 expone los datos que muestran el porcentaje de supervivencia de ratones infectados con el virus de la gripe A A/Aichi/2/1968 y a los que se administraron diversas cantidades de anticuerpo monoclonal 39.29 NCv1.

La figura 17 expone los datos que comparan el porcentaje de supervivencia de ratones infectados con la cepa del virus de la gripe A A/PR/8/1934 y a los que se administró una mezcla 50:50 de anticuerpo monoclonal 39.29 D8C2 y anticuerpo monoclonal 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) u oseltamivir (Tamiflu®).

La figura 18 expone los datos que muestran la comparación del porcentaje de supervivencia de ratones infectados con la cepa del virus de la gripe A A/PR/8/1934 y a los que se administró el anticuerpo monoclonal 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177), oseltamivir (Tamiflu®), o una combinación de anticuerpo monoclonal 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) y oseltamivir.

Las figuras 19A y 19B exponen los datos que comparan el porcentaje de supervivencia de hurones infectados con la cepa del virus de la gripe A A/Vietnam/1203/04 (H5N1) y a los que se administró el anticuerpo monoclonal 39.29 D8C2 (figura 19A), el anticuerpo monoclonal 81.39 B1C1 (figura 19B) u oseltamivir (Tamiflu®) a las 48 horas o 72 horas posteriores a la infección.

La figura 20 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos de hemaglutinina de la hemaglutinina H1, H2, H3, H5 y H7, que muestra los residuos de contacto de hemaglutinina (sombreados) del anticuerpo monoclonal 39.29NCv1 y el epítopo de unión a la hemaglutinina.

Las figuras 21A y 21B exponen los datos de experimentos de ELISA de competición de diversos anticuerpos monoclonales que compiten por la unión del anticuerpo monoclonal 39.29 marcado con biotina a la hemaglutinina H1 de A/NWS/1933 (figura 21A) y la hemaglutinina H3 de A/HK/8/1968 (figura 21B).

Las figuras 22A y 22B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 81.39 B1C1 (SEQ ID NO: 113 y 111, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 237, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 23A y 23B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 81.39 SVSH-NYP ("SVSH" divulgado como SEQ ID NO: 171) (SEQ ID NO: 117 y 115, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 237, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 24A y 24B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 81.39 B1F1 (SEQ ID NO: 119 y 111, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe

germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 237, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 25A y 25B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 81.39 SVDS ("SVDS" divulgado como SEQ ID NO: 172) (SEQ ID NO: 113 y 115, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 237, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 26A y 26B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 81.39 SVSS ("SVSS" divulgado como SEQ ID NO: 173) (SEQ ID NO: 122 y 115, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 237, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 27A y 27B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 81.39 SVDH ("SVDH" divulgado como SEQ ID NO: 174) (SEQ ID NO: 124 y 115, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 237, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 28A y 28B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del mAb 81.39 SVSH ("SVSH" divulgado como SEQ ID NO: 171) (SEQ ID NO: 126 y 115, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 237, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 29A y 29B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 81.39 SVSH.NFP ("SVSH" divulgado como SEQ ID NO: 171) (SEQ ID NO: 128 y 115, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 237, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 30A y 30B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 81.39 SVDS.F ("SVDS" divulgado como SEQ ID NO: 172) (SEQ ID NO: 130 y 115, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 237, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 31A y 31B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 81.39 SVDS.Y ("SVDS" divulgado como SEQ ID NO: 172) (SEQ ID NO: 132 y 115, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 237, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 32A y 32B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 39.29 D2C4 (SEQ ID NO: 136 y 134, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 245, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 33A y 33B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 39.29 D8C2 (SEQ ID NO: 140 y 138, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 245, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 34A y 34B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 39.29 NCv1 (SEQ ID NO: 144 y 142, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 245, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 35A y 35B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 39.29 D8E7 (SEQ ID NO: 146 y 138, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 245, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 36A y 36B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 39.29 NFPP ("NFPP" divulgado como SEQ ID NO: 175) (SEQ ID NO: 150 y 148, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 245, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 37A y 37B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 39.29 NYPP ("NYPP" divulgado como SEQ ID NO: 176) (SEQ ID NO: 152 y 148, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 245, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 38A y 38B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) (SEQ ID NO: 235 y 234, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-30*01 (IGHV3-30*01) (SEQ ID NO: 236 y 245, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 39A y 39B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 39.18 B11 (SEQ ID NO: 156 y 154, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 1-69*01 (IGHV1-69*01) (SEQ ID NO: 236 y 238, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 40A y 40B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 39.18 E12 (SEQ ID NO: 156 y 158, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 3-15*01 (IGKV3-15*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 1-69*01 (IGHV1-69*01) (SEQ ID NO: 236 y 238, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 41A y 41B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 36.89 (SEQ ID NO: 162 y 160, respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 1-5*03 (IGKV1-5*03) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 1-18*01 (IGHV1-18*01) (SEQ ID NO: 239 y 240, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 42A y 42B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 9.01F3 (SEQ ID NO: 166 y 164, respectivamente) con la estirpe germinal variable ligera de inmunoglobulina 1-44*01 (IGKV1-44*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 1-2*02*01 (IGHV1-2*02) (SEQ ID NO: 241 y 242, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

Las figuras 43A y 43B muestran una alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 23.06C2 (SEQ ID NO: 170 y 168,

respectivamente) con la estirpe germinal variable kappa de inmunoglobulina 2-30*01 (IGKV2-30*01) y la estirpe germinal variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 4-39*01 (IGHV4-39*01) (SEQ ID NO: 243 y 244, respectivamente). Los aminoácidos son los números de acuerdo con la numeración de Kabat. Se indican las CDR de Kabat, Chothia y de contacto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

I. DEFINICIONES

Una "región estructural humana aceptora" para los propósitos en el presente documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural del dominio variable de la cadena ligera (VL) o una región estructural del dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana, como se define a continuación. Una región estructural humana aceptora "derivada de" una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de cambios de aminoácidos es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunos modos de realización, la región estructural humana aceptora de VL es idéntica en secuencia a la secuencia estructural de inmunoglobulina humana de VL o a la secuencia estructural consenso humana.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su ligando (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y se puede representar, en general, mediante la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir mediante procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los modos de realización ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión se describen en lo siguiente.

Un anticuerpo "con maduración de la afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo original que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

Los términos "anticuerpo antihemaglutinina" y "un anticuerpo que se une a hemaglutinina" se refieren a un anticuerpo que se une a hemaglutinina con una afinidad suficiente de modo que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en la selección como diana de la hemaglutinina, incluyendo la selección como diana de la hemaglutitina del virus de la gripe. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo antihemaglutinina a una proteína distinta de hemaglutinina no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a la hemaglutinina como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une a hemaglutinina tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM o ≤ 0,001 nM (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinados modos de realización, un anticuerpo antihemaglutinina se une a un epítopo de hemaglutinina que se conserva entre hemaglutinina de diferentes cepas, subtipos y aislados de los virus de la gripe A.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, pero no limitadas a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Un "fragmento de anticuerpo" también se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une a hemaglutinina y neutraliza el virus de la gripe A. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un "anticuerpo que se une al mismo epítopo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más. En el presente documento se proporciona un ensayo de competición ejemplar.

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera deriva de una fuente o especie diferente.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α, δ, ε, γ y μ, respectivamente.

El término "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o provoca muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radioactivos (por ejemplo, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} y los isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorrubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos antineoplásicos o antitumorales divulgados a continuación.

"Funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Fys447) de la región Fc puede o no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos aminoacídicos en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al*., *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Región estructural" o "FR" se refiere a residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste en general en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen en general en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(F1)-FR2-H2(F2)-FR3-H3(F3)-FR4.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pasos. La descendencia puede que no sea completamente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Una "región estructural consenso humana" es una región estructural que representa los residuos aminoacídicos que se producen más comúnmente en una selección de secuencias estructurales de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es a partir de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al*., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, publicación del NIH 91-3242, Bethesda MD (1991),

vols. 1-3. En un modo de realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al*., *supra*. En un modo de realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al*., *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos aminoacídicos de HVR no humanas y residuos aminoacídicos de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas de las HVR (por ejemplo, CDR) se corresponden con las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas de las FR se corresponden con las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR") y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o contienen los residuos de contacto con antígeno ("contactos con antígeno"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR ejemplares en el presente documento incluyen:

(a) los bucles hipervariables que se producen en los residuos aminoacídicos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) las CDR que se producen en los residuos aminoacídicoss 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat *et al*., *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) los contactos de antígeno que se producen en los residuos aminoacídicos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al*., *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); y

(d) las combinaciones de (a), (b) y/o (c), que incluyen residuos aminoacídicos de HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al*., *supra*.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado a una o más molécula(s) heterógena(s) que incluyen, pero no se limitan a, un agente citotóxico.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinados modos de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos modos de realización, un anticuerpo se purifica a más de un 95 % o 99 % de pureza determinada, por ejemplo, mediante electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para una revisión de los procedimientos para evaluar la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al*., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

"Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo antihemaglutinina" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpo (o fragmentos de las mismas), incluyéndose dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico en un único vector o en vectores separados, y estando dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades insignificantes. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales

se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo por haberse obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante una variedad de técnicas, que incluyen, pero no se limitan al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana; estando descritos en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

Un "anticuerpo no marcado" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a un resto heterógeno, (por ejemplo, un resto citotóxico) o radiomarcador. El anticuerpo no marcado puede estar presente en una formulación farmacéutica.

"Anticuerpos naturales" se refieren a moléculas de inmunoglobulina natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas con puentes disulfuro. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, desde el extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basados en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término "prospecto del envase" se usa para hacer referencia a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoacídicos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático públicamente disponible, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los propósitos en el presente documento, sin embargo, los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que, de forma alternativa, se puede parafrasear como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos aminoacídicos puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos aminoacídicos en B. Se apreciará que si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa de ordenador ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que

son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente de una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

El término "hemaglutinina", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier hemaglutinina natural de cualquier fuente de virus de la gripe, a menos que se indique de otro modo. El término engloba hemaglutinina sin procesar "de longitud completa" así como cualquier forma de hemaglutinina que resulte del procesado en un virus de la gripe o en una célula infectada por virus de la gripe. El término también engloba variantes naturales de hemaglutinina, por ejemplo, variantes de ayuste o variantes alélicas. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas hemaglutinina ejemplares de diversas cepas del virus de la gripe A se muestran en SEQ ID NO: 225 (H2 de A/Japón/305/1957), 226 (H3 de A/Perth/16/2009), 227 (H5 de A/Vietnam/1203/2004), 228 (H7 de A/pollo/NSW/1/1997), 229 (H1 de A/California/07/2009), 230 (H1 de A/NSW/1933), 231 (H3 de A/Hong Kong/8/1968), 232 (H7 de A/Países Bajos/219/2003) y 233 (A/Carolina del Sur/1918).

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se trata, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevenir la aparición o recidiva de la enfermedad (por ejemplo, prevenir la aparición o recidiva de la infección por el virus de la gripe A), reducción (por ejemplo, reducir) o alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, disminuir la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del estado de la enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunos modos de realización, se usan los anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural en general tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt *et al*., *Kuby Immunology,* 6.ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007)). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al*., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson *et al*., *Nature* 352:624-628 (1991).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se unen funcionalmente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

II. COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en anticuerpos antihemaglutinina y usos de los mismos. Se proporcionan anticuerpos que se unen a la hemaglutinina como se define en las reivindicaciones. Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico, tratamiento o prevención de la infección por el virus de la gripe A.

A. Anticuerpos antihemaglutinina ejemplares

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos aislados que se unen a la hemaglutinina como se define en las reivindicaciones. En determinados modos de realización, un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención se une a las hemaglutininas del grupo 1 y grupo 2. En otros modos de realización, un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención neutraliza el virus de la gripe A *in vitro.* En otros modos de realización, un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención neutraliza el virus de la gripe A *in vivo.* Aún en otros modos de realización, un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención reduce la infección por el virus de la gripe A, previene la infección por el virus de la gripe A, inhibe la infección por el virus de la gripe A o trata la infección por el virus de la gripe A. En algunos modos de realización, un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención previene, inhibe o reduce la fusión mediada por hemaglutinina entre la membrana del virus de la gripe y las membranas endosómicas de las células infectadas (previniendo, inhibiendo o reduciendo, por tanto, la entrada del ARN vírico en el citoplasma de las células infectadas, previniendo, inhibiendo o reduciendo, por tanto, la propagación adicional de la infección por el virus de la gripe).

La invención proporciona un anticuerpo que comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 191; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 193; (c) HVR-H3,

que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 194; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 195; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 196; y (f) HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 197.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 234.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 235.

En un modo de realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:234 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:235.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139.

En un modo de realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, se humaniza un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención. En un modo de realización, un anticuerpo antihemaglutinina comprende HVR como en cualquiera de los modos de realización anteriores, y comprende además una región estructural humana aceptora, por ejemplo, una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana.

En otro aspecto, un anticuerpo antihemaglutinina del presente documento comprende una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 234. En determinados modos de realización, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo antihemaglutinina que comprenda esa secuencia retiene la capacidad de unirse a hemaglutinina. En determinados modos de realización, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en SEQ ID NO: 234. En determinados modos de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo antihemaglutinina comprende la secuencia de VH en SEQ ID NO: 234, que incluye modificaciones postraduccionales de esa secuencia.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo antihemaglutinina, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 235. En determinados modos de realización, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo antihemaglutinina que comprenda esa secuencia retiene la capacidad de unirse a hemaglutinina. En determinados modos de realización, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en SEQ ID NO: 235. En determinados modos de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo antihemaglutinina comprende la secuencia de VL en SEQ ID NO: 235, que incluye modificaciones postraduccionales de esa secuencia.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo antihemaglutinina, en el que el anticuerpo comprende un VH como en cualquiera de los modos de realización proporcionados anteriormente y un VL como en cualquiera de los modos de realización proporcionados anteriormente. En un modo de realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en SEQ ID NO: 234 y SEQ ID NO: 235, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias.

En el presente documento se divulga un anticuerpo que se une al mismo epítopo que un anticuerpo antihemaglutinina proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, en determinados aspectos de la divulgación, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítopo que un anticuerpo antihemaglutinina que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 234 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 235.

En otro aspecto de la invención, un anticuerpo antihemaglutinina de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En

un modo de realización, un anticuerpo antihemaglutinina es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o $F(ab')_2$. En otro modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, un anticuerpo, por ejemplo, IgG1, por ejemplo, intacto u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en el presente documento.

En otro aspecto, un anticuerpo antihemaglutinina de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, como se describe en las secciones 1-7 a continuación:

1. Afinidad de anticuerpos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 1 µM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM o ≤ 0,001 nM (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

En un modo de realización, Kd se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA). En un modo de realización, se realiza un RIA con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno se mide equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, capturando a continuación el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen *et al*., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER (Thermo Scientific) durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquea con seroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante de dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 ºC). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezcla [^{125}I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consecuente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al*., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). A continuación, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, de aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Después de esto, se transfieren las mezclas a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se elimina la solución y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se hayan secado, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos que o igual a un 20 % de unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otro modo de realización, Kd se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial BIACORE®. Por ejemplo, se realiza un ensayo usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En un modo de realización, los chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, hasta 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0,05 % a 25 ºC a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las velocidades de asociación (k_{aso}) y velocidades de disociación (k_{dis}) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (programa informático de evaluación de BIACORE®, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. Se calcula la constante de disociación en equilibrio (Kd) como la proporción k_{dis}/k_{aso}. Véase, por ejemplo, Chen *et al*., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación excede de 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación se puede determinar usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con interrupción de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

2. Fragmentos de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al*., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), pp. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.os 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ que comprenden residuos de epítopos de

unión al receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* incrementada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al*., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson *et al*., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de único dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de único dominio es un anticuerpo de único dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1).

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo mediante diversas técnicas que incluyen, pero no se limitan a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción mediante células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Se describen determinados anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase de la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinados modos de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, se humaniza un anticuerpo no humano para reducir la inmunogenia en los seres humanos, mientras que se retienen la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o porciones de las mismas), derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunos modos de realización, se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los procedimientos de preparación de los mismos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann *et al*., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen *et al*., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); las patentes de EE. UU. n.os 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri *et al*., *Methods* 36:25-34 (2005) (que describen el injerto en la región determinante de la especificidad (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe el "rebarnizado"); Dall'Acqua *et al*., *Methods* 36:43-60 (2005) (que describen el "barajado de FR"); y Osbourn *et al*., *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka *et al*., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describen el enfoque de "selección guiada" para el barajado de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims *et al*., *J. Immunol.,* 151:2296 (1993)); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta *et al*., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones estructurales maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones estructurales de la estirpe germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (véase, por ejemplo, Baca *et al*., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok *et al*., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

4. Anticuerpos humanos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica o usando las técnicas descritas en el presente documento. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición a antígeno. Dichos animales típicamente contienen todos o una porción de los locus de

inmunoglobulina humana, que remplazan a los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógena, en general, se han inactivado. Para una revisión de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véanse también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.os 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de EE. UU. n.º 5.770.429 que describe la tecnología HuMab®; la patente de EE. UU. n.º 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VelociMouse®. Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales se pueden modificar adicionalmente, por ejemplo, mediante combinación con una región constante humana diferente.

También se pueden preparar anticuerpos humanos mediante procedimientos basados en hibridoma. Se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma humano-murino para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al*., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,* pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al*., *J. Immunol.*, 147:86 (1991)). Los anticuerpos humanos generados por medio de tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos también se describen en Li *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Los procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas de células de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas humanos-humanos). La tecnología de hibridoma humano (tecnología de trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

También se pueden generar anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos. A continuación, se pueden combinar dichas secuencias de dominio variable con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos a partir de colecciones de anticuerpos se describen a continuación.

5. Anticuerpos derivados de colecciones

Se pueden aislar los anticuerpos de la invención cribando colecciones combinatorias para determinar los anticuerpos con la actividad o las actividades deseada(s). Por ejemplo, una variedad de procedimientos son conocidos en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para determinar anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom *et al*., en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al*., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen adicionalmente, por ejemplo, en McCafferty *et al*., *Nature* 348:552-554; Clackson *et al*., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al*., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al*., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al*., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al*., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

En determinados procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de genes de VH y VL se clonan por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que, a continuación, se pueden cribar para determinar el fago de unión a antígeno como se describe en Winter *et al*., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa (por ejemplo, de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia gama de antígenos propios y también no propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths *et al*., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Por último, también se pueden preparar de manera sintética colecciones sin exposición previa clonando segmentos génicos V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de EE. UU. n.º 5.750.373 y las publicaciones de patente de EE. UU. n.os 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humanos en el presente documento.

6. Anticuerpos multiespecíficos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos

monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados modos de realización, una de las especificidades de unión es para hemaglutinina y la otra es para cualquier otro antígeno. En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de hemaglutinina. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos con respecto a las células que expresan la hemaglutinina. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tengan especificidades diferentes (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), el documento WO 93/08829 y Traunecker *et al*., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)) y la genomanipulación de "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004A1); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, y Brennan *et al*., *Science,* 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al*., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); usando la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros de Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber *et al*., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al*., *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

También se incluyen en el presente documento anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une hemaglutinina, así como otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

7. Variantes de anticuerpo

En determinados modos de realización, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

a) <u>Variantes de sustitución, inserción y deleción</u>

En determinados modos de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Se muestran sustituciones conservadoras en la tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones preferentes". Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones ejemplares" y, como se describe adicionalmente a continuación, en referencia a las clases de cadena lateral de los aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenia disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Reunió; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr

Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras conllevarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su estudio adicional tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenia reducida) en relación con el anticuerpo original y/o habrán retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo con maduración de la afinidad, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadasen presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, la afinidad de unión).

Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones se pueden realizar en "puntos calientes" de la HVR, es decir, residuos codificados por codones que se someten a una mutación con alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), y/o residuos que entran en contacto con el antígeno, sometiendóse a prueba el VH o VL variante resultante para determinar la afinidad de unión. La maduración de la afinidad construyendo y seleccionando de nuevo a partir de colecciones secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom *et al*., en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al*., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunos modos de realización de la maduración de la afinidad, se introduce la diversidad en los genes variables elegidos para su maduración mediante cualquiera de una variedad de procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error, reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una segunda colección. A continuación, se criba la colección para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Se pueden identificar específicamente los residuos de HVR implicados en la unión a antígeno, por ejemplo, usando modelado o mutagénesis por barrido de alanina. A menudo se seleccionan como dianas en particular CDR-H3 y CDR-L3.

En determinados modos de realización, se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones en una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Dichas alteraciones pueden, por ejemplo, estar fuera de los residuos que entran en contacto con el antígeno en las HVR. En determinados modos de realización de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se pueden seleccionar como dianas para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este procedimiento, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) y se remplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina

de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar como diana o eliminar como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden cribar para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos aminoacídicos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

b) <u>Variantes de glucosilación</u>

En determinados modos de realización, se altera un anticuerpo proporcionado en el presente documento para incrementar o disminuir el grado en el que el anticuerpo se glucosila. La adición o deleción de sitios de glucosilación a un anticuerpo se puede conseguir convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o elimine uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido al mismo. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenario ramificado que se une, en general, mediante un enlace de N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al*., *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenario. En algunos modos de realización, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención a fin de crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En un modo de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura glucídica que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser desde un 1 % a un 80 %, desde un 1 % a un 65 %, desde un 5 % a un 65 % o desde un 20 % a un 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de glúcido en Asn297, en relación con la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) como se mide mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, también se puede localizar Asn297 aproximadamente ± 3 aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia insignificantes en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE. UU. n.^{os} US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosilado" o "deficitario en fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki *et al*., *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al*., *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec 13 deficitarias en fucosilación de proteínas (Ripka *et al*., *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); solicitud de patente de EU. UU. n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares inactivadas, tales como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO inactivadas (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al*., *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al*., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006) y el documento WO 2003/085107).

A las variantes de anticuerpos se les proporciona además oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenario unido a la región Fc del anticuerpo se biseca por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al*.); la patente de EE. UU. n.º 6.602.684 (Umana *et al*.); y el documento US 2005/0123546 (Umana *et al*.). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel *et al*.); el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

c) <u>Variantes de la región Fc</u>

En determinados modos de realización, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de

IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En determinados modos de realización, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas, las funciones efectoras, que le convierten en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y la ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carezca de unión a FcγR (de ahí que sea probable que carezca de actividad ADCC), pero retenga su capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, solo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I. *et al*., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al*., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al*., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayo no radiactivo (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar *in vivo* la actividad ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al*. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y, de ahí que carezca de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro, H., *et al., J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al*., *Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También se pueden realizar determinaciones de la unión a FcRn y del aclaramiento/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B., *et al*., *Intl. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con la sustitución de los residuos 265 y 297 a alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. (Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312 y Shields *et al*., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

En determinados modos de realización, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

En algunos modos de realización, las alteraciones se realizan en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o disminuidas), por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551, el documento WO 99/51642 e Idusogie *et al*. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Se describen anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al*., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al*., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), en el documento US 2005/0014934A1 (Hinton *et al*.). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente de EE. UU. n.º 7.371.826).

Véase también Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); la patente de EE. UU. n.º 5.648.260; la patente de EE. UU. n.º 5.624.821; y el documento WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

d) <u>Variantes de anticuerpo genomanipulado con cisteína</u>

En determinados modos de realización, puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "thioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En modos de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se posicionan de este modo en sitios accesibles

del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinados modos de realización, se puede sustituir uno cualquiera o más de los siguientes residuos con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Se pueden generar anticuerpos genomanipulados con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

e) Derivados de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede modificar adicionalmente para que contenga restos no proteicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)/polietilenglicol, homopolímeros de propropilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden ser las mismas moléculas o diferentes. En general, se pueden determinar el número y/o el tipo de polímeros usados para la derivatización en base a consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se va a mejorar, si el derivado del anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otro modo de realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteico que se pueden calentar de forma selectiva mediante exposición a la radiación. En un modo de realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero no se limita a, las longitudes de onda que no dañan las células normales, pero que calientan el resto no proteico hasta una temperatura a la que se destruyen las células proximales al anticuerpo-resto no proteico.

B. Procedimientos y composiciones recombinantes

Se pueden producir anticuerpos usando procedimientos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567. En un modo de realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo antihemaglutinina descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En otro modo de realización, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En otro modo de realización, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En un modo de realización de este tipo, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En un modo de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfática (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo antihemaglutinina, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de células huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo antihemaglutinina, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla e inserta en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos, que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión de vectores que codifican el anticuerpo incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular, cuando no se necesitan glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de los fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.^{os} 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli).* Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción

soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras en las que sus vías de glucosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) y Li *et al*., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar conjuntamente con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.^{os} 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en vegetales transgénicos).

También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se adaptan para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham *et al*., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK), células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI (como se describe, por ejemplo, en Mather *et al*., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR$^-$ (Urlaub *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

C. Ensayos

Los anticuerpos antihemaglutinina proporcionados en el presente documento se pueden identificar, cribar o caracterizar para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o sus actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante procedimientos conocidos, tales como ELISA, inmunoelectrotransferencia, etc.

En otro aspecto, se pueden usar ensayos de competición para identificar un anticuerpo que compita por la unión de la hemaglutinina con cualquier anticuerpo antihemaglutinina descrito en el presente documento. En determinados modos de realización, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítopo (por ejemplo, un epítopo lineal o conformacional) que está unido por un anticuerpo antihemaglutinina descrito aquí (por ejemplo, un anticuerpo antihemaglutinina que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 234 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 235. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para cartografiar un epítopo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

En un ensayo de competición ejemplar, la hemaglutinina inmovilizada se incuba en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a la hemaglutinina y un segundo anticuerpo no marcado que se está sometiendo a prueba para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión a la hemaglutinina. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba la hemaglutinina inmovilizada en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación, en condiciones que permitan la unión del primer anticuerpo a hemaglutinina, se elimina el anticuerpo no unido en exceso y se mide la cantidad de marcador asociado con la hemaglutinina inmovilizada. Si se reduce sustancialmente la cantidad de marcador asociado la hemaglutinina inmovilizada en la muestra de prueba en relación con la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por su unión a la hemaglutinina. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos antihemaglutinina y fragmentos de los mismos

que tengan actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la unión específica a la hemaglutinina del virus de la gripe A, la neutralización del virus de la gripe A, etc. También se proporcionan anticuerpos y composiciones que comprenden anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

En determinados modos de realización, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar dicha actividad biológica. Véanse los ejemplos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 13 para obtener descripciones ejemplares de dichos ensayos.

D. Inmunoconjugados

La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo antihemaglutinina en el presente documento conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas) o isótopos radioactivos.

En un modo de realización, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) en el que un anticuerpo se conjuga a uno o más fármacos, que incluyen pero no se limitan a un maitansinoide (véanse las patentes de EE. UU. n.^{os} 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como las fracciones DE y DF de fármacos de monometilauristatina (MMAE y MMAF) (véanse las patentes de EE. UU. n.^{os} 5.635.483 y 5.780.588 y 7.498.298); una dolastatina; una caliqueamicina o un derivado de la misma (véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296; Hinman *et al*., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); y Lode *et al*., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorrubicina (véase Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey *et al*., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov *et al*., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik *et al*., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King *et al*., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002) y la patente de EE. UU. n.º 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, que incluye, pero no se limita a, la cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Están disponibles una variedad de isótopos radioactivos para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} y los isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo, Tc99m o I123, o un marcador de espín para la obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como resonancia magnética, RM), tal como yodo 123 de nuevo, yodo 131, indio 111, flúor 19, carbono 13, nitrógeno 15, oxígeno 17, gadolinio, manganeso o hierro.

Se pueden preparar conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como clorhidrato de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al*., *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionúclido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil en ácido, conector sensible a la peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari *et al*., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC en el presente documento contemplan expresamente, pero no se limitan a, dichos conjugados preparados con reactivos de reticulación, que incluyen, pero no se limitan a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB ((4-vinilsulfona)benzoato de succinimidilo), que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

E. Procedimientos y composiciones para diagnóstico y detección

En determinados modos de realización, cualquiera de los anticuerpos antihemaglutinina proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de hemaglutinina o el virus de la gripe A en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento engloba la detección cuantitativa o cualitativa. En determinados modos de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como, por ejemplo, pulmón, vías respiratorias altas, conducto óseo nasolagrimal, sangre, esputo, o comprende una muestra biológica obtenida mediante frotis nasal o faríngeo.

En un modo de realización, se proporciona un anticuerpo antihemaglutinina para su uso en un procedimiento de diagnóstico o detección. En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de detección de la presencia de hemaglutinina o el virus de la gripe A en una muestra biológica. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo antihemaglutinina como se describe en el presente documento en condiciones que permitan la unión del anticuerpo antihemaglutinina a la hemaglutinina, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo antihemaglutinina y la hemaglutinina. Dicho procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro* o *in vivo*. En un modo de realización, se usa un anticuerpo antihemaglutinina para seleccionar sujetos idóneos para su tratamiento con un anticuerpo antihemaglutinina, por ejemplo, donde la hemaglutinina es un biomarcador para la selección de pacientes.

Los trastornos ejemplares que se pueden diagnosticar usando un anticuerpo de la invención incluyen la infección por el virus de la gripe A, incluyendo la infección por el virus de la gripe A en niños, lactantes, adultos y ancianos.

En determinados modos de realización, se proporcionan anticuerpos antihemaglutinina marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrodensos, quimioluminiscentes y radioactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H y ^{131}I, fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE. UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo antihemaglutinina como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales *(Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.ª edición, Osol, A. (Ed.) (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, pero no se limitan a: tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; glúcidos, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además agentes de dispersión intersticial de fármacos, tales como glucoproteínas de hialuronidasa activa a pH neutro soluble (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Se describen determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rHuPH20, en las publicaciones de patente de EE. UU. n.os 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glucosaminoglucanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Se describen formulaciones de anticuerpos liofilizadas ejemplares en la patente de EE. UU. n.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º 6.171.586 y el documento WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón histidina-acetato.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un ingrediente activo según sea

necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un inhibidor de neuraminidasa, un anticuerpo antihemaglutinina, un anticuerpo anti-M2, etc. Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.

Los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.ª edición, Osol, A. (ed.) (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, en las que dichas matrices se encuentran en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* son, en general, estériles. Se puede conseguir fácilmente la esterilidad, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Procedimientos y composiciones terapéuticas

Se puede usar cualquiera de los anticuerpos antihemaglutinina proporcionados en el presente documento en procedimientos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo antihemaglutinina para su uso como un medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo antihemaglutinina para su uso en el tratamiento, prevención o inhibición de la infección por el virus de la gripe A. En determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo antihemaglutinina para su uso en un procedimiento de tratamiento. En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo antihemaglutinina como se define en las reivindicaciones para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene una infección por el virus de la gripe A, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo antihemaglutinina. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. En otros modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo antihemaglutinina como se define en las reivindicaciones para su uso en la prevención, inhibición o reducción de la fusión mediada por hemaglutinina entre la membrana vírica del virus de la gripe A y las membranas endosómicas de las células infectadas, evitando por tanto la entrada del ARN vírico en el citoplasma de las células infectadas y previniendo la propagación adicional de la infección. En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo antihemaglutinina como se define en las reivindicaciones para su uso en un procedimiento de prevención, inhibición o tratamiento de la infección por el virus de la gripe A en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo antihemaglutinina para prevenir, inhibir o tratar la infección por el virus de la gripe A. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es preferentemente un ser humano.

Se divulga en el presente documento el uso de un anticuerpo antihemaglutinina en la fabricación o preparación de un medicamento. En un aspecto, el medicamento es para el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A. En otro aspecto, el medicamento es para su uso en un procedimiento de tratamiento de la infección por el virus de la gripe A, que comprende administrar a un individuo que tiene infección por el virus de la gripe A una cantidad eficaz del medicamento. En un aspecto de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. En otro aspecto, el medicamento es para prevenir, inhibir o reducir la fusión mediada por hemaglutinina entre la membrana vírica del virus de la gripe A y las membranas endosómicas de las células infectadas, evitando por tanto la entrada de ARN vírico en el citoplasma de las células infectadas y previniendo la propagación adicional de la infección. En otro aspecto, el medicamento es para su uso en un procedimiento de prevención, inhibición o tratamiento de la infección por el virus de la gripe A en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para prevenir, inhibir o reducir, la infección por el virus de la gripe A. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención para su uso en un procedimiento para tratar la infección por el virus de la gripe A. En un modo de realización, el procedimiento comprende administrar a un individuo que tiene dicha infección por el virus de la gripe A una cantidad eficaz de un anticuerpo antihemaglutinina. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, como se describe en el presente documento. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

La presente invención proporciona anticuerpos antihemaglutinina eficaces en la inhibición, prevención o tratamiento de la infección por el virus de la gripe A en un individuo (por ejemplo, un sujeto o un paciente). En algunos aspectos, un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención es eficaz en el tratamiento profiláctico de un individuo a fin de prevenir la infección por el virus de la gripe A en el individuo.

En algunos aspectos, un individuo adecuado para el tratamiento con un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención es un individuo que tiene o se sospecha que tiene una infección por el virus de la gripe A. En algunos modos de realización, dichos individuos incluyen lactantes, niños, adultos y ancianos. En algunos modos de realización, el individuo está hospitalizado con una infección por el virus de la gripe A. En otros modos de realización, el individuo que tiene una infección por el virus de la gripe A tiene una o más comorbilidades, tales como, por ejemplo, inmunodeficiencia, embarazo, neumopatía, cardiopatía, nefropatía o infección simultánea (por ejemplo, una infección bacteriana o una infección vírica, tal como neumonía bacteriana o vírica).

En algunos aspectos, el tratamiento de un individuo con un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención reduce la gravedad de la infección por el virus de la gripe A, reduce la duración de la infección por el virus de la gripe A o reduce la infecciosidad del virus de la gripe A. En otros aspectos, el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A con un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención proporciona un beneficio adicional, que incluye una reducción de la duración de la estancia hospitalaria, reducción o prevención de la necesidad del uso de la unidad de cuidados intensivos (UCI), reducción o prevención de la necesidad de respiración asistida o mecánica, reducción o prevención de la necesidad del uso de oxigenoterapia y reducción de la mortalidad. En algunos aspectos, la reducción en la duración de la estancia hospitalaria es de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o más de 5 días. En algunos aspectos, la reducción en la necesidad del uso de la unidad de cuidados intensivos es de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o más de 5 días. En algunos aspectos, la reducción en la necesidad de respiración asistida o mecánica es de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o más de 5 días. En algunos aspectos, la reducción en la necesidad de oxigenoterapia es de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o más de 5 días. En algunos aspectos, el tratamiento de un individuo con un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención reduce los síntomas de la enfermedad de la infección por el virus de la gripe A, tales como, por ejemplo, fiebre, rinitis, escalofríos, dolor de garganta, mialgias, artromialgias generalizadas, cefalea, tos, congestión nasal, astenia o cansancio, ojos irritados o lagrimeo y malestar general.

En algunos aspectos, el tratamiento de un individuo con un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención reduce el tiempo de normalización de la actividad respiratoria, tal como una reducción del tiempo de normalización de la frecuencia respiratoria, o una reducción del tiempo de normalización de la saturación de oxígeno. En algunos aspectos, el tratamiento de un individuo con un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención reduce el tiempo de regreso a la saturación de oxígeno normal, por ejemplo, a una saturación de oxígeno de aproximadamente un 92 % o más, como se mide durante un periodo de 24 horas sin administración de oxigenoterapia. En otros aspectos, el tratamiento de un individuo con un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención reduce el tiempo de normalización de las constantes vitales, tal como la frecuencia cardíaca, la tensión arterial, la frecuencia respiratoria y la temperatura.

En algunos aspectos, el tratamiento de un individuo con un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención mejora los criterios de valoración virológicos, tales como, por ejemplo, el valor del virus de la gripe. El valor del virus se puede medir de diversas formas conocidas por un experto en la técnica, tales como, por ejemplo, el área bajo la curva (ABC) vírica, como se mide, por ejemplo, por qPCR o la dosis infecciosa en cultivo de tejido (TCID50). En algunos aspectos, el tratamiento da como resultado una reducción mayor que o igual a un 50 % en el ABC vírica como se mide por qPCR o TCID50.

En diversos aspectos de la presente invención, un anticuerpo antihemaglutinina proporcionado en el presente documento es eficaz en el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A cuando se administra en aproximadamente 12 horas, en aproximadamente 24 horas, en aproximadamente 36 horas, en aproximadamente 48 horas, en aproximadamente 60 horas, en aproximadamente 72 horas, en aproximadamente 84 horas y en aproximadamente 96 horas después de la aparición de los síntomas (por ejemplo, la aparición de la enfermedad). En otros aspectos, un anticuerpo antihemaglutinina proporcionado en el presente documento es eficaz en el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A cuando se administra entre aproximadamente 24 horas y 48 horas después de la aparición de los síntomas (por ejemplo, el individuo ha tenido síntomas durante entre 24 y 48 horas), cuando se administra entre aproximadamente 48 horas y 72 horas después de la aparición de los síntomas, o cuando se administra entre aproximadamente 72 horas y 96 horas después de la aparición de los síntomas. En determinados modos de realización de la presente invención, un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención es eficaz en el tratamiento o reducción de la infección por el virus de la gripe A y prolonga el margen de tratamiento del tratamiento habitual actual (por ejemplo, oseltamivir) más de 48 horas después de la aparición de los síntomas.

En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos antihemaglutinina proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores. En un modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos antihemaglutinina proporcionados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de

los anticuerpos antihemaglutinina proporcionados en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar por sí solos o bien en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. En determinados modos de realización, un agente terapéutico adicional es un inhibidor de la neuraminidasa (por ejemplo, zanamivir, fosfato de oseltamivir, amantadina, rimantadina), un anticuerpo anti-M2, un anticuerpo antihemaglutinina, etc. En algunos aspectos, el tratamiento de un individuo, que tiene infección por el virus de la gripe A, con un anticuerpo antihemaglutinina de la presente invención coadministrado con un inhibidor de la neuraminidasa proporciona un efecto terapéutico sinérgico en comparación con el tratamiento con cualquiera de los agentes por sí solos.

Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en las mismas formulaciones o en formulaciones separadas) y la administración separada, caso en el que la administración del anticuerpo de la invención se puede producir antes de, simultáneamente y/o tras la administración del agente o agentes terapéuticos adicionales. En un modo de realización, la administración del anticuerpo antihemaglutinina y la administración de un agente terapéutico adicional se producen en un plazo de aproximadamente un mes, o en un plazo de aproximadamente una, dos o tres semanas, en un plazo de aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, o en un plazo de aproximadamente una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, ocho, diez, doce, dieciséis, veinte o veinticuatro horas entre sí.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que incluyen pero no se limitan a administraciones individuales o múltiples durante diversos puntos temporales, administración intravenosa rápida, e infusión pulsada.

Los anticuerpos de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de una forma consecuente con las prácticas médicas correctas. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos por los médicos. Aunque no se necesita, el anticuerpo se formula opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y por las vías de administración que se describen en el presente documento, o aproximadamente desde un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa por sí solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y la evolución de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis del paciente y de su respuesta al anticuerpo y del criterio del médico especialista. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 45 mg/kg (por ejemplo, de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosis inicial candidata para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento en general se mantendrá hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Las dosis ejemplares del anticuerpo estarán en el intervalo de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 45 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg. Por tanto, se puede administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 1,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 10 mg/kg o 45 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, por ejemplo, todos los días, cada dos días, cada tres días, etc. Se puede administrar una dosis inicial de carga más alta, seguida de una o más dosis más bajas. La dosificación también puede ser en una dosis fija, tal como, por ejemplo, de 200 mg, 400 mg, 600 mg, 800 mg, 1000 mg, 1200 mg, 1400 mg, 1500 mg, 1600 mg, 1800 mg, 2000 mg, 2200 mg, 2400 mg, 2500 mg, 2600 mg, 2800 mg, 3000 mg, 3200 mg, 3400 mg, 3600 mg, etc. La evolución de este tratamiento se comprueba fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que se puede llevar a cabo cualquiera de las formulaciones o procedimientos terapéuticos anteriores usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo antihemaglutinina.

H. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas con solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es por sí misma o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa con solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo de la invención. La ficha técnica o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en este modo de realización de la invención puede comprender además un prospecto del envase que indique que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo antihemaglutinina.

III. EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de procedimientos y composiciones de la invención. Se entiende que se pueden practicar otros modos de realización diversos, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1. Identificación de anticuerpos antihemaglutinina mediante presentación en fagos

Construcción de colecciones de fagos a partir de donantes humanos vacunados contra el virus de la gripe

Se identificaron los anticuerpos dirigidos contra la hemaglutinina del virus de la gripe A usando una colección de presentación en fagos construida a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas a partir de donantes humanos vacunados con la vacuna contra el virus de la gripe estacional como sigue.

Los leucopaquetes de donantes humanos normales que recibieron la vacuna contra la gripe estacional Fluvirin® (Novartis Fot n.º 111796P1) 7 días antes de su donación de sangre se obtuvieron de Blood Centers of the Pacific (San Francisco, CA). Las PBMC se aislaron a partir de los leucopaquetes usando metodologías estándar. Las PBMC se separaron para determinar las células de plasmoblastos $CD19^+/CD20^-$ mediante FACS. Se extrajo el ARN de los plasmoblastos separados $CD19^+/CD20^-$ usando un kit de purificación RNeasy (Qiagen, EE. UU.) y se generó el ADNc a partir del ARN aislado mediante transcripción inversa usando Superscript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, EE. UU.). Los genes del pesado variable (VH), kappa variable (VK) y ligero variable (VL) humanos se amplificaron por PCR a partir del ADNc usando las siguientes mezclas de cebadores de ADN inversos y directos.

Inversos de VH

BssHII.HuVH1: ATCGTTTCATAAGCGCGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 1)

BssHII.HuVH2: ATCGTTTCATAAGCGCGCCAGRTCACCTTGAAGGAGTC (SEQ ID NO: 2)

BssHII.HuVH3.1: ATCGTTTCATAAGCGCGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO: 3)

BssHII.HuVH3.2: ATCGTTTCATAAGCGCGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO: 4)

BssHII.HuVH3.3: ATCGTTTCATAAGCGCGCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO: 5)

BssHII.HuVH4.1: ATCGTTTCATAAGCGCGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTC (SEQ ID NO: 6)

BssHII.HuVH4.2: ATCGTTTCATAAGCGCGCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTC (SEQ ID NO: 7)

BssHII.HuVH5: ATCGTTTCATAAGCGCGCGARGTGCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 8)

BssHII.HuVH6: ATCGTTTCATAAGCGCGCCAGGTACAGCTGCAGCAGTC (SEQ ID NO: 9)

BssHII.HuVH7: ATCGTTTCATAAGCGCGCCAGGTGCAGCTGGTGCAATC (SEQ ID NO: 10)

BssHII.HuVH1.A: ATCGTTTCATAAGCGCGCCAGGTCCAGCTTGTGCAGTC (SEQ ID NO: 11)

BssHII.HuVH1.B: ATCGTTTCATAAGCGCGCCAGGTTCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 12)

BssHII.HuVH1.C: ATCGTTTCATAAGCGCGCCAGGTCCAGCTGGTACAGTC (SEQ ID NO: 13)

BssHII.HuVH1.D: ATCGTTTCATAAGCGCGCCAGATGCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 14)

BssHII.HuVH1.E: ATCGTTTCATAAGCGCGCCAAATCCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 15)

BssHII.HuVH1.F: ATCGTTTCATAAGCGCGCGAGGTCCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 16)

BssHII.HuVH3.A: ATCGTTTCATAAGCGCGCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTC (SEQ ID NO: 17)

BssHII.HuVH3.B: ATCGTTTCATAAGCGCGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAC (SEQ ID NO: 18)

BssHII.HuVH4.A: ATCGTTTCATAAGCGCGCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG (SEQ ID NO: 19)

Directos de VH

NheI.JH 2: GACATTCTACGAGCTAGCTGAGGAGACAGTGACCAGGGT (SEQ ID NO: 20)

NheI. JH1/4/5: GACATTCTACGAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT (SEQ ID NO: 21)

NheI. JH3: GACATTCTACGAGCTAGCTGAAGAGACGGTGACCATTGTC (SEQ ID NO: 22)

NheI.JH6: GACATTCTACGAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGG (SEQ ID NO: 23)

Inversos de VK

NheI.OL.HuVK1:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCGACATCCAGWTGACCCAGTC (SEQ ID NO: 24)

NheI.OL.HuVK2:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCGATGTTGTGATGACTCAGTC (SEQ ID NO: 25)

NheI.OL.HuVK3:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCGAAATTGTGWTGACRCAGTC (SEQ ID NO: 26)

NheI.OL.HuVK4:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCGATATTGTGATGACCCACAC (SEQ ID NO: 27)

NheI.OL.HuVK5:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCGAAACGACACTCACGCAGTC (SEQ ID NO: 28)

NheI.OL.HuVK6:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC

AGCGAAATTGTGCTGACTCAGTC (SEQ ID NO: 29)

Directos de VK

NcoI.JK1-: AGTTCATGCCATGGTTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTT (SEQ ID NO: 30)

NcoI.JK2-: AGTTCATGCCATGGTTTTGATCTCCACCTTGGTCCC (SEQ ID NO: 31)

NcoI.JK3-: AGTTCATGCCATGGTTTTGATATCCACTTTGGTCCCAG (SEQ ID NO: 32)

NcoI.JK4-: AGTTCATGCCATGGTTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCT (SEQ ID NO: 33)

NcoI.JK5-: AGTTCATGCCATGGTTTTAATCTCCAGTCGTGTCCCTT (SEQ ID NO: 34)

Inversos de VL

NheI.OL.HuVL1.1:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCCAGTCTGTG CTGACTCAGCC (SEQ ID NO: 35)

NheI.OL.HuVL1.2:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCCAGTCTGTG YTGACGCAGCC (SEQ ID NO: 36)

NheI.OL.HuVL1.3:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCCAGTCTGTC GTGACGCAGCC (SEQ ID NO: 37)

NheI.OL.HuVL2:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCCARTCTGCC CTGACTCAGCC (SEQ ID NO: 38)

NheI.OL.HuVL3.1:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCTCCTATGWG CTGACTCAGCC (SEQ ID NO: 39)

NheI.OL.HuVL3.2:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCTCTTCTGAG CTGACTCAGGA (SEQ ID NO: 40)

NheI.OL.HuVL4:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCCACGTTATA CTGACTCAACC (SEQ ID NO: 41)

NheI.OL.HuVL5:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCCAGGCTGTG CTGACTCAGCC (SEQ ID NO: 42)

NheI.OL.HuVL6:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCAATTTTATG CTGACTCAGCC (SEQ ID NO: 43)

NheI.OL.HuVL7/8:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCCAGRCTGTG GTGACYCAGGA (SEQ ID NO: 44)

NheI.OL.HuVL9:
TCTCCTCAGCTAGCGGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGC
AGCCWGCCTGTG CTGACTCAGCC (SEQ ID NO: 45)

Directos de VL

NcoLJL1-: AGTTCATGCCATGGTTAGGACGGTGACCTTGGTCC (SEQ ID NO: 46)

NcoI.JL2/3-: AGTTCATGCCATGGTTAGGACGGTCAGCTTGGTCC (SEQ ID NO: 47)

NcoI.JL7-: AGTTCATGCCATGGTGAGGACGGTCAGCTGGGTG (SEQ ID NO: 48)

Los productos de ADNc amplificados resultantes se ensamblaron a scFv usando PCR de solapamiento con los siguientes cebadores de solapamiento.

BssHII.VH.OL+: ATCGTTTCATAAGCGCGCSA (SEQ ID NO: 49)

NotI.JK.OL-: AGTTCATGCCATGGTTTTGAT (SEQ ID NO: 50)

NotI.JL.OL-: AGTTCATGCCATGGTKAGGAC (SEQ ID NO: 51)

Los fragmentos de ADNc de scFv purificados (1 µg) y el vector fagómido p2056BNN (2 µg) se digirieron con la endonucleasa de restricción BssHII y NcoI (New England Biolabs, EE. UU.). El vector fagómido p2056BNN es una versión modificada de pS2025e (Sidhu *et al.*, (2004) J Mol Biol 338:299-310), genomanipulado para que contenga los sitios de restricción BssHII, NheI y NcoI. A continuación, se fijaron los fragmentos de ADNc de scFv en el vector p2056BNN (proporción 6:1 M) usando la enzima ADN ligasa T4 (New England Biolabs). Los productos de la fijación de ADNc/fago resultantes se purificaron usando un kit de purificación de PCR (Qiagen, EE. UU.) y se transformaron en células de *E. coli* SS320 electrocompetentes. El tamaño de la colección de fagos se estimó sembrando 10 µl de cultivo de colección diluido 1:10 en placas de LB/carbenicilina. A continuación, el cultivo de colección se amplificó y se propagó adicionalmente en un volumen total de 60 ml de medio 2YT, y se indujo la expresión del fago-scFv por infección simultánea con el fago cooperador M13KO7. Se añadió posteriormente canamicina al cultivo colección y se incubó con agitación durante 30 horas a 30 ºC. A continuación, se centrifugó el cultivo de colección para sedimentar las células. El sobrenadante que contenía fago-scFv se precipitó con 5× de PEG/NaCl 2,5 M y se resuspendió en PBS.

Separación y cribado de colecciones de fagos para identificar anticuerpos antihemaglutinina

Las proteínas hemaglutinina H1 y H3 del virus de la gripe A (producidas como se describe a continuación en el ejemplo 2) se usaron como antígenos para la separación de colecciones de fagos. Los antígenos de hemaglutinina H1 y H3 se recubrieron sobre una placa MaxiSorp de 96 pocillos de alta unión. Las placas y las colecciones de fagos se bloquearon previamente con tampón de bloqueo de fagos (solución salina tamponada con fosfato (PBS), seroalbúmina bovina (BSA) al 1 % (p/v) y tween-20 (PBS-T) al 0,05 % (v/v)) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. La colección de fagos bloqueados (100 µl) se añadió a los pocillos recubiertos con hemaglutinina y se incubó durante 3 horas. Los fagos no unidos se eliminaron por lavado de las placas usando PBS-Tween al 0,05 %, y los fagos unidos se eluyeron con 100 µl de HCl 50 mM y NaCl 500 mM durante 30 minutos, seguido de neutralización con 100 µl de base Tris 1 M (pH 7,5). Los fagos recuperados se amplificaron en células de *E. coli* XL-1 Blue. Los fagos resultantes se precipitaron y se sometieron a otra ronda de selección negativa/selección frente a las proteínas hemaglutinina. Durante las rondas posteriores de selección negativa/selección, los fagos de anticuerpos se incubaron con los mismos o diferentes antígenos de hemaglutinina. La rigurosidad del lavado de la placa se incrementó gradualmente desde el lavado 15x al lavado 40x.

Después de 2-3 rondas de selección negativa y selección, se observó un enriquecimiento significativo de fagos específicos de hemaglutinina. Se escogieron 96 clones de fagos de la colección separándolos para determinar si se unían específicamente a la hemaglutinina H1 y/o H3. Se secuenciaron las regiones variables de los clones de fagos que presentaban una unión específica a las proteínas hemaglutinina para identificar clones de fagos que contenían secuencias de ácido nucleico de inmunoglobulina únicas. Se caracterizaron adicionalmente los anticuerpos de fagos únicos que se unían a la hemaglutinina H1 y/o H3 con al menos 5x por encima del fondo. Los clones derivados de fagos de interés se reconstruyeron para dar las IgG clonando las regiones V_L y V_H de clones individuales en los vectores de expresión LPG3 y LPG4, respectivamente, expresados de forma transitoria en células de mamífero 293, y se purificaron usando una columna de proteína A. Se identificaron dos anticuerpos (mAb9 y mAb23) para su análisis posterior. (Véase el ejemplo 5 a continuación).

Ejemplo 2. Enriquecimiento y expansión de plasmoblastos

Para descubrir e identificar anticuerpos escasos contra la hemaglutinina del virus de la gripe A, se desarrolló la siguiente técnica de enriquecimiento y expansión de plasmoblastos. (Véase la solicitud de patente pendiente de tramitación de la solicitud de patente de EE. UU. con número de serie 61/725.764).

Se obtuvieron los leucopaquetes de donantes humanos normales que recibieron la vacuna contra la gripe estacional Fluvirin® (n.º de lote 111796P1 de Novartis) 7 días antes de su donación de sangre de Blood Centers of the Pacific (San Francisco, CA). Se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de los

leucopaquetes usando metodologías estándar. Se adquirieron ratones SCID/beige hembra de seis a ocho semanas de edad de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se alojaron y mantuvieron en Genentech de acuerdo con las pautas de la American Association of Laboratory Animal Care. Todos los estudios experimentales se realizaron bajo la aprobación de los comités institucionales de cuidado y uso de animales de Genentech Lab Animal Research en un establecimiento acreditado por AAALACi de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio y las leyes y normas aplicables. Se obtuvo leucopaquete o sangre a partir de donantes humanos sanos después de que se proporcionó el consentimiento informado por escrito y se otorgó la aprobación ética de la Western Institutional Review Board.

El enriquecimiento y expansión de plasmoblastos en función de los antígenos *in vivo* se realizó usando el trasplante intraesplénico de las PBMC como sigue. Las PBMC aisladas se resuspendieron con antígenos de hemaglutinina (0,1-2 µg por cada millón de linfocitos B) y se incubaron durante 30 minutos a 37 ºC (premezcla de PBMC/antígeno). Tras esta incubación, las PBMC se lavaron para eliminar los antígenos no unidos. Para el enriquecimiento de los plasmoblastos que produjeron anticuerpos de hemaglutinina de reactividad cruzada, se escogieron específicamente las variantes de antígeno de hemaglutinina usadas para la premezcla de PBMC/antígeno y la separación de células sueltas para que difirieran de las variantes de antígeno de hemaglutinina contenidas en la vacuna contra la gripe Fluvirin®. Los antígenos de hemaglutinina usados en este estudio, por lo tanto, incluyeron hemaglutinina H1 del aislado del virus de la gripe A A/NWS/1933 (una hemaglutinina del virus de la gripe A del grupo 1), hemaglutinina H3 del aislado del virus de la gripe A A/Hong Kong/8/1968 (una hemaglutinina del virus de la gripe A del grupo 2), y hemaglutinina H7 del aislado del virus de la gripe A A/Países Bajos/219/2003 (una hemaglutinina del virus de la gripe A del grupo 2). Los antígenos de hemaglutinina se produjeron en Genentech usando técnicas estándar de biología molecular.

Los ratones SCID/beige hembra de 6-8 semanas de edad (Charles River Laboratories, Hollister, CA) se irradiaron de forma subletal con 350 rads usando una fuente de cesio 137. Se añadieron polimixina B (110 mg/l) y neomicina (1,1 g/l) al agua potable durante 7 días tras la irradiación. Cuatro horas después de la irradiación, se afeitó el flanco izquierdo de cada ratón y se preparó con Betadine® (Purdue Pharma, Stamford, CT) y alcohol al 70 %. Se realizaron los procedimientos quirúrgicos bajo anestesia usando procedimientos quirúrgicos asépticos. Se realizó una incisión en la piel de 1 cm justo debajo del borde costal de cada ratón, seguido de una incisión de la pared abdominal y el peritoneo. Se expuso con cuidado el bazo de cada ratón y se inyectaron 50×10^6 PBMC humanas resuspendidas en 30 µL de PBS. Se cerraron las incisiones en la capa muscular y en la piel usando suturas 5-O Vicryl® (Ethicon, Somerville, NJ) y grapas quirúrgicas, respectivamente. Para los experimentos de separación de células específicas de antígeno, los ratones se sacrificaron 8 días posteriormente al trasplante y se recogieron sus bazos.

Las suspensiones de células sueltas de las células del bazo obtenidas de los ratones se tiñeron con un combinado de anticuerpos monoclonales contra la Ig humana CD38 PECy7 (BD Biosciences, San Jose, CA) e IgG Dylight (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) que definen los plasmoblastos IgG+ humana como la expresión de $CD38^{alto}$/IgG+. Para la identificación de plasmoblastos de reactividad cruzada con hemaglutinina en la suspensión de las células de bazo aisladas, se tiñeron las células con hemaglutinina H1 del aislado del virus de la gripe A A/NWS/1933 y hemaglutinina H3 del aislado del virus de la gripe A A/Hong Kong/8/1968, que se conjugaron previamente con FITC o PE, respectivamente, usando los kits de marcado Lightning-Link® (Innova Biosciences, Cambridge, Reino Unido).

La figura 1A muestra el análisis de datos representativos de FACS de los plasmoblastos positivos para antihemaglutinina de las PBMC el día 7 posteriormente a la vacunación antes del enriquecimiento de los ratones SCID/beige (es decir, antes de la premezcla de PBMC/antígeno). La figura 1B muestra el análisis de datos representativos de FACS de los plasmoblastos positivos para hemaglutinina del día 8 posteriormente al trasplante después del enriquecimiento de los ratones SCID/beige, que comparan sin premezcla y con premezcla de antígeno en los paneles superior e inferior, respectivamente. Como se muestra en las figuras 1A y 1B, la premezcla de PBMC/antígeno antes de la inyección intraesplénica dio como resultado una mayor frecuencia de plasmoblastos antihemaglutinina $H3^+/H1^+$.

La tabla 2 a continuación muestra una comparación de las frecuencias de plasmoblastos anti-$H1^+$/anti-$H3^+$ antes y después del enriquecimiento de SCID como se describe en el presente documento. Como se muestra en la tabla 2, la frecuencia de plasmoblastos anti-$H1^+$/anti-$H3^+$ se incrementó en gran medida usando los procedimientos de enriquecimiento del ratón SCID/beige de la presente invención en comparación con la observada sin el enriquecimiento del ratón SCID/beige.

Tabla 2

Condición	Frecuencia de plasmoblastos anti-H1+/anti-H3+ (%)
Vacunación de PBMC	0,00028±0,00008
Premezcla de SCID + antígeno	0,011±0,007

A continuación, se analizaron las muestras en presencia de exclusión de células muertas con yoduro de propidio en

un separador de células de alta velocidad Aria (BD Biosciences, San Jose, CA) y se separaron los plasmoblastos específicos de antihemaglutinina de una manera de células sueltas en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contenían 50 µl de medio de cultivo de células RPMI complementado con suero fetal bovino bajo en IgG al 5 %. (Gibco, Grand Island, NY). Se registraron cinco millones de células vivas para todos los perfiles de análisis. Los perfiles se analizaron mediante el programa informático Flowjo versión 9.4.11.

La figura 2 muestra el análisis de los esplenocitos obtenidos del día 8 posteriormente al trasplante de ratones SCID/beige individuales que muestran una respuesta estocástica, que compara sin premezcla (círculos) y con premezcla de antígeno (cuadrados). Los datos se presentan como porcentaje de plasmoblastos anti-$H1^{+}$/$CD38^{alto}$. El rectángulo indica los ratones que presentaron plasmoblastos anti-$H1^{+}$.

Estos resultados mostraron que se detectaron amplios plasmoblastos de reactividad cruzada con hemaglutinina si se incubaron antígenos de hemaglutinina del grupo 1 (por ejemplo, hemaglutinina H1) y grupo 2 (por ejemplo, hemaglutinina H3, hemaglutinina H7) del virus de la gripe A con PBMC antes del trasplante intraesplénico. Estos resultados indicaron además que la estimulación *in vitro* de las PBMC primovacunadas con antígeno de hemaglutinina a partir de donantes vacunados contra la gripe promovió el enriquecimiento específico de antígeno de hemaglutinina de los plasmoblastos en los receptores de ratón SCID/beige.

Ejemplo 3. Clonación de IgG a partir de plasmoblastos individuales

Los plasmoblastos humanos de reactividad cruzada con hemaglutinina H1 y H3 (descritos anteriormente) se separaron en células sueltas, dando como resultado aproximadamente 950 plasmoblastos. Los plasmoblastos sueltos se separaron directamente en placas de micropocillos de 96 pocillos con fondo en U que contenían 50 µl de RPMI que contenía suero fetal bovino bajo en IgG al 5 %. Las placas se centrifugaron durante 5 minutos a 600 x g (Beckman Coulter, Brea, CA) y el medio se retiró con cuidado por aspiración. Las células se resuspendieron y se lavaron dos veces en 90 µl de PBS siguiendo el mismo procedimiento.

Para generar un ADNc que codifica las cadenas ligeras y las cadenas pesadas variables, cada célula se resuspendió en 6 µl de la mezcla de reacción de retrotranscriptasa (RT) que contenía 2 unidades de RNaseOUT (Invitrogen, Grand Island, NY), 4dNTP 0,5 mM (Perkin Elmer, Waltham , MA), $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 37,5 mM, DTT (ditiotreitol) 10 mM, Nonidet P40 al 0,25 % (US Biological, Marblehead, MA), 0,1 mg/ml de seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich), Tris 25 mM pH 8,3, 0,25 pmol de oligonucleótidos específicos de la región constante de IgG_{1-4}, constante de la cadena kappa y constante de la cadena lambda (se muestran a continuación) y 40 U de Superscript III (Invitrogen, Grand Island, NY).

Constante de IgG_{1-4}: GAAGTAGTCCTTGACCAGGCAG (SEQ ID NO: 52)

Constante de kappa: CTCAGCGTCAGGGTGYTGCTGAG (SEQ ID NO: 53)

Constante de lambda: GGGTKTGGTSGTCTCCAC (SEQ ID NO: 54)

La reacción se incubó durante intervalos de 3 x 30 minutos a 45 ºC, 50 ºC y 55 ºC cada uno. Tras la incubación, la mezcla de reacción se diluyó hasta 15 µl con tampón TE (Tris HCl 10 mm, EDTA 1 mM). Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) iniciales se realizaron para amplificar las cadenas pesadas, las cadenas kappa y las cadenas lambda de IgG usando 2 µl del combinado RT diluido de anteriormente y la mezcla de polimerasa Advantage-GC 2 (Clontech, Mountain View, CA), siguiendo los protocolos proporcionados por los fabricantes. Las amplificaciones por PCR se realizaron usando oligonucleótidos degenerados basados en la estirpe germinal de la cadena ligera y la cadena pesada variable y las secuencias de región constante que se muestran a continuación.

IGVH1a CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGC (SEQ ID NO: 55)

IGVH1b CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGC (SEQ ID NO: 56)

IGVH2 CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCC (SEQ ID NO: 57)

IGVH3 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGG (SEQ ID NO: 58)

IGVH4 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCC (SEQ ID NO: 59)

IGVH5 GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG (SEQ ID NO: 60)

IGVH6 CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCC (SEQ ID NO: 61)

IGVH7	CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGG	(SEQ ID NO: 62)
IGKV1	GHCATCCRGWTGACCCAGTCTC	(SEQ ID NO: 63)
IGKV2	GATRTTGTGATGACYCAGWCTC	(SEQ ID NO: 64)
IGKV3	GAAATWGTRWTGACRCAGTCTC	(SEQ ID NO: 65)
IGKV4	GACATCGTGATGACCCAGTCTCC	(SEQ ID NO: 66)
IGKV5	GAAACGACACTCACGCAGTCTC	(SEQ ID NO: 67)
IGKV6	GAWRTTGTGMTGACWCAGTCTC	(SEQ ID NO: 68)
IGLV1	CAGTCTGTGYTGACKCAGCCRCCCTC	(SEQ ID NO: 69)
IGLV2	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCT	(SEQ ID NO: 70)
IGLV3	TCCTATGAGCTGACWCAGSHVCCCKC	(SEQ ID NO: 71)
IGLV4	CAGCCTGTGCTGACTCARTCVCCCTC	(SEQ ID NO: 72)
IGLV5	CAGCCTGTGCTGACTCAGCCAACTTC	(SEQ ID NO: 73)
IGLV6	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCAC	(SEQ ID NO: 74)
IGLV7	CAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCC	(SEQ ID NO: 75)
IGLV8	CAGACTGTGGTGACCCAGGAGCC	(SEQ ID NO: 76)
IGLV9	CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACC	(SEQ ID NO: 77)
HC301.5constante	GCAGCCCAGGGCSGCTGTGC	(SEQ ID NO: 78)
Kappa102constante	GCACACAACAGAGGCAGTTCCAG	(SEQ ID NO: 79)
Lambda202constante	CTTGRAGCTCCTCAGAGGAG	(SEQ ID NO: 80)

Las reacciones de amplificación por PCR de la cadena pesada y la cadena ligera se dividieron cada una en dos reacciones como sigue: familias de la cadena pesada VH.1,2,3 (cebadores IGVH1a, IGVH1b, IGVH2, IGVH3) y VH.4,5,6,7 (cebadores IGVH4, IGVH5, IGVH6 e IGVH7); familias de la cadena kappa VK.1,2,3 (cebadores IGKV1, IGKV2 e IGKV3) y VK.4,5,6 (cebadores IGVK4, IGVK5 e IGVK6); y las familias de la cadena lambda VL.1,2,3,4,5 (IGLV1, IGLV2, IGLV3, IGLV4 e IGLV5) y VL.6,7,8,9 (cebadores IGLV6, IGLV7, IGLV8 e IGLV9). Se usó un protocolo de amplificación por PCR con rampa decreciente de temperaturas para los ciclos de temperatura.

Tras la reacción, los productos de amplificación por PCR se trataron con exonucleasa 1 (Exo) y fosfatasa alcalina de gamba (SAP) para eliminar el exceso de nucleótidos y cebadores de cada una de las reacciones de amplificación por PCR (U.S. Biologicals, Marblehead, MA). Los productos de amplificación por PCR inicial se secuenciaron directamente para determinar las secuencias variables tanto de las cadenas pesadas como de las cadenas ligeras usando la secuenciación de Sanger. Las segundas amplificaciones por PCR con cebadores internos se realizaron usando oligonucleótidos variables de la cadena ligera y la cadena pesada concordantes con la estirpe germinal a fin de insertar secuencias señal y de clonación de región constante de mamífero usando los siguientes cebadores de oligonucleótidos.

sVH1a:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA CATTCACAGG (SEQ ID NO: 81)

sVH2:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA CATTCACAGATCACCT (SEQ ID NO: 82)

sVH3vv:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCACAG (SEQ ID NO: 83)

sVH3gl:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCAGAGG (SEQ ID NO: 84)

sVH4:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCACAGGTGCAGCTGCAGG (SEQ ID NO: 85)

sVH5:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCAGAGGTGCA (SEQ ID NO: 86)

sVH6:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCACAGGTACAGC (SEQ ID NO: 87)

sVH7:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCACAGGTGCA (SEQ ID NO: 88)

sVK1:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG (SEQ ID NO: 89)

sVK2:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCAGATATTGTGATGACTCAGTCTCACTCTCCCTGC (SEQ ID NO: 90)

sVK3:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTG (SEQ ID NO: 91)

sVK4:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCAGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTG (SEQ ID NO: 92)

sVK5:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCAGAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGC (SEQ ID NO: 93)

sVK6:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCAGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCG (SEQ ID NO: 94)

sVL1:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCACAGTCTGTGYTGACKCAGCCRCCCTC (SEQ ID NO: 95)

sVL2:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCACAGTCTGCCCTGACTCAGCCT (SEQ ID NO: 96)

sVL3:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCATCCTATGAGCTGACWCAGSHVCCCKC (SEQ ID NO: 97)

sVL4:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCACAGCCTGTGCTGACTCARTCVCCCTC (SEQ ID NO: 98)

sVL5:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCACAGCCTGTGCTGACTCAGCCAACTTC (SEQ ID NO: 99)

sVL6:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCAAATTTTATGCTGACTCAGCCCCAC (SEQ ID NO: 100)

sVL7:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCACAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCC (SEQ ID NO: 101)

sVL8:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCACAGACTGTGGTGACCCAGGAGCC (SEQ ID NO: 102)

wVL9:
CCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTA
CATTCACAGCCTGTGCTGACTCAGCCACC (SEQ ID NO: 103)

Constante de pesada: GCCAGGGGGAAGACCGATG (SEQ ID NO: 104)

Constante de kappa:
CTGGGATAGAAGTTATTCAGCAGGCACACAACAGAAGCAGTTCCAGATTTCAACT
GCTC (SEQ ID NO: 105)

Constante de lambda: CTTGRAGCTCCTCAGAGGAG (SEQ ID NO: 80)

Las reacciones de amplificación por PCR se configuraron usando ADN polimerasa PrimeStar HS con CG (Takara Bio, Shiga, Japón) de acuerdo con la recomendación del fabricante. Tras las reacciones de amplificación por PCR, los productos de amplificación se trataron con Exo/SAP como se describe anteriormente. La cadena variable pesada y la cadena variable ligera que codifican los productos de amplificación por PCR se insertaron en un vector de expresión de mamífero usando procedimientos sin endonucleasas de restricción. Se hibridaron 20 µl de los productos de amplificación por PCR en moldes humanos de ADN monocatenario para IgG_1, la cadena kappa y lambda usando el protocolo de mutagénesis de Kunkel. (Véase Kunkel (1985) PNAS 82: 488-492). Las construcciones correctamente insertadas se confirmaron mediante secuenciación de ADN. Los plásmidos que contienen ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y cadenas ligeras se transfectaron simultáneamente en células de riñón embrionario humano 293T usando reactivo de transfección de Fugene (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN) para determinar la expresión transitoria, y se analizaron para determinar la expresión y la unión como se describe a continuación en el ejemplo 4.

Ejemplo 4. Ensayo de cribado con ELISA de hemaglutinina

Se examinó la capacidad de cada anticuerpo monoclonal antihemaglutinina obtenido como se describe anteriormente para unirse a diversos subtipos de hemaglutinina mediante ELISA como sigue. Se transfectaron diversos plásmidos que expresan hemaglutinina en células 293T como se describe anteriormente. Estos incluyeron hemaglutinina H1 de H1N1/Carolina del Sur/1918, hemaglutinina H3 de H3N2/Perth/2009, hemaglutinina H5 de H5N1/Viet/2004 y hemaglutinina H7 de H7N7/Países Bajos/2003 de los virus de la gripe A. Después de dos días, las células se lisaron en Tris 50 mM, pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1 % más combinado inhibidor de proteasa (Roche). Los núcleos se eliminaron por centrifugación y los lisados resultantes se almacenaron a -80 ºC.

Para el cribado con ELISA, se recubrieron placas de 384 pocillos (Nunc MaxiSorp) con 5 µg/ml de lectina de *Galanthus nivalis* (Sigma) en PBS. Las placas se lavaron y a continuación se recubrieron con diluciones de los lisados celulares que contenían diversas hemaglutininas expresadas. Las placas se lavaron e incubaron con diversas diluciones de los anticuerpos antihemaglutinina y posteriormente con un anticuerpo secundario caprino contra la Ig humana-HRP (Jackson). Las placas se lavaron y procesaron para la detección del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina).

Se obtuvieron aproximadamente 950 plasmoblastos a partir de la separación de células sueltas descrita anteriormente en el ejemplo 2. De esto, 840 anticuerpos monoclonales se expresaron de forma transitoria en células

293T y se cribaron mediante ELISA para determinar su unión a los subtipos H1, H3, H5 y H7 de hemaglutinina, lo que dio como resultado 82 anticuerpos monoclonales que se unieron a la hemaglutinina del grupo 1 o grupo 2 del virus de la gripe A, y 20 anticuerpos monoclonales que se unieron tanto a las hemaglutininas del grupo 1 como del grupo 2 del virus de la gripe A.

Ejemplo 5. Neutralización del virus de la gripe A *in vitro*

Se examinó la capacidad de los anticuerpos antihemaglutinina de la presente invención para provocar la unión amplia del subtipo de hemaglutinina y la neutralización de un panel de aislados del virus del grupo 1 y grupo 2 de la gripe A *in vitro* como sigue.

Las células MDCK se cultivaron en medio DMEM complementado con FBS al 10 % como una única monocapa confluente al 25 % en placas de obtención de imágenes negras con fondo transparente de 96 pocillos (Costar 3904). Se diluyó cada subtipo/cepa del virus de la gripe A en medio para el virus de la gripe (DMEM + BSA al 0,2 %, 2 µg/ml de tripsina tratada con TPCK) a una MOI de 1 y se incubó durante 1 hora a 37 ºC con concentraciones variables (que van desde 0,02 nM hasta 1600 nM) de cada anticuerpo. A cada mezcla de anticuerpo/virus de la gripe se le permitió que infectara células MDCK durante 16 horas a 37 ºC en un incubador con CO_2 al 5 % antes de la fijación de las células con etanol frío al 100 %. A continuación, las células fijadas se tiñeron con Hoechst 33342 (Invitrogen, n.º de cat. H3570) para visualizar los núcleos celulares y determinar el número total de células. Las células también se tiñeron con un anticuerpo monoclonal ampliamente reactivo (n.º de cat. MAB8258 de Millipore) específico para la nucleoproteína del virus de la gripe A a fin de determinar el número de células infectadas.

Se obtuvieron imágenes de las células usando el dispositivo Image Express Micro (Molecular Devices) y las imágenes de datos se analizaron usando el programa informático MetaXpress 3.1. Se determinó el porcentaje de células infectadas y se representó en el eje Y frente al log 10 de la concentración de anticuerpo en el eje X. Todos los ensayos de neutralización se completaron por triplicado. Los datos se ajustaron usando una curva de respuesta a la dosis con regresión no lineal y se presentan en la figura 3 como valores de CI_{50} en nM con intervalos de confianza del 95 % (IC del 95 %).

El subtipo de hemaglutinina (HA) de cada cepa del virus de la gripe A se proporciona en la tabla que se muestra en la figura 3.

Las curvas de respuesta a la dosis de neutralización *in vitro* se generaron usando diversas concentraciones de los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento frente a un amplio panel de cepas del virus del grupo 1 y grupo 2 de la gripe A. Las figuras 4A y 4B muestran las curvas de neutralización de mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) frente a un panel de cepas del virus del grupo 1 y grupo 2 de la gripe A, respectivamente. Como se muestra en las figuras 4A y 4B, el mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) fue eficaz en la neutralización *in vitro* de todas las cepas del virus de la gripe A sometidas a prueba. (Véase también la figura 3). Adicionalmente, las figuras 5A y 5B muestran las curvas de neutralización de mAb 81.39 SVSH-NYP ("SVSH" divulgado como SEQ ID NO: 171) frente a un panel de cepas del virus del grupo 1 y grupo 2 de la gripe A, respectivamente. Como se muestra en las figuras 5A y 5B, el mAb 81.39 SVSH-NYP ("SVSH" divulgado como SEQ ID NO: 171) fue eficaz en la neutralización *in vitro* de todas las cepas del virus de la gripe A sometidas a prueba. (Véase también la figura 3).

Cuatro anticuerpos antihemaglutinina de la presente invención (específicamente mAb 39.18 B11, mAb 36.89, mAb9.01F3 y mAb23.06C2) fueron eficaces *in vitro* en la neutralización de las cepas del virus de la gripe A del grupo 1 o bien del grupo 2, pero no de ambos. Específicamente, el mAb 39.18 B11 fue eficaz en la neutralización *in vitro* de todo el panel del virus de la gripe A del grupo 1 examinado, pero no pudo neutralizar las cepas del virus de la gripe A del grupo 2. (Véanse la figura 6 y la figura 3). A la inversa, el mAb 36.89, el mAb9.01F3 y el mAb23.06C2 pudieron neutralizar todo el panel del virus de la gripe A del grupo 2 examinado, pero no pudieron neutralizar ningún aislado del virus de la gripe A del grupo 1 sometido a prueba. (Véanse las figuras 7, 8 y 9, que muestran curvas de neutralización *in vitro* para el mAb 36.89, el mAb9.01F3 y el mAb23.06C2, respectivamente; véase también la figura 3).

Tomados conjuntamente, estos resultados mostraron que los anticuerpos monoclonales de la presente invención pudieron neutralizar de manera dependiente de la dosis diversos aislados/cepas del virus de la gripe A *in vitro.* Adicionalmente, estos resultados mostraron que la metodología de enriquecimiento de plasmoblastos descrita en el presente documento dio como resultado la identificación de anticuerpos monoclonales que pueden neutralizar las cepas del virus de la gripe A tanto del grupo 1 como del grupo 2 a partir de solo 950 plasmoblastos aislados.

También se realizaron estudios de neutralización *in vitro* usando un virus seudotipado genomanipulado para expresar la hemaglutinina H5 para someter a prueba la eficacia de un anticuerpo de la presente invención en la neutralización del virus de la gripe A H5N1. En particular, se sometió a prueba un virus seudotipado del VIH que porta la proteína de superficie hemaglutinina H5 para determinar su neutralización con mAb 39.29 NCv1 en las células 293T como sigue. El virus seudotipado H5 se produjo por transfección simultánea de las células 293T con tres plásmidos: Δ8.9, FCMV-GFP y un plásmido que expresa la hemaglutinina H5 del aislado del virus de la gripe A

H5N1/Vietnam/1203/2004. El virus se purificó por ultracentrifugación a través de sacarosa al 20 %. Para la infección, se incubó el virus seudotipado con diversas cantidades de mAb 39.29 NCv1 antes de añadirse a las células 293T diana cultivadas en placas de 96 pocillos. Después de dos días, se determinó el número de células infectadas contando las células positivas para GFP. La infección se normalizó con respecto al número de células infectadas a la concentración de anticuerpo más baja usada. Los resultados se presentan en la figura 10. Como se muestra en la figura 10, el mAb 39.29 NCv1 presentó una neutralización *in vitro* dependiente de la dosis frente al virus seudotipado que expresaba la proteína de superficie hemaglutinina H5. Estos datos sugirieron que los anticuerpos de la presente invención serían eficaces en el tratamiento y prevención de las cepas del virus de la gripe A H5N1.

También se sometió a prueba un virus de la gripe equina para determinar la capacidad de los anticuerpos de la presente invención para presentar actividad de neutralización *in vitro* como sigue. El virus de la gripe A H7N7 A/equino/1/Praga/56 se transmitió a las células MDCK hasta que se logró un alto grado de infecciosidad. El virus de la gripe A H7N7 A/equino/1/Praga/ 56 resultante se usó en ensayos de neutralización (usando los procedimientos descritos anteriormente para el mAb 39.29 NCv1) en células MDCK. Los resultados de estos experimentos se presentan en la figura 11. Como se muestra en la figura 11, el mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) presentó una neutralización *in vitro* dependiente de la dosis frente al virus de la gripe H7N7 A/equino/1/Praga/56 que expresaba la proteína de superficie hemaglutinina H7.

Tomados conjuntamente, estos resultados mostraron que los anticuerpos antihemaglutinina de la presente invención presentaron una actividad de neutralización dependiente de la dosis frente a una variedad de cepas del virus de la gripe A. Específicamente, dos anticuerpos antihemaglutinina (mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) y mAb 81.39 SVSH-NYP ("SVSH" divulgado como SEQ ID NO: 171)) fueron eficaces en la neutralización de todas las cepas del virus de la gripe A examinadas, incluyendo la neutralización tanto de las cepas del virus de la gripe A del grupo 1 (A/CA/7/2009, A/Brisbane/59/2007, A/Solomon/3/2006, A/Nueva Caledonia/20/1999, A/PR/8/1934 y A/Japón/305/1957) como de las cepas del virus de la gripe A del grupo 2 (A/Victoria/361/2011, A/Perth/16/2009, A/Brisbane/10/2007, A/Wisconsin/67/2005, A/Victoria/3/1975, A/Port Chalmers/1/1973, A/HK/8/1968 y A/Aichi/2/1968).

Adicionalmente, estos resultados mostraron que los anticuerpos antihemaglutinina de la presente invención (por ejemplo, mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) (figuras 4A y 4B) y mAb 81.39 SVSH-NYP ("SVSH" divulgado como SEQ ID NO: 171) (figuras 5A y 5B) fueron eficaces en la neutralización de una variedad de diferentes cepas del virus de la gripe A H1N1 estacional, cepas del virus de la gripe A H3N2, una cepa del virus de la gripe A H2N2 y la cepa del virus de la gripe A asociada con la pandemia de Japón de 1957 (A/Japón/305/1957). Estos resultados indicaron que los anticuerpos de la presente invención son eficaces en el tratamiento y prevención de la infección por el virus de la gripe A estacional y las cepas del virus de la gripe A asociadas con pandemias de gripe.

Ejemplo 6. Eficacia *in vivo* del mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) en ratones

La eficacia *in vivo* del mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) con respecto a la infección por el virus de la gripe A en ratones se realizó como sigue. Se infectaron ratones DBA/2J (Jackson Lab, Bar Harbor, ME) por vía intranasal con 50 µl de diversas cepas del virus de la gripe A diluidas en medio para el virus de la gripe (DMEM, BSA al 0,2 %, 2 µg/ml de tripsina tratada con TPCK) a la dosis DL_{100} mínima. En esta serie de experimentos se usaron cuatro cepas diferentes del virus de la gripe A que presentan un intervalo de valores de CI_{50} *in vitro*, que incluyen: H1N1 A/PR/8/1934 (Genentech; CI_{50} 2,0 nM), usada a 40 UFP por ratón; H3N2 A/Hong Kong/1/1968 (ViraPur, San Diego, CA; CI_{50} 45,1 nM), usada a 3 UFP por ratón; H3N2 A/Port Chalmers/1/1973 (ViraPur, San Diego, CA; CI_{50} 2,2 nM), usada a $1{,}5x10^4$ UFP por ratón; y H3N2 A/Aichi/2/1968 (ViraPur, San Diego, CA; CI_{50} 35 nM), usada a $2x10^2$ UFP por ratón. Se permitió que la infección por el virus de la gripe progresara durante 72 horas antes de la administración intravenosa de mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177).

Después de 72 horas posteriores a la infección por el virus de la gripe A, se administraron por vía intravenosa a los ratones diversas cantidades de mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) en una dosis de 900 µg/ratón (aproximadamente 45 mg/kg), 300 µg/ratón (aproximadamente 15 mg/kg) y 100 µg/ratón (aproximadamente 5 mg/kg) en 200 µl de PBS. A los animales tratados con control se les administró mAb gD5237 (un anticuerpo monoclonal específico para la glucoproteína D del virus del herpes simple (VHS)) a la dosis equivalente más alta sometida a prueba de mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) (es decir, aproximadamente 45 mg/kg). Los ratones se controlaron diariamente para determinar el acondicionamiento corporal y la supervivencia, y también se pesaron diariamente, hasta 21 días después de la infección. Todas las dosis de mAb39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) frente al control en las cuatro infecciones de la cepa del virus de la gripe A dieron una prueba del orden logarítmico de $P<0{,}01$.

Las figuras 12A, 12B, 12C y 12D muestran el porcentaje de supervivencia (en el tiempo, en días) de ratones a los que se administraron diversas cantidades de mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) 72 horas después de la infección con el virus de la gripe A A/PR/8/1934, A/Port Chalmers/1/1973, A/Hong Kong/1/1968 y A/Aichi/2/1968, respectivamente. Como se muestra en las figuras 12A, 12B, 12C y 12D, se observó una mortalidad del 100 % el día 14 en los ratones infectados a los que se administró el anticuerpo de control. Sin embargo, los

ratones infectados a los que se administró el anticuerpo monoclonal de la presente invención mostraron una supervivencia incrementada. En particular, se observó una supervivencia del 100 % en ratones infectados con el virus de la gripe A/Port Chalmers/1/1973 o el virus de la gripe A/Aichi/2/1968 en todas las dosis de mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) sometidas a prueba. (Véanse las figuras 12B y 12D).

Estos resultados mostraron que los anticuerpos monoclonales de la presente invención son eficaces en el tratamiento de diversas infecciones por el virus de la gripe A. Adicionalmente, estos datos mostraron que los anticuerpos monoclonales de la presente invención fueron eficaces en el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A cuando se administraron por hasta al menos 72 horas posteriores a la infección por el virus de la gripe A.

Ejemplo 7. Eficacia *in vivo* del mAb 39.29 NCv1 en ratones

Para someter a prueba la eficacia *in vivo* del mAb 39.29 NCv1 en ratones, se administró i.v. el anticuerpo a ratones infectados con cuatro diferentes aislados del virus de la gripe A que presentaron un intervalo de valores de CI_{50} *in vitro*. Se infectaron por vía intranasal ratones DBA/2J (Jackson Lab, Bar Harbor, ME) con 50 µl de diferentes cepas del virus de la gripe A diluidas en medio para el virus de la gripe (DMEM, BSA al 0,2 %, 2 µg/ml de tripsina tratada con TPCK) a la dosis DL100 mínima.

En un grupo de experimentos, se usó el aislado del virus de la gripe A H1N1 A/PR/8/1934 a 40 UFP por ratón. A las 72 horas posteriores a la infección, se administró por vía intravenosa mAb 39.29 NCv1 antihemaglutinina a aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 1,7 mg/kg o aproximadamente 0,56 mg/kg en 200 µl de PBS por vía intravenosa. Los animales tratados con control recibieron mAb gD5237, que es específico para la glucoproteína D de VHS a la dosis equivalente más alta sometida a prueba de mAb 39.29 NCv1. Los ratones se controlaron para determinar el acondicionamiento corporal y la supervivencia, y se pesaron hasta 21 días después de la infección.

Para los ratones infectados por H1N1 A/PR/8/1934, una dosis i.v. única de mAb 39.29 NCv1 a 15 mg/kg por ratón fue eficaz en comparación con la observada con el anticuerpo de IgG de control. (Véase la figura 13). Específicamente, se observó una mortalidad de un 100 % en el grupo de tratamiento de control el día 12, mientras que una dosis única de 15 mg/kg de mAb 39.29 NCv1 salvó a un 87,5 % de los ratones infectados. Una triple dosis más baja de 100 µg por ratón (aproximadamente 5 mg/kg) de mAb 39.29 NCv1 presentó cierta eficacia, pudiendo proteger a un 25 % de los animales de la exposición letal, mientras que dosis de aproximadamente 1,7 mg/kg o aproximadamente 0,56 mg/kg mostraron una eficacia mínima más allá de la observada en el grupo de tratamiento de control. (Véase la figura 13).

En otro grupo de experimentos, se examinó adicionalmente la eficacia *in vivo* del mAb 39.29 NCv1 frente a la cepa del virus de la gripe A H3N2 de Hong Kong adaptada al ratón (H3N2 de A/Hong Kong/1/1968), que tiene una CI50 *in vitro* diez veces más alta que A/PR8/1934. Como se observó en los experimentos previos descritos anteriormente, los ratones tratados con el anticuerpo de control tras la infección por el virus de la gripe A mostraron una mortalidad de un 100 % en el día 12. (Véase la figura 14). Sin embargo, una dosis única de mAb 39.29 NCv1 a aproximadamente 45 mg/kg o aproximadamente 15 mg/kg pudo proteger a un 87,5 % y a un 75 % de los ratones, respectivamente. La dosis mínima eficaz de 15 mg/kg *in vivo* del mAb 39.29 NCv1 en modelos de infección por el virus de la gripe A tanto con A/PR8/1934 como con A/Hong Kong/1/1968 es muy similar a pesar del contraste observado en los valores de CI_{50} *in vitro* de mAb 39.29 NCv1 entre estas dos cepas. (Véanse las figuras 3 y 14).

Para explorar adicionalmente la eficacia *in vivo* del mAb 39.29 NCv1, se sometió a prueba una valoración de la dosis de mAb 39.29 NCv1 frente a dos cepas adicionales del virus de la gripe A, Port Chalmers (H3N2 de A/Port Chalmers/1/1973) y Aichi (H3N2 de A/Aichi/2/1968). El mAb 39.29 NCv1 tiene una CI_{50} *in vitro* frente a Port Chalmers de 2,9 nM, que es muy similar a la de A/PR8/1934, mientras que Aichi tiene una CI_{50} *in vitro* de 35,0 nM, un valor más cercano al de A/Hong Kong/1/1968. Como se muestra en la figura 15 y la figura 16, se observó una mortalidad de un 100 % en los animales tratados con control el día 12 y el día 10 para los modelos Port Chalmers y Aichi, respectivamente. El anticuerpo monoclonal 39.29 NCv1 demostró ser muy eficaz frente a ambas cepas del virus de la gripe A en todas las dosis sometidas a prueba (por ejemplo, 45 mg/kg, 15 mg/kg, 5 mg/kg y 1,7 mg/kg).

Estos datos indicaron, en parte, que existía una pequeña correlación entre la CI_{50} *in vitro* del mAb 39.29 NCv1 y la dosis mínima eficaz *in vivo*. No obstante, una dosis única de 15 mg/kg administrada i.v. 72 horas posteriores a la infección fue eficaz en los cuatro modelos de ratón con el virus de la gripe A a pesar del intervalo de los valores de CI_{50} *in vitro* para estas cepas del virus de la gripe A.

Ejemplo 8. Eficacia *in vivo* del mAb 39.29 y oseltamivir en la infección por el virus de la gripe A grave en ratones

Para comparar la eficacia de los anticuerpos antihemaglutinina de la presente invención con la del fosfato de oseltamivir (Tamiflu®) en ratones, se realizaron los siguientes estudios. Se infectaron por vía intranasal ratones Balb/c (Charles River Laboratories, Hollister, CA) a las 6 semanas de edad con 50 µl de H1N1 de A/PR/8/1934 a 100x la dosis letal ($5X10^4$ UFP/ratón). A las 48 horas posteriores a la infección, se administró un anticuerpo 39.29

antihemaglutinina (una mezcla 50:50 de mAb 39.29 D8C2 y mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177)) como una dosis única de aproximadamente 15 mg/kg o IgG de control en 200 µl de PBS por vía intravenosa. En estos experimentos, se comparó una pauta posológica de oseltamivir que consistía en 2 mg dosificados dos veces al día (BID) durante cinco días con una dosis i.v. única de 300 µg (~15 mg/kg) de mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177). Una prueba del orden logarítmico de mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) u oseltamivir frente al control dio $p<0,01$ y una prueba de máxima verosimilitud de mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) frente a oseltamivir dio $p<0,05$. (Oseltamivir (es decir, Tamiflu®) se obtuvo de Toronto Research Chemicals, n.º de cat. 0701000).

Como se muestra en la figura 17, se observó una mortalidad de un 100 % el día 9 en animales tratados con IgG de control (mAb gD5237). El tratamiento BID de oseltamivir durante 5 días solo protegió a un 37,5 % de los ratones de la letalidad. Sin embargo, una dosis única de 15 mg/kg de una mezcla de mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) protegió a un 87,5 % de los animales infectados de la exposición letal al virus de la gripe A. (Véase la figura 17). La dosis de 15 mg/kg totalmente eficaz de la mezcla de mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) dio mejor resultado que el oseltamivir en ratones gravemente infectados con el virus de la gripe A.

Estos resultados mostraron que una dosis única de un anticuerpo monoclonal de la presente invención fue más eficaz en el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A que un tratamiento de 5 días con oseltamivir.

Ejemplo 9. Eficacia *in vivo* del mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) en ratones con y sin coadministración de oseltamivir

La administración de oseltamivir es eficaz en la reducción de la infección por el virus de la gripe A humana si se administra en un plazo de 48 horas después de la aparición de los síntomas. Desafortunadamente, el oseltamivir muestra una eficacia mínima en pacientes que han estado sintomáticos durante más de 48 horas. Por lo tanto, se realizaron los siguientes experimentos para probar si la coadministración de un anticuerpo monoclonal de la presente invención y oseltamivir mostró una eficacia mejorada con respecto a cualquiera de los tratamientos por sí solos. Estos experimentos se realizaron usando el modelo de infección por gripe grave en ratón descrito anteriormente en el ejemplo 8. En resumen, se infectaron ratones Balb/C hembra (Charles River Laboratories) con 100x la dosis letal ($5x10^4$ ufp) de A/PR/8/1934 72 horas antes de la administración i.v. de una dosis única de 100 µg de mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) (aproximadamente 6 mg/kg, una dosis subeficaz determinada previamente), IgG de control, 2 mg BID de oseltamivir o una combinación de una dosis única de mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) y tratamiento con oseltamivir durante 5 días. Una prueba del orden logarítmico del tratamiento de combinación frente a mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) u oseltamivir da $p<0,01$.

Como se esperaba, los animales tratados con IgG de control presentaron un 100 % de mortalidad 9 días posteriores a la infección. (Véase la figura 18). La mortalidad observada para los animales tratados con control fue muy similar a los grupos que recibieron solo oseltamivir o una dosis subeficaz de mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177). Sin embargo, la coadministración de una dosis subeficaz de mAb 39.29 NWPP ("NWPP" divulgado como SEQ ID NO: 177) más oseltamivir mejoró significativamente la supervivencia en comparación con la observada en cualquiera de los tratamientos por sí solos, lo que dio como resultado una supervivencia de un 87,5 %. (Véase la figura 18).

Estos resultados mostraron que se produjo un efecto sinérgico en el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A durante la politerapia usando un anticuerpo monoclonal de la presente invención usado en combinación con oseltamivir, un inhibidor de la neuraminidasa.

Ejemplo 10. Los anticuerpos antihemaglutinina de la presente invención dan mejores resultados que el oseltamivir en un modelo de infección por el virus de la gripe A H5N1 en hurón

Los modelos de infección del virus de la gripe A en hurón a menudo se usan para examinar la eficacia profiláctica y terapéutica de los medicamentos contra la gripe. Los hurones se consideran un modelo animal clínicamente pertinente para la infección por el virus de la gripe A humana. (Véase Matsuoka *et al.*, (2009) *Current Protocols in Microbiology*, capítulo 15, unidad 15G 12).

Para examinar la eficacia *in vivo* del mAb 39.29 D8C2 y mAb 81.39 B1C1 frente a un aislado humano del virus de la gripe A H5N1 en hurones, se realizaron los siguientes estudios. El estudio con H5N1 en hurón se completó bajo contrato en el Lovelace Respiratory Research Institute (Albuquerque, NM). Se expusieron hurones macho (*Mustela putorius furo*) a una dosis intranasal de $1x10^3$ ufp de la cepa del virus de la gripe A H5N1 de A/Vietnam/1203/04 altamente virulenta (dosis DL90). Los animales se infectaron 48 o 72 horas antes de recibir el anticuerpo por i.v. o el oseltamivir (Tamiflu®) por sonda gástrica oral. Los animales tratados con el control recibieron una dosis i.v. de 25 mg/kg de mAB gD5237, un anticuerpo monoclonal específico para la glucoproteína D de VHS. Los animales tratados contra la gripe recibieron una dosis i.v. única de 25 mg/kg de mAb 39.29 D8C2 o bien mAb 81.39 B1C1 a las 48 o 72 horas posteriores a la infección por el virus de la gripe. Cada grupo de tratamiento con anticuerpos

incluía 10 hurones. Los animales tratados con oseltamivir recibieron una dosis oral de 25 mg/kg dos veces al día durante 5 días. Se controlaron los animales diariamente para determinar la pérdida de peso, fiebre y acondicionamiento corporal.

Consecuente con una infección por H5N1, la mayoría de los hurones infectados mostraron signos tempranos de enfermedad de las vías respiratorias altas a las 48 horas posteriores a la infección. Como se esperaba con una dosis letal de H5N1, el grupo de tratamiento con anticuerpo de control negativo presentó una mortalidad de un 90 % a los 14 días posteriores a la inoculación. (Véase las figuras 19A y 19B).

Por el contrario, los hurones que recibieron una dosis única de mAb 39.29 D8C2 a las 48 o bien 72 horas posteriores a la infección por el virus de la gripe mostraron una supervivencia de un 80 % y un 90 % (un 20 % y un 10 % de mortalidad), respectivamente. (Véase la figura 19A). Asimismo, los hurones que recibieron una dosis única de mAb 81.39 B1C1 a las 48 o bien 72 horas posteriores a la infección mostraron una supervivencia de un 100 % y un 80 % (un 0 % y un 20 % de mortalidad), respectivamente. (Véase la figura 19B). Independientemente del tiempo de inicio del tratamiento, los grupos tratados con oseltamivir mostraron una mortalidad de un 50 %.

Estos resultados mostraron que los anticuerpos antihemaglutinina ampliamente neutralizantes de la presente invención eran altamente protectores en el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A grave H5N1 en hurones y dieron mejores resultados que el oseltamivir cuando se administraron ya fuera a las 48 como a las 72 horas posteriores a la infección por el virus de la gripe A.

Ejemplo 11. Cristalización y recogida de datos

A fin de examinar la base estructural de la reactividad cruzada con hemaglutinina de los anticuerpos de la presente invención, se cristalizó simultáneamente el fragmento Fab del mAb 39.29 NCv1 con hemaglutinina H3 recombinante de la cepa del virus de la gripe A humana A/Perth/16/2009 como sigue.

Expresión y purificación de proteínas

Para comprender mejor la base estructural de la neutralización de la hemaglutinina, se determinó la estructura cristalina del fragmento Fab del mAb 39.29 NCv1 en el complejo con hemaglutinina como sigue. Se clonó el ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de la hemaglutinina Perth H3 (H3HA, A/Perth/16/2009, residuos aminoacídicos 25-520 (SEQ ID NO: 226 para la secuencia de aminoácidos de hemaglutinina H3 (H3HA) de longitud completa) en un vector pACGP67 (BD Biosciences) sin cambio de pauta de lectura con un sitio de escisión de trombina (LVPRGS, SEQ ID NO: 106), secuencia de "foldon" de trimerización (PGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLG, SEQ ID NO: 107) y una marca 6xHis C terminal (SEQ ID NO: 108). El baculovirus recombinante se generó mediante transfección simultánea de células *Sf9* con el vector H3HA-pACGP67 y el ADN de baculovirus linealizado (Pharmingen).

Para generar la proteína H3HA recombinante, se infectaron las células PRO *Trichoplusia ni* con el baculovirus recombinante usando una MOI de 1 y se cultivaron durante 72 horas a 27 ºC. Los sobrenadantes celulares se trataron con Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, $CaCl_2$ 5 mM y $NiCl_2$ 1 mM seguido de centrifugación y filtración. A continuación, se concentró el medio y se intercambió el tampón por Tris 10 mM, pH 8,0 y NaCl (TBS) 150 mM que contenía imidazol 20 mM mediante filtración de flujo tangencial, y la proteína se capturó con Ni-agarosa y se eluyó en TBS que contenía imidazol 200 mM. La marca foldon se escindió durante la noche con trombina, y se concentró H3HA y se purificó adicionalmente en una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 16/60 equilibrada en TBS.

Para generar el complejo hemaglutinina-Fab, se expresó el Fab de mAb 39.29 NCv1 (bajo el control del promotor PhoA) en *E. coli* durante la noche a 30 ºC. Las células se sedimentaron mediante centrifugación a 6.000 rpm durante 15 minutos y se lisaron mediante microfluidificación en PBS complementado con EDTA 25 mM y PMSF 1 mM. Los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 1 hora a 4 ºC. El sobrenadante resultante se pasó a través de una columna de proteína G y el Fab se eluyó con ácido acético al 0,58 %. La purificación adicional de Fab de mAb 39.29 NCv1 se logró mediante cromatografía con SP Sepharose usando un gradiente de NaCl de 0 a 1 M en MES 20 mM, pH 5,5. Para generar el complejo HA/39.29, se incubó H3HA durante la noche con un exceso de Fab de mAb 39.29 NCv1, seguido de concentración y cromatografía de exclusión por tamaño con S200 en TBS para aislar el complejo. El complejo se concentró hasta 10 mg/ml para los ensayos de cristalización.

Cristalización

La generación de cristales para el complejo H3HA/Fab de 39.29 NCv1 se encontró en un tampón de fosfato/citrato 0,1M, pH 4,2, usando PEG 300 al 40 % como precipitante (condición C6, pantalla de matriz dispersa JCSG+, Qiagen). Los cristales de calidad de difracción finalmente se cultivaron a 19 ºC en gotas sentadas que contenían 0,1 µl de proteína y 0,1 µl de fosfato/citrato 0,1 M, pH 4,2, PEG 300 al 40 % y 1-butanol al 0,7 %. Se crioprotegieron los cristales en líquido original seguido de congelación instantánea y almacenamiento en nitrógeno líquido. Se recogieron los datos en condiciones de enfriamiento criogénico en la línea de haz de la Canadian Light Source

CMCF-08ID y se procesaron usando MOSFLM y SCALA. El cristal pertenecía al grupo espacial 1213, con dimensiones de celda unitaria de *a*=*b*=*c*=204,4 y α=β=γ=90°.

Determinación de la estructura

Se obtuvieron las fases iniciales mediante reemplazo molecular con PHASER usando la estructura de una H3HA (PDB 3SDY) como modelo de búsqueda. Posteriormente, las porciones Fc y Fv del Fab se colocaron por separado usando PHASER y se sometieron a rondas iniciales de refinado de cuerpo rígido con Phenix. El modelo pasó por varias rondas de ajuste iterativo con COOT e hibridación simulada, coordenadas y refinado de factor b con Phenix. Se añadieron las moléculas de glúcido encontradas en los sitios de glucosilación unidos a Asn usando el paquete Carboload de Phenix, y las rondas finales de refinado se llevaron a cabo usando REFMAC5. El modelo final se refinó a 3,1 Å con valores R/Rfree de 19,9 y 25,9 %, respectivamente. Los datos estadísticos de Ramachandran calculados mediante Molprobity indican que un 89,7 % de los residuos se encuentran en regiones favorecidas con un 1,1 % de valores atípicos.

Se analizaron los contactos usando el programa informático Protein Interfaces, Surfaces, and Assemblies (PISA) y se prepararon las figuras estructurales con PYMOL.

Ejemplo 12. Caracterización estructural del epítopo 39.29 en la hemaglutinina H3

Como se describe anteriormente en el ejemplo 11, el fragmento Fab del mAb 39.29 NCv1 se cristalizó simultáneamente con hemaglutinina H3 recombinante de la cepa del virus de la gripe A humana A/Perth/16/2009. La estructura cristalina del complejo anticuerpo/hemaglutinina se determinó a una resolución de 3,1 Å. La estructura global de la hemaglutinina H3 A/Perth/16/2009 era similar a las estructuras de hemaglutinina determinadas previamente, con la excepción de reordenamientos leves y la alteración del conector de la hélice 1/hélice 2 de HA2. Se ha visto previamente una alteración en estas localizaciones en condiciones de cristalización de pH bajo, que es consecuente con la cristalización de este complejo a pH 4,2 (Ekiert *et al.*, (2011) Science 333:843-850). La estructura cristalina del complejo anticuerpo/HA mostró una única molécula Fab del mAb 39.29 enlazada a cada monómero del trímero de HA H3 no escindido. Tanto los fragmentos de cadena ligera como los de cadena pesada de Fab del mAb 39.29 NCv1 se resolvieron bien, permitiendo un examen detallado de la interacción de Fv con HA.

Se determinó que el epítopo para mAb 39.29 NCv1 está en la región del tallo de la hemaglutinina H3, aproximadamente en la parte superior de la hélice A de HA2. Esta región del tallo de la hemaglutinina se identificó por primera vez como un epítopo ampliamente neutralizante para los virus de la gripe A que expresan los subtipos de hemaglutinina del grupo 1 (Ekiert *et al.*, (2009) Science 324:246-251; Sui *et al.*, (2009) Nature Structural & Molecular Biology 16:265-273)), y más recientemente como un epítopo neutralizante para las cepas del virus de la gripe A que portan los subtipos de hemaglutinina del grupo 1 y grupo 2 (Corti *et al.*, (2011) Science 333:850-856). El anticuerpo mAb 39.29 NCv1 usa extensos contactos de la cadena pesada y ligera para ocultar aproximadamente 1175 $Å^2$ del área de superficie del tallo de la hemaglutinina. La cadena pesada del mAb 39.29 NCv1 contribuye a la unión en gran parte a través de un bucle CDRH3 hidrófobo extendido que se inserta en una ranura no polar poco profunda adyacente a la hélice A de HA2 y debajo de un sitio de glucosilación de hemaglutinina del grupo 2 conservado en Asn54. Este bucle CDRH3 extiende la cadena lateral Phe99 para interactuar con Thr334, Ile390 e Ile393 de la hemaglutinina H3, mientras establece contactos polares de cadena principal con la GlcNAc unida a Asn54 de la hemaglutinina H3. El bucle CDRH3 del mAb 39.29 NCv1 también realiza un giro β en Gly100, que probablemente esté estabilizado por los contactos de cadena principal entre bucles entre Val98 e Ile100A. Ile100A está orientada hacia abajo para interactuar con Trp366 de una hemaglutinina H3 conservada, mientras que Val98 y Pro100C también establecen contactos de van der Waals con el tallo de la hemaglutinina H3. Residiendo en la interfase de la cadena pesada/ligera, Pro100D y Trp100E terminan el bucle largo CDRH3 y actúan para anclar el bucle en su lugar.

La cadena ligera del mAb 39.29 NCv1 también contribuye significativamente a la interacción con el tallo de la hemaglutinina H3, estableciendo contactos con el tallo de la hemaglutinina H3 con los tres bucles CDR de la cadena ligera, así como los residuos estructurales. De los aproximadamente 1100 $Å^2$ del área de superficie oculta de hemaglutinina, la cadena ligera contribuye ~60 % (640 $Å^2$ frente a 480 $Å^2$ para la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente). La Asn32 de CDRL1 forma un enlace de hidrógeno con los residuos Asp391 y Asn394 de la hélice A de HA2 de H3, mientras que la His31 de CDRL1 se apila contra la cadena lateral de Asn376 de la hemaglutinina H3. Ser52 en el bucle CDRL2 también establece un contacto polar con Asn398. Dentro del bucle CDRL3, el esqueleto de Asn93 se pone en contacto con Asp391, mientras que Trp94 establece una interacción catión-π con Lys384 en la hélice A de HA2. De forma interesante, el mAb 39.29 también establece una serie de contactos estructurales con la hemaglutinina, principalmente a través de interacciones de esqueleto de la repetición SGSGSG (SEQ ID NO: 109) en la hebra beta 6 de IgKV3 con los residuos aminoacídicos 403 a 405 en el polipéptido de la hemaglutinina H3. Ser67 de mAb 39.29 NCv1 también establece interacciones polares con Asp48 y Thr404 de hemaglutinina H3.

Los tres bucles CDR de la cadena ligera del mAb 39.89 NCv1 contribuyen a la unión del epítopo del tallo de HA H3, lo que representa aproximadamente un 60 % del área de superficie total oculta. Esta gran dependencia de los

contactos de la cadena ligera es única entre los anticuerpos de unión y neutralización del grupo 1 y el grupo 2 de hemaglutinina conocidos, contribuyendo la cadena ligera del anticuerpo F16v3 en solo un 20 % al área de superficie oculta y a que la cadena ligera del anticuerpo CR9114 no establezca contacto con el epítopo.

Aunque estructuralmente conservados, los subtipos de hemaglutinina del grupo 1 y el grupo 2 divergen significativamente en el nivel de secuencia de aminoácidos primarios. Para comparar los residuos de contacto de H3HA del mAb 39.29 NCv1 con otros subtipos de hemaglutinina, se alineó la secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina H3 del virus de la gripe A/Perth/16/2009 con secuencias de aminoácidos de hemaglutinina representativas de otras cepas del virus de la gripe: H1HA de A/California/07/2009; H2HA de A/Japón/305/1957; H5HA de A/Vietnam/1203/2004; y H7HA de A/pollo/NSW/1/1997. La numeración de aminoácidos de la hemaglutinina H3 de A/Perth/16/2009 en la estructura cristalina coincide con la secuencia H3 de hemaglutinina usada en la alineación. La alineación de la secuencia de hemaglutinina se generó usando clustalW y las secuencias de aminoácidos correspondientes a la hemaglutinina H1 de A/California/07/2009, hemaglutinina H2 de A/Japón/305/1957, hemaglutinina H3 de A/Perth/19/2009, hemaglutinina H5 de A/Vietnam/1203/2004 y hemaglutinina H7 de A/pollo/NSW/1/1997. La estructura cristalina se usó para determinar los residuos de contacto entre el fragmento Fab de 39.29 NCv1 y el tallo de hemaglutinina H3.

La alineación se presenta en la figura 20. Los residuos de contacto con hemaglutinina (sombreados en gris) se definen como los residuos dentro de 4,5 Å del mAb 39.29 NCv1. Cada residuo aminoacídico que tenía más de un 50 % de su área de superficie disponible oculta por el Fab del mAb 39.29 NCv1 está marcado con un asterisco.

Se observa un alto grado de conservación de la secuencia entre los residuos de contacto que contribuyen significativamente a la unión del mAb 39.29 NCv1 a este epítopo. (Véase la figura 20). Esta observación sugiere que el mAb 39.29 NCv1 se une a las moléculas de hemaglutinina del grupo 1 y el grupo 2 por medio del mismo epítopo del tallo visto en la estructura cristalina descrita anteriormente. Este epítopo es similar a un epítopo de hemaglutinina identificado para el anticuerpo antihemaglutinina FI6v3 (Corti *et al.*, (2011), *supra*). Sin embargo, el mAb 39.29 NCv1 se une en una orientación diferente con respecto al tallo de hemaglutinina que el FI6v3. La comparación de las estructuras de 39.29 NCv1, F16v3 y CR9114 en complejo con HA reveló que los tres anticuerpos se unen a un epítopo que incluye la hélice A de HA2 y los grupos no polares adyacentes. Sin embargo, cada uno de los tres anticuerpos tiene una orientación de unión única, con cada cadena pesada enlazada a una posición topográfica similar en HA pero con el posicionamiento de la cadena ligera girada en ~60° (F16v3) o ~120° (CR9114) en comparación con 39.29 NCv1. También único para el mAb 39.29 NCv1, la repetición SGSGSG de la cadena ligera de IgKV3 (SEQ ID NO: 109) en la región estructural de la hebra beta 6 establece contacto con HA H3. Por lo tanto, la estructura 39.29 representa una tercera solución para la unión de este epítopo altamente conservado y consolida la importancia de acoplar la hélice A de HA2 para la neutralización amplia del virus de la gripe A.

Los datos de cristalografía del mAb 39.29 en complejo con hemaglutinina H3 de la cepa del virus de la gripe A humana A/Perth/16/2009 revelaron las siguientes posiciones de contacto: 34, 36, 54, 70, 292, 294, 305, 307, 334, 363, 364, 365, 366, 379, 380, 382, 383, 384, 386, 387, 390, 391, 393, 394, 395, 397, 398, 401, 403, 404 y 405. El anticuerpo FI6v3 mostró las siguientes posiciones de contacto: 334, 352, 356, 363, 364, 365, 366, 381, 383, 384, 386, 387, 388, 390, 391, 393, 394, 397, 398, 401 y 402. Las posiciones de residuos aminoacídicos corresponden a la hemaglutinina H3 de la cepa del virus de la gripe A A/Perth/16/2009 (SEQ ID NO: 226). (Véanse las publicaciones de solicitud Internacional n.^{os}: WO 2010/010466 y WO 2013/011347; Corti *et al*. (2011) Science 333:850-856). Aunque se observa cierto solapamiento, el mAb 39.29 mostró un mayor número de posiciones de contacto dentro de la hemaglutinina que FI6v3.

El hecho de que las CDR del anticuerpo mAb 39.29 NCv1 y FI6v3 no tengan homología de secuencia y que ambos anticuerpos se acoplen a un epítopo del tallo similar pero no idéntico de diferentes formas sugiere que existen diversas formas para que los anticuerpos se unan al epítopo del tallo conservado y neutralicen ampliamente los virus de la gripe A.

Ejemplo 13. ELISA de competición

Los ensayos ELISA de competición se desarrollaron usando hemaglutinina H1 del virus de la gripe A/WSN/1933 y hemaglutinina H3 del virus de la gripe A/Hong Kong/8/1968. Se permitió que las placas ELISA recubiertas con hemaglutinina se unieran al anticuerpo de prueba a diversas concentraciones (eje X) antes de la adición de concentraciones de saturación de mAb 39.29 marcado con biotina. Si el anticuerpo de prueba competía por el epítopo de hemaglutinina del mAb 39.29, la señal ELISA de biotina (eje Y) disminuyó en función del incremento de la concentración del anticuerpo de prueba. Los datos de unión se ajustaron con una curva de respuesta a la dosis no lineal para determinar el valor de CE_{50} dado en nM.

La IgG de mAb 39.29 se biotiniló a través de un acoplamiento de amina de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante (Sulfo-NHS-LC-LC, Pierce, Rockford, IL). La concentración patrón final del mAb biotinilado fue de 13,2 mM. Para determinar la concentración óptima para el uso, el 39.29 biotinilado se valoró en serie frente a hemaglutinina H1 inmovilizada del virus de la gripe A A/WSN/1933 y hemaglutinina H3 del virus de la gripe A A/Hong Kong/8/1968. Las proteínas hemaglutinina H1 y H3 recombinantes se diluyeron hasta 2 µg/ml en solución salina

tamponada con fosfato (PBS) y se distribuyeron (100 µl) en placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp (Nunc, Rochester, NY). Las placas se recubrieron durante la noche a 4 ºC, se enjuagaron con PBS y a continuación se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS que contenía seroalbúmina bovina al 1 % (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

A continuación, cada placa recibió 100 µl de mAb 39.29 biotinilado diluido en serie, empezando a una concentración inicial de 88 nM con diluciones 1/3 en PBS que contenía BSA al 1,0 % y polisorbato 20 al 0,05 % (Sigma-Aldrich). Después de una hora de incubación, se lavaron las placas y a continuación se incubaron con 100 µl de una dilución 1:5000 de peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina (Caltag Laboratories, Carlsbad, CA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se lavaron las placas y se revelaron con 100 µl de sustrato TMB (Kirkegaard y Perry Laboratories, Inc. Gaithersburg, MD). Se leyeron las placas en un lector de placas SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA.) a una D.O. de 450 nM. Se determinó que la concentración óptima de mAb biotinilado era de 1 nM.

Se incubaron diversas concentraciones (eje x) de los anticuerpos monoclonales 39.18, 36.89, 81.39 39.29, mAb 9, mAb 23 de la presente invención e IgG de control con las placas recubiertas con hemaglutinina durante 30 minutos a temperatura ambiente. La concentración inicial fue de 200 nM seguido de diluciones en serie de 3 veces. Se añadió mAb 39.29 biotinilado a una concentración de subsaturación final de 1 nM. Tras una hora de incubación, se lavaron las placas y se incubaron con 100 µl de una dilución 1:5000 de peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina durante 45 minutos. Se lavaron las placas y a continuación se revelaron con solución TMB. Si el anticuerpo de prueba competía por el epítopo HA del mAb 39.29, la señal ELISA de biotina (eje Y) disminuyó en función del incremento de la concentración del anticuerpo de prueba. Los datos de unión se ajustaron con una curva de respuesta a la dosis no lineal para determinar el valor de CE_{50} dado en nM.

Las figuras 21A y 21B muestran los resultados del análisis ELISA de competición de los mAb para la unión a H1HA de A/NWS/1933 (figura 21A) o H3HA de A/HK/8/1968 (figura 21B). Los resultados mostraron que el mAb 39.29, el mAb 81.39, el mAb 39.18 y el mAb 36.89 se unen todos a un epítopo del tallo de hemaglutinina solapado (figuras 21A y 21B). Específicamente, el mAb 81.39 y el mAb 39.18 compiten por la unión del mAb 39.29 en el tallo de la hemaglutinina H1 (figura 21A), mientras que el mAb 81.39 y el mAb 36.89 compiten por la unión con el mAb 39.29 por el epítopo del tallo identificado en la hemaglutinina H3 (figura 21B).

Usando los ensayos ELISA de competición, se estableció que los anticuerpos monoclonales 81.39, 39.18, 36.89, mAb 9 y mAb 23 se unen al epítopo del tallo altamente conservado de la hemaglutinina identificado por el análisis estructural. Específicamente, el mAb 81.39 y el mAb 39.18 compiten por la unión del mAb 39.29 en el tallo de la hemaglutinina H1 del grupo 1. Adicionalmente, el mAb 81.39, el mAb 36.89, el mAb 9 y el mAb 23 compiten por la unión con el mAb 39.29 por el epítopo del tallo identificado en la hemaglutinina H3 del grupo 2. Como se predijo, dado que el mAb 39.18 neutraliza solo los aislados de la gripe A del grupo 1, no compite por la unión del epítopo del mAb 39.29 en la hemaglutinina del grupo 2. Asimismo, el mAb 36.89, el mAb 9 y el mAb 23 solo neutralizan los aislados de la gripe A del grupo 2 y, por lo tanto, no compiten por la unión del mAb 39.29 a la hemaglutinina H1 del grupo 1. Los datos de estos experimentos se resumen adicionalmente en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Aislado de la gripe	Subtipo de HA	MAb 39.18	MAb 39.29	MAb 81.39	MAb 36.89	MAb 9	MAb 23
A/NWS/1933	Grp1/H1	0,88	2,8	2,15	-	-	-
A/HK/8/1968	Grp2/H3	-	2,54	4,2	1,32	8,42	1,84

CE50 dada en nM

- Indica CE50 >200 nM

Ejemplo 14: Seguridad y farmacocinética del anticuerpo contra el virus de la gripe A en voluntarios sanos

Se realizó un estudio de fase 1 de dosis única ascendente de mAb 39.29-NWPP en sujetos humanos de sexo masculino y femenino sanos de 18 años de edad o más. La dosis inicial para investigar la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética en sujetos adultos sanos se realizó mediante administración i.v. de una dosis única (1,5 mg/kg, 5 mg/kg, 15 mg/kg o 45 mg/kg) de mAb39.29. El mAb39.29 era seguro y bien tolerado en todos los niveles de dosis después de un período de seguimiento de al menos 58 días para el nivel de dosis de 45 mg/kg y de 120 días para el nivel de dosis de 1,5 mg/kg. No se informaron de acontecimientos adversos graves relacionados con el fármaco del estudio.

Las concentraciones séricas de mAb 39.29 presentaron una disposición bifásica con una fase de distribución rápida inicial seguida de una fase de eliminación lenta. El mAb39.29 demostró una farmacocinética (PK) lineal. La media de $C_{máx}$ se incrementó de una manera proporcional a la dosis de 33,5 µg/ml para el grupo de dosis de 1,5 mg/kg y 1180 µg/ml para el grupo de dosis de 45 mg/kg. De forma similar, la media del $ABC_{0\text{-infinito}}$ del grupo fue de 518 y 5530 µg/ml*día para los grupos de dosis de 1,5 mg/kg y 15 mg/kg, respectivamente, y es aproximadamente proporcional a la dosis. Sobre la base de los datos de PK disponibles en sujetos de sexo masculino y femenino

sanos, el mAb 39.29 parecía tener un perfil de PK consecuente con el de un anticuerpo humano IgG1 típico con una media de semivida de aproximadamente 20 días (media del intervalo 19,3-22,2).

Ejemplo 15. Estudio de fase 2 del anticuerpo contra la hemaglutinina del virus de la gripe A

Un estudio clínico de fase 2 de un anticuerpo contra la hemaglutinina del virus de la gripe A de la presente invención se realiza como sigue. A individuos hospitalizados que tienen una infección por el virus de la gripe A se les administra un anticuerpo contra la hemaglutinina del virus de la gripe A de la presente invención mediante administración intravenosa, en una dosis de 1,5 mg/kg, 5 mg/kg, 15 mg/kg o 45 mg/kg.

De forma alternativa, se les administra un anticuerpo a los individuos en una dosis fija de 120 mg, 400 mg, 1200 mg o 3600 mg. También se les puede administrar a los individuos oseltamivir (Tamiflu®) (el tratamiento habitual actual) antes de, en el momento de o posteriormente a la administración del anticuerpo contra la hemaglutinina del virus de la gripe A. En general, se usa una pauta posológica de una sola vez del anticuerpo, aunque se contemplan dosis posteriores.

La administración de un anticuerpo contra la hemaglutinina del virus de la gripe A de la presente invención muestra eficacia en el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A, incluyendo la reducción de la infecciosidad del virus de la gripe A, la reducción de la duración de la estancia hospitalaria, la reducción o prevención de la necesidad del uso de la unidad de cuidados intensivos, la reducción o prevención de la necesidad de respiración asistida o mecánica o la reducción o prevención de la necesidad del uso de oxigenoterapia.

Los resultados de la administración de un anticuerpo contra la hemaglutinina del virus de la gripe A de la presente invención muestra eficacia en el tratamiento de la infección por el virus de la gripe A mediante la reducción del tiempo de normalización de la actividad respiratoria (tal como una reducción del tiempo de normalización de la frecuencia respiratoria o una reducción del tiempo de normalización de la saturación de oxígeno), reducción del tiempo de regreso a la saturación de oxígeno normal, por ejemplo, a una saturación de oxígeno de aproximadamente un 92 % o más, como se mide durante un periodo de 24 horas sin administración de oxigenoterapia o reducción del tiempo de normalización de las constantes vitales, tales como la frecuencia cardíaca, tensión arterial, frecuencia respiratoria y temperatura.

Análisis estadístico

Los datos estadísticos se calcularon usando el programa informático JMP versión 9.0.2 (SAS Institute). Los experimentos de supervivencia se compararon usando la prueba del orden logarítmico. Los valores de $p<0,05$ se consideraron significativos. Las curvas y los valores de CI_{50} se representaron y calcularon usando el programa informático Graphpad Prism versión 5.0.

Aunque la invención anterior se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC. *ET AL*.

<120> ANTiCUERPOS ANTIHEMAGLUTININA Y PROCEDIMIENTOS DE USO

<130> P4982R1-WO

<140>
<141>

<150> 61/725.859
<151> 13-11-2012

<160> 245

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 1
atcgtttcat aagcgcgcca ggtgcagctg gtgcagtc 38

<210> 2
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 2
atcgtttcat aagcgcgcca grtcaccttg aaggagtc 38

<210> 3
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 3
atcgtttcat aagcgcgcga ggtgcagctg gtggagtc 38

<210> 4
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 4
atcgtttcat aagcgcgcca ggtgcagctg gtggagtc 38

<210> 5
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 5
atcgtttcat aagcgcgcga agtgcagctg gtggagtc 38

<210> 6
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 6
atcgtttcat aagcgcgcca ggtgcagctg caggagtc 38

<210> 7
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 7
atcgtttcat aagcgcgcca gctgcagctg caggagtc 38

<210> 8
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 8
atcgtttcat aagcgcgcga rgtgcagctg gtgcagtc 38

<210> 9
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 9
atcgtttcat aagcgcgcca ggtacagctg cagcagtc 38

<210> 10
<211> 38
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 10
atcgtttcat aagcgcgcca ggtgcagctg gtgcaatc 38

<210> 11
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 11
atcgtttcat aagcgcgcca ggtccagctt gtgcagtc 38

<210> 12
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 12
atcgtttcat aagcgcgcca ggttcagctg gtgcagtc 38

<210> 13
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 13
atcgtttcat aagcgcgcca ggtccagctg gtacagtc 38

<210> 14
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 14
atcgtttcat aagcgcgcca gatgcagctg gtgcagtc 38

<210> 15
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 15
atcgtttcat aagcgcgcca aatccagctg gtgcagtc 38

<210> 16
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 16
atcgtttcat aagcgcgcga ggtccagctg gtgcagtc 38

<210> 17
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 17
atcgtttcat aagcgcgcga ggtgcagctg ttggagtc 38

<210> 18
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 18
atcgtttcat aagcgcgcga ggtgcagctg gtggagac 38

<210> 19
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 19
atcgtttcat aagcgcgcca ggtgcagcta cagcagtg 38

<210> 20
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 20
gacattctac gagctagctg aggagacagt gaccagggt 39

<210> 21
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 21
gacattctac gagctagctg aggagacggt gaccagggt 39

<210> 22
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 22
gacattctac gagctagctg aagagacggt gaccattgtc 40

<210> 23
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 23
gacattctac gagctagctg aggagacggt gaccgtgg 38

<210> 24
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 24
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcg 60

acatccagwt gacccagtc 79

<210> 25
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 25
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcg 60

atgttgtgat gactcagtc 79

<210> 26

<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 26
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcg 60

aaattgtgwt gacrcagtc 79

<210> 27
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 27
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcg 60

atattgtgat gacccacac 79

<210> 28
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 28
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcg 60

aaacgacact cacgcagtc 79

<210> 29
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 29
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcg 60

aaattgtgct gactcagtc 79

<210> 30
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 30
agttcatgcc atggttttga tttccacctt ggtccctt 38

<210> 31
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 31
agttcatgcc atggttttga tctccacctt ggtccc 36

<210> 32
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 32
agttcatgcc atggttttga tatccacttt ggtcccag 38

<210> 33
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 33
agttcatgcc atggttttga tctccagctt ggtccct 37

<210> 34
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 34
agttcatgcc atggttttaa tctccagtcg tgtccctt 38

<210> 35
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 35
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcc 60

agtctgtgct gactcagcc 79

<210> 36
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 36
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcc 60

agtctgtgyt gacgcagcc 79

<210> 37
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 37
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcc 60

agtctgtcgt gacgcagcc 79

<210> 38
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 38
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcc 60
artctgccct gactcagcc 79

<210> 39
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 39
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagct 60

cctatgwgct gactcagcc 79

<210> 40
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 40
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagct 60

cttctgagct gactcagga 79

<210> 41
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 41
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcc 60

acgttatact gactcaacc 79

<210> 42
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 42
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcc 60
aggctgtgct gactcagcc 79

<210> 43
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 43
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagca 60

attttatgct gactcagcc 79

<210> 44
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 44
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcc 60

agrctgtggt gacycagga 79

<210> 45
<211> 79
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 45
tctcctcagc tagcggtggc ggcggttccg gaggtggtgg ttctggcggt ggtggcagcc 60

wgcctgtgct gactcagcc 79

<210> 46
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 46
agttcatgcc atggttagga cggtgacctt ggtcc 35

<210> 47
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 47
agttcatgcc atggttagga cggtcagctt ggtcc 35

<210> 48
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 48
agttcatgcc atggtgagga cggtcagctg ggtg 34

<210> 49
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 49
atcgtttcat aagcgcgcsa 20

<210> 50
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 50
agttcatgcc atggttttga t 21

<210> 51
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 51
agttcatgcc atggtkagga c 21

<210> 52
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 52
gaagtagtcc ttgaccaggc ag 22

<210> 53
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 53
ctcagcgtca gggtgytgct gag 23

<210> 54
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 54
gggtktggts gtctccac 18

<210> 55
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 55
caggtgcagc tggtgcagtc tggggc 26

<210> 56
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 56
caggtccagc tggtgcagtc tggggc 26

<210> 57
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 57
caggtcacct tgaaggagtc tggtcc 26

<210> 58
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 58
gaggtgcagc tggtggagtc tggggg 26

<210> 59
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 59
caggtgcagc tgcaggagtc gggccc 26

<210> 60
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 60
gaggtgcagc tggtgcagtc tgg 23

<210> 61
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 61
caggtacagc tgcagcagtc aggtcc 26

<210> 62
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 62
caggtgcagc tggtgcaatc tgg 23

<210> 63
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 63
ghcatccrgw tgacccagtc tc 22

<210> 64
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 64
gatrttgtga tgacycagwc tc 22

<210> 65
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 65
gaaatwgtrw tgacrcagtc tc 22

<210> 66
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 66
gacatcgtga tgacccagtc tcc 23

<210> 67
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 67
gaaacgacac tcacgcagtc tc 22

<210> 68
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 68
gawrttgtgm tgacwcagtc tc 22

<210> 69
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 69
cagtctgtgy tgackcagcc rccctc 26

<210> 70
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 70
cagtctgccc tgactcagcc t 21

<210> 71
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 71
tcctatgagc tgacwcagsh vccckc 26

<210> 72
<211> 26

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 72
cagcctgtgc tgactcartc vccctc 26

<210> 73
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 73
cagcctgtgc tgactcagcc aacttc 26

<210> 74
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 74
aattttatgc tgactcagcc ccac 24

<210> 75
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 75
caggctgtgg tgactcagga gccc 24

<210> 76
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 76
cagactgtgg tgacccagga gcc 23

<210> 77
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 77
cagcctgtgc tgactcagcc acc 23

<210> 78
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 78
gcagcccagg gcsgctgtgc 20

<210> 79
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 79
gcacacaaca gaggcagttc cag 23

<210> 80
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 80
cttgragctc ctcagaggag 20

<210> 81
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 81
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cacagg 66

<210> 82
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 82

ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cacagatcac ct 72

<210> 83
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 83
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cacag 65

<210> 84
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 84
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cagagg 66

<210> 85
<211> 78
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 85
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cacaggtgca gctgcagg 78

<210> 86
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 86
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cagaggtgca 70

<210> 87
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 87
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cacaggtaca gc 72

<210> 88
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 88
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cacaggtgca 70

<210> 89
<211> 95
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 89
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cagacatcca gatgacccag tctccatcct ccctg 95

<210> 90
<211> 95
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 90
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cagatattgt gatgactcag tctcactctc cctgc 95

<210> 91
<211> 101
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 91

ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cagaaattgt gttgacacag tctccagcca ccctgtcttt g 101

<210> 92
<211> 101
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 92
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cagacatcgt gatgacccag tctccagact ccctggctgt g 101

<210> 93
<211> 88
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 93
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cagaaacgac actcacgcag tctccagc 88

<210> 94
<211> 94
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 94
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cagaaattgt gctgactcag tctccagact ttcg 94

<210> 95
<211> 88
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 95
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cacagtctgt gytgackcag ccrccctc 88

<210> 96
<211> 83
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 96
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cacagtctgc cctgactcag cct 83

<210> 97
<211> 88
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 97
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

catcctatga gctgacwcag shvccckc 88

<210> 98
<211> 88
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 98
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cacagcctgt gctgactcar tcvccctc 88

<210> 99
<211> 88
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 99
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cacagcctgt gctgactcag ccaacttc 88

<210> 100
<211> 86
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 100

ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

caaattttat gctgactcag ccccac 86

<210> 101
<211> 86
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 101
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cacaggctgt ggtgactcag gagccc 86

<210> 102
<211> 85
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 102
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cacagactgt ggtgacccag gagcc 85

<210> 103
<211> 85
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 103
ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt 60

cacagcctgt gctgactcag ccacc 85

<210> 104
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 104
gccaggggga agaccgatg 19

<210> 105
<211> 59
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 105
ctgggataga agttattcag caggcacaca acagaagcag ttccagattt caactgctc 59

<210> 106
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 106
Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5

<210> 107
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 107
Pro Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr
1 5 10 15

Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu Gly
20 25 30

<210> 108
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: marcador 6xHis sintético"

<400> 108
His His His His His His
1 5

<210> 109
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 109
Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 110
<211> 455
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 110

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe His Asn Arg
            20                  25                  30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Leu Ile Tyr Phe Asp Gly Ser Lys Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Val Pro Gly Pro Ile Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
            100                 105                 110

Asp His Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
                165                 170                 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
        195                 200                 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
    210                 215                 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240
```

```
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
    290                 295                 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
                325                 330                 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
            340                 345                 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
        355                 360                 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
    370                 375                 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385                 390                 395                 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
                405                 410                 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
            420                 425                 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 111
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 111

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe His Asn Arg
            20                  25                  30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Leu Ile Tyr Phe Asp Gly Ser Lys Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Val Pro Gly Pro Ile Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
            100                 105                 110

Asp His Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 112
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 112

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

```
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 113
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 113

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45
```

```
Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 114
<211> 455
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 114

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe His Asn Arg
            20                  25                  30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Leu Ile Tyr Phe Asp Gly Ser Lys Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Val Pro Gly Pro Ile Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
            100                 105                 110

Asp His Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
    130                 135                 140
```

```
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
                165                 170                 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
        195                 200                 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
    210                 215                 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
    290                 295                 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
                325                 330                 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
            340                 345                 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
        355                 360                 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
    370                 375                 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
```

385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 115
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 115
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe His Asn Arg
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Leu Ile Tyr Phe Asp Gly Ser Lys Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Val Pro Gly Pro Ile Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
100 105 110

Asp His Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 116
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 116

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Tyr Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210                 215
```

<210> 117

<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 117

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Tyr Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 118
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 118

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45
```

```
Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 119
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 119

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn
            20                  25                  30
```

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 120
<211> 349
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 120
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe His Asn Arg
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Leu Ile Tyr Phe Asp Gly Ser Lys Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Val Pro Gly Pro Ile Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
100 105 110

Asp His Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

```
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
                165                 170                 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
        195                 200                 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
    210                 215                 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
    290                 295                 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
                325                 330                 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
            340                 345
```

<210> 121
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 121

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 122
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 122

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 123
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 123

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

```
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 124
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 124

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45
```

```
Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 125
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 125

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140
```

```
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 126
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 126

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 127
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 127

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 128
<211> 109
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 128

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 129
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 129

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45
```

```
Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
     50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 130
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 130

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn
            20                  25                  30
```

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Phe Pro Pro
85 90 95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 131
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 131
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Tyr Pro Pro
85 90 95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

```
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 132
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 132

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr Asn Tyr Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 133
<211> 455

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 133

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

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

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

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

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

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

Ala Val Pro Gly Pro Val Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
            100                 105                 110

Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
                165                 170                 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
        195                 200                 205
```

```
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
    210                 215                 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
    290                 295                 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
                325                 330                 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
            340                 345                 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
        355                 360                 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
    370                 375                 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385                 390                 395                 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
                405                 410                 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
            420                 425                 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 134
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 134

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

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

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

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

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

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

Ala Val Pro Gly Pro Val Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
            100                 105                 110

Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 135
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 135

```
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser His Asn
            20                  25                  30
```

```
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 136
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 136

```
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15
```

```
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 137
<211> 455
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 137

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

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

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

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

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

Ala Val Pro Gly Pro Val Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
            100                 105                 110
```

```
Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
                165                 170                 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
        195                 200                 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
    210                 215                 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
    290                 295                 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
                325                 330                 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
            340                 345                 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
        355                 360                 365
```

```
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
    370                 375                 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385                 390                 395                 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
                405                 410                 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
            420                 425                 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 138
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 138

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

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

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

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

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

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

Ala Val Pro Gly Pro Val Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
            100                 105                 110

Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 139
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 139

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190
```

```
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 140
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 140

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 141
<211> 455
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 141

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

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

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

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

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

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

Ala Val Pro Gly Pro Val Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
            100                 105                 110

Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
                165                 170                 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
        195                 200                 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
    210                 215                 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270
```

```
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
    290                 295                 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
                325                 330                 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
            340                 345                 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
        355                 360                 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
    370                 375                 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385                 390                 395                 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
                405                 410                 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
            420                 425                 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 142
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 142

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

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

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

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

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

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

Ala Val Pro Gly Pro Val Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
            100                 105                 110

Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 143
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 143

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95
```

```
Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 144
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 144

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
```

```
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 145
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 145

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175
```

```
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 146
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 146

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 147
<211> 455
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 147

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

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

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

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

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

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

Ala Val Pro Gly Pro Val Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
            100                 105                 110

Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
                165                 170                 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
        195                 200                 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
    210                 215                 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255
```

```
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
    290                 295                 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
                325                 330                 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
            340                 345                 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
        355                 360                 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
    370                 375                 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385                 390                 395                 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
                405                 410                 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
            420                 425                 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 148
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 148

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

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

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

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

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

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

Ala Val Pro Gly Pro Val Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
            100                 105                 110

Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 149
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 149

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80
```

```
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Asn Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 150
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 150

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

```
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Asn Phe Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 151
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 151

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Asn Tyr Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160
```

```
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 152
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 152

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Asn Tyr Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 153
<211> 450
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 153

```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1               5                  10                  15

Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ala Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Val Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Arg Gln Gln Leu Tyr Lys Gly Tyr Tyr His His Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240
```

```
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445

Gly Lys
    450
```

<210> 154
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 154

```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1               5                   10                  15

Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ala Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Val Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Arg Gln Gln Leu Tyr Lys Gly Tyr Tyr His His Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 155
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 155

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ala Asn Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Asp Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

```
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 156
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 156

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ala Asn Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45
```

```
Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Asp Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
     50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                   70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro
                 85                  90                  95

Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 157
<211> 450
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 157

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Gly Val Lys Lys Pro Gly Ser
1                5                  10                  15

Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ala Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                   70                  75                  80

Met Glu Val Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                 85                  90                  95

Ala Arg Arg Gln Gln Leu Tyr Lys Gly Tyr Tyr His His Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140
```

```
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
```

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 158
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 158
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Gly Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ala Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gln Gln Leu Tyr Lys Gly Tyr Tyr His His Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 159
<211> 455
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 159

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Arg Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Thr Gly Asn Thr His Tyr Ala Lys Asn Phe
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Val Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Ala Met Ile Gln Gly Val Val Thr Leu Tyr Leu Arg Pro Gly
            100                 105                 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
                165                 170                 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
        195                 200                 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
```

```
    210                 215                 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
    290                 295                 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
                325                 330                 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
            340                 345                 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
        355                 360                 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
    370                 375                 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385                 390                 395                 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
                405                 410                 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
            420                 425                 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 160
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 160

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Arg Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Thr Gly Asn Thr His Tyr Ala Lys Asn Phe
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Val Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Ala Met Ile Gln Gly Val Val Thr Leu Tyr Leu Arg Pro Gly
            100                 105                 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 161
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 161

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Trp
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
```

```
        35                  40                  45

Tyr Lys Val Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Thr Ser Asn Ser Gln
                85                  90                  95

Gly Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 162
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 162

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Trp
```

```
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Lys Val Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Thr Ser Asn Ser Gln
                85                  90                  95

Gly Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 163
<211> 452
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 163

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Gln Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Ala Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Phe Gly Gly Thr His Tyr Ala Arg Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Ala Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Asp Arg Leu Ile Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Val Arg Trp Arg Ala Ala Ala Val Ile Met Asp Gln Phe Tyr Lys Met
            100                 105                 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
```

```
        115                 120                 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
    130                 135                 140

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
                165                 170                 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
        195                 200                 205

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Arg Glu
    210                 215                 220

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
225                 230                 235                 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
                245                 250                 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
            260                 265                 270

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
        275                 280                 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
    290                 295                 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305                 310                 315                 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
                325                 330                 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
            340                 345                 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ala Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
        355                 360                 365
```

```
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
    370                 375                 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385                 390                 395                 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
                405                 410                 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
            420                 425                 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
        435                 440                 445

Ser Leu Gly Lys
    450
```

<210> 164
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 164

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Gln Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Ala Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Phe Gly Gly Thr His Tyr Ala Arg Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Ala Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Asp Arg Leu Ile Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Val Arg Trp Arg Ala Ala Ala Val Ile Met Asp Gln Phe Tyr Lys Met
            100                 105                 110
```

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

<210> 165
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 165
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Tyr Asn
20 25 30

Pro Val Ser Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Thr Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Thr Leu
85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 166
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 166
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Tyr Asn
20 25 30

Pro Val Ser Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Thr Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Thr Leu
85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 167
<211> 447
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 167
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Leu Ile Gly Thr Gly

```
            20                  25                  30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr His Pro Ser
    50                  55                  60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Asp Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu
65                  70                  75                  80

Phe Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Gln Tyr Tyr
                85                  90                  95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
    130                 135                 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
        195                 200                 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Arg Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
    210                 215                 220

Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225                 230                 235                 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                245                 250                 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
            260                 265                 270
```

```
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        275                 280                 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    290                 295                 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                 310                 315                 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
                325                 330                 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            340                 345                 350

Pro Ala Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        355                 360                 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    370                 375                 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385                 390                 395                 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                405                 410                 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            420                 425                 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 168
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 168

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Leu Ile Gly Thr Gly
            20                  25                  30
```

```
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Met Glu
        35                  40                  45

Trp Ile Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr His Pro Ser
    50                  55                  60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Asp Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu
65                  70                  75                  80

Phe Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Gln Tyr Tyr
                85                  90                  95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 169
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 169

```
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Pro Pro Val Thr Leu Gly
1               5                   10                  15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
            20                  25                  30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr His Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
                85                  90                  95

Thr His Trp Pro Leu Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 170
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 170
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Pro Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr His Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Thr His Trp Pro Leu Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 171
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 171
Ser Val Ser His
1

<210> 172
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 172
Ser Val Asp Ser
1

<210> 173
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 173
Ser Val Ser Ser
1

<210> 174
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 174
Ser Val Asp His
1

<210> 175
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 175
Asn Phe Pro Pro
1

<210> 176
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 176
Asn Tyr Pro Pro
1

<210> 177
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 177
Asn Trp Pro Pro
1

<210> 178
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 178
Gly Phe Ala Phe His Asn Arg Ala Met His
1 5 10

<210> 179
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 179
Ala Leu Ile Tyr Phe Asp Gly Ser Lys Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 180
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 180
Ala Val Pro Gly Pro Ile Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
1 5 10 15

Asp His Trp

<210> 181
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 181
Ala Val Pro Gly Pro Ile Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
1 5 10 15

Asp His

<210> 182
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 182
Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 183
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 183
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser His Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 184
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 184
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 185
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 185
Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp His Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 186
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 186
Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 187
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 187
Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 188
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 188
Gln His Tyr Thr Asn Trp Pro Pro Arg Leu Thr
1 5 10

<210> 189
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 189

Gln His Tyr Thr Asn Tyr Pro Pro Arg Leu Thr
1 5 10

<210> 190
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 190
Gln His Tyr Thr Asn Phe Pro Pro Arg Leu Thr
1 5 10

<210> 191
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 191
Gly Leu Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Val His
1 5 10

<210> 192
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 192
Gly Pro Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Val His
1 5 10

<210> 193
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 193
Thr Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Ala Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 194
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 194
Ala Val Pro Gly Pro Val Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Asn

<210> 195
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 195
Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser His Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 196
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 196
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser
1 5

<210> 197
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 197
Gln His Tyr Ser Asn Trp Pro Pro Arg Leu Thr
1 5 10

<210> 198
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 198
Gln His Tyr Ser Asn Phe Pro Pro Arg Leu Thr
1 5 10

<210> 199
<211> 11
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 199
Gln His Tyr Ser Asn Tyr Pro Pro Arg Leu Thr
1 5 10

<210> 200
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 200
Gly Ser Ile Phe Ser Asn Tyr Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 201
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 201
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ala Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
1 5 10 15

Gln Gly

<210> 202
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 202
Ala Arg Arg Gln Gln Leu Tyr Lys Gly Tyr Tyr His His
1 5 10

<210> 203
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 203
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ala Asn Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 204
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 204
Gly Ala Ser Thr Arg Asp Thr
1 5

<210> 205
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 205
Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 206
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 206
Gly Tyr Ser Phe Asn Asn Tyr Gly Ile Asn
1 5 10

<210> 207
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 207
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Thr Gly Asn Thr His Tyr Ala Lys Asn Phe
1 5 10 15

Glu Gly

<210> 208
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 208
Ala Arg Ala Met Ile Gln Gly Val Val Thr Leu Tyr Leu Arg Pro Gly
1 5 10 15

Asp Tyr Trp

<210> 209
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 209
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Trp Leu Ala
1 5 10

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 210
Lys Val Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 211
Gln Arg Tyr Thr Ser Asn Ser Gln Gly Phe Thr
1 5 10

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 212
Gly Tyr Thr Phe Asn Ala Tyr Tyr Ile His
1 5 10

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 213
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Phe Gly Gly Thr His Tyr Ala Arg Lys Phe
1 5 10 15

Gln Gly

<210> 214
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 214
Val Arg Trp Arg Ala Ala Ala Val Ile Met Asp Gln Phe Tyr Lys Met
1 5 10 15

Asp Val

<210> 215
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 215
Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Tyr Asn Pro Val Ser
1 5 10

<210> 216
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 216
Ser Asn Thr Glu Arg Pro Ser
1 5

<210> 217
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 217

Ala Ala Trp Asp Asp Thr Leu Asn Gly Pro Val
1 5 10

<210> 218
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 218
Gly Gly Leu Ile Gly Thr Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5 10

<210> 219
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 219
Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr His Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 220
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 220
Ala Arg Tyr Asn Trp Gly Ile Arg Tyr Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 221
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 221
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Ser
1 5 10 15

<210> 222
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 222
Lys Ile Ser Asn Arg Asp Ser
1 5

<210> 223
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 223
Met Gln Ala Thr His Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 224
<211> 566
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A

<220>
<221> MOD_RES
<222> (239)..(240)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 224
Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
1 5 10 15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val
50 55 60

Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

Val Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
100 105 110

```
Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
        115                 120                 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp
    130                 135                 140

Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser
145                 150                 155                 160

Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
                165                 170                 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
            180                 185                 190

Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu
        195                 200                 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser
    210                 215                 220

Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Xaa Xaa
225                 230                 235                 240

Glu Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys
                245                 250                 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe
            260                 265                 270

Ala Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro
        275                 280                 285

Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn
    290                 295                 300

Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys
305                 310                 315                 320

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
                325                 330                 335

Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
            340                 345                 350

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
        355                 360                 365
```

```
His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser
    370                 375                 380

Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
385                 390                 395                 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
                405                 410                 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
            420                 425                 430

Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
        435                 440                 445

Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
    450                 455                 460

Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
465                 470                 475                 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
                485                 490                 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
            500                 505                 510

Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg Ile Tyr
        515                 520                 525

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val
    530                 535                 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
545                 550                 555                 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
                565
```

<210> 225
<211> 562
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A

<400> 225

```
Met Ala Ile Ile Tyr Leu Ile Leu Leu Phe Thr Ala Val Arg Gly Asp
1               5                   10                  15
```

```
Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Met Val Asp
            20                  25                  30

Thr Ile Leu Glu Arg Asn Val Thr Val Thr His Ala Lys Asp Ile Leu
        35                  40                  45

Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Asn Gly Ile Pro Pro
    50                  55                  60

Leu Glu Leu Gly Asp Cys Ser Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro
65                  70                  75                  80

Glu Cys Asp Arg Leu Leu Ser Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Met Glu
                85                  90                  95

Lys Glu Asn Pro Arg Asp Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn Asp
            100                 105                 110

Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Ser Val Lys His Phe Glu Lys
        115                 120                 125

Val Lys Ile Leu Pro Lys Asp Arg Trp Thr Gln His Thr Thr Thr Gly
    130                 135                 140

Gly Ser Arg Ala Cys Ala Val Ser Gly Asn Pro Ser Phe Phe Arg Asn
145                 150                 155                 160

Met Val Trp Leu Thr Lys Lys Gly Ser Asp Tyr Pro Val Ala Lys Gly
                165                 170                 175

Ser Tyr Asn Asn Thr Ser Gly Glu Gln Met Leu Ile Ile Trp Gly Val
            180                 185                 190

His His Pro Asn Asp Glu Thr Glu Gln Arg Thr Leu Tyr Gln Asn Val
        195                 200                 205

Gly Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Lys Arg Ser Thr
    210                 215                 220

Pro Glu Ile Ala Thr Arg Leu Lys Val Asn Gly Gln Gly Gly Arg Met
225                 230                 235                 240

Glu Phe Ser Trp Thr Leu Leu Asp Met Trp Asp Thr Ile Asn Phe Glu
                245                 250                 255

Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Glu Tyr Gly Phe Lys Ile Ser Lys
            260                 265                 270
```

```
Arg Gly Ser Ser Gly Ile Met Lys Thr Glu Gly Thr Leu Glu Asn Cys
        275                 280                 285

Glu Thr Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Ala Ile Asn Thr Thr Leu Pro
    290                 295                 300

Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val
305                 310                 315                 320

Lys Ser Glu Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val Pro Gln
                325                 330                 335

Ile Glu Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly
            340                 345                 350

Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn
        355                 360                 365

Asp Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala
    370                 375                 380

Phe Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn
385                 390                 395                 400

Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Ser Asn Leu Glu Arg Arg
                405                 410                 415

Leu Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp
            420                 425                 430

Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu
        435                 440                 445

Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Met
    450                 455                 460

Gln Leu Arg Asp Asn Val Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe
465                 470                 475                 480

Tyr His Lys Cys Asp Asp Glu Cys Met Asn Ser Val Lys Thr Gly Thr
                485                 490                 495

Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Glu Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Asn Glu
            500                 505                 510

Ile Lys Gly Val Lys Leu Ser Ser Met Gly Val Tyr Gln Ile Leu Ala
```

515 520 525

Ile Tyr Ala Thr Val Ala Gly Ser Leu Ser Leu Ala Ile Met Met Ala
530 535 540

Gly Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile
545 550 555 560

Cys Ile

<210> 226
<211> 566
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A

<400> 226
Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val Phe Ala
1 5 10 15

Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
20 25 30

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Ile Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp
35 40 45

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr
50 55 60

Gly Glu Ile Cys Asp Ser Pro His Gln Ile Leu Asp Gly Lys Asn Cys
65 70 75 80

Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro Gln Cys Asp Gly Phe Gln
85 90 95

Asn Lys Lys Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Tyr Ser Asn
100 105 110

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val
115 120 125

Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Asn Asn Glu Ser Phe Asn Trp Thr
130 135 140

Gly Val Thr Gln Asn Gly Thr Ser Ser Ala Cys Ile Arg Arg Ser Lys
145 150 155 160

Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr His Leu Asn Phe Lys
165 170 175

```
Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Glu Gln Phe Asp Lys
            180                 185                 190

Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Gly Thr Asp Lys Asp Gln Ile
        195                 200                 205

Phe Leu Tyr Ala Gln Ala Ser Gly Arg Ile Thr Val Ser Thr Lys Arg
    210                 215                 220

Ser Gln Gln Thr Val Ser Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Arg Val Arg
225                 230                 235                 240

Asn Ile Pro Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly
                245                 250                 255

Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Gly
            260                 265                 270

Tyr Phe Lys Ile Arg Ser Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg Ser Asp Ala
        275                 280                 285

Pro Ile Gly Lys Cys Asn Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile
    290                 295                 300

Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile Thr Tyr Gly Ala
305                 310                 315                 320

Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met
                325                 330                 335

Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala
            340                 345                 350

Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly
        355                 360                 365

Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Arg Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys
    370                 375                 380

Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Leu
385                 390                 395                 400

Ile Gly Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser
                405                 410                 415

Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr
```

420 425 430

Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu
435 440 445

Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe
450 455 460

Glu Lys Thr Lys Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn
465 470 475 480

Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser
485 490 495

Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu
500 505 510

Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys
515 520 525

Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys
530 535 540

Val Ala Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile
545 550 555 560

Arg Cys Asn Ile Cys Ile
565

<210> 227
<211> 568
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A

<400> 227
Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65 70 75 80

```
Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
                85                  90                  95

Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
            100                 105                 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
        115                 120                 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser
    130                 135                 140

Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
145                 150                 155                 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
                165                 170                 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
            180                 185                 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
        195                 200                 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
    210                 215                 220

Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
225                 230                 235                 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
                245                 250                 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
            260                 265                 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
        275                 280                 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
    290                 295                 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305                 310                 315                 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
```

325 330 335

Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
340 345 350

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
355 360 365

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
370 375 380

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
385 390 395 400

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
405 410 415

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
420 425 430

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
435 440 445

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
450 455 460

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
465 470 475 480

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
485 490 495

Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
500 505 510

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
515 520 525

Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
530 535 540

Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
545 550 555 560

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 228
<211> 562
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A

<400> 228

```
Met Asn Thr Arg Ile Leu Ile Leu Thr Leu Thr Ala Val Ile His Thr
1               5                  10                  15

Asn Ala Asp Lys Ile Cys Leu Gly His His Ala Val Ser Asn Gly Thr
            20                  25                  30

Lys Val Asn Thr Leu Thr Glu Arg Gly Val Glu Val Val Asn Ala Thr
        35                  40                  45

Glu Thr Val Glu Gln Met Asn Ile Pro Arg Ile Cys Thr Lys Gly Lys
    50                  55                  60

Lys Ala Ile Asp Leu Gly Gln Cys Gly Leu Leu Gly Ile Val Thr Gly
65                  70                  75                  80

Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Thr Ala Asp Leu Ile Ile
                85                  90                  95

Glu Arg Arg Glu Gly Asn Asp Val Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn
            100                 105                 110

Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg Gly Ser Gly Gly Ile Asn Lys
        115                 120                 125

Glu Thr Thr Gly Phe Thr Tyr Ser Gly Ile Arg Thr Asn Gly Val Thr
    130                 135                 140

Ser Ala Cys Arg Arg Ser Glu Ser Ser Phe Tyr Ala Glu Met Lys Trp
145                 150                 155                 160

Leu Leu Ser Asn Thr Asp Asn Ala Ala Phe Pro Gln Met Thr Lys Ser
                165                 170                 175

Tyr Lys Asn Thr Arg Asn Glu Pro Ala Leu Ile Val Trp Gly Ile His
            180                 185                 190

His Ser Gly Ser Thr Thr Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gly Ser Gly Ser
        195                 200                 205

Lys Leu Ile Thr Val Gly Ser Ser Asn Tyr Gln Gln Ser Phe Val Pro
    210                 215                 220
```

```
Ser Pro Gly Ala Arg Pro Gln Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile Asp
225                 230                 235                 240

Phe His Trp Leu Ile Leu Asn Pro Asn Asp Thr Val Thr Phe Ser Phe
                245                 250                 255

Asn Gly Ala Phe Val Ala Pro Asp Arg Val Ser Phe Phe Lys Gly Glu
            260                 265                 270

Ser Thr Gly Ile Gln Ser Glu Val Pro Val Asp Ala Asn Cys Glu Gly
        275                 280                 285

Glu Cys Tyr His Ser Gly Gly Thr Ile Thr Ser Asn Leu Pro Phe Gln
    290                 295                 300

Asn Val Asn Ser Arg Ala Val Gly Lys Cys Pro Lys Tyr Val Lys Gln
305                 310                 315                 320

Lys Ser Leu Leu Leu Ala Thr Gly Met Lys Asn Val Pro Glu Ile Pro
                325                 330                 335

Arg Lys Arg Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu
            340                 345                 350

Asn Gly Trp Glu Gly Leu Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln
        355                 360                 365

Asn Ser Gln Gly Glu Gly Thr Ala Ala Asp Tyr Lys Ser Thr Gln Ser
    370                 375                 380

Ala Ile Asp Gln Ile Thr Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr
385                 390                 395                 400

Asn Gln Gln Phe Glu Leu Ile Asp Asn Glu Phe Asn Glu Val Glu Lys
                405                 410                 415

Gln Ile Gly Asn Val Ile Asn Trp Thr Arg Asp Ser Ile Thr Glu Val
            420                 425                 430

Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr
        435                 440                 445

Ile Asp Leu Ala Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Tyr Glu Arg Val Arg
    450                 455                 460
```

```
Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Glu Asp Gly Thr Gly Cys Phe Glu
465                 470                 475                 480

Ile Phe His Lys Cys Asp Asp Asp Cys Met Ala Ser Ile Arg Asn Asn
                485                 490                 495

Thr Tyr Asp His Ser Thr Tyr Arg Glu Glu Ala Met Gln Asn Arg Leu
            500                 505                 510

Lys Ile Asp Pro Val Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Val Ile Leu
        515                 520                 525

Trp Phe Ser Phe Gly Ala Ser Cys Phe Leu Leu Leu Ala Ile Ala Met
    530                 535                 540

Gly Leu Gly Phe Ile Cys Val Lys Asn Gly Asn Met Arg Cys Thr Ile
545                 550                 555                 560

Cys Ile
```

<210> 229
<211> 566
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A

<400> 229

```
Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
1               5                   10                  15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
            20                  25                  30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
        35                  40                  45

Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val
    50                  55                  60

Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65                  70                  75                  80

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
                85                  90                  95

Val Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
            100                 105                 110
```

```
Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
        115                 120                 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp
    130                 135                 140

Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser
145                 150                 155                 160

Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
                165                 170                 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
            180                 185                 190

Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu
        195                 200                 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser
    210                 215                 220

Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
225                 230                 235                 240

Glu Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys
                245                 250                 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe
            260                 265                 270

Ala Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro
        275                 280                 285

Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn
    290                 295                 300

Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys
305                 310                 315                 320

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
                325                 330                 335

Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
            340                 345                 350
```

```
Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
        355                 360                 365

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser
    370                 375                 380

Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
385                 390                 395                 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
                405                 410                 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
            420                 425                 430

Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
        435                 440                 445

Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
    450                 455                 460

Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
465                 470                 475                 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
                485                 490                 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
            500                 505                 510

Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg Ile Tyr
        515                 520                 525

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val
    530                 535                 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
545                 550                 555                 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
                565
```

<210> 230
<211> 565
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A

<400> 230

```
Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Tyr Ala Phe Val Ala Thr Asp
1               5                  10                  15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
            20                  25                  30

Val Asp Thr Ile Phe Glu Lys Asn Val Ala Val Thr His Ser Val Asn
```

```
        35                  40                  45

Leu Leu Glu Asp Arg His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Lys Gly Ile
    50                  55                  60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Thr Gly Trp Leu Leu Gly
65                  70                  75                  80

Asn Pro Glu Cys Asp Ser Leu Leu Pro Ala Arg Ser Trp Ser Tyr Ile
                85                  90                  95

Val Glu Thr Pro Asn Ser Glu Asn Gly Ala Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
            100                 105                 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Leu
        115                 120                 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
    130                 135                 140

Phe Asn Gly Val Thr Val Ser Cys Ser His Arg Gly Lys Ser Ser Phe
145                 150                 155                 160

Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Lys Lys Gly Asp Ser Tyr Pro Lys
                165                 170                 175

Leu Thr Asn Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu
            180                 185                 190

Trp Gly Val His His Pro Ser Ser Ser Asp Glu Gln Gln Ser Leu Tyr
        195                 200                 205

Ser Asn Gly Asn Ala Tyr Val Ser Val Ala Ser Ser Asn Tyr Asn Arg
    210                 215                 220

Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val Lys Asp Gln His
225                 230                 235                 240

Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
                245                 250                 255

Ile Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala
            260                 265                 270

Leu Ser Arg Gly Phe Glu Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser Met
        275                 280                 285
```

```
His Glu Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ser Ile Asn Ser
    290                 295                 300

Asn Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
305                 310                 315                 320

Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn
                325                 330                 335

Ile Pro Ser Ile Gln Tyr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
            340                 345                 350

Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His
        355                 360                 365

His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr
    370                 375                 380

Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu
385                 390                 395                 400

Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu
                405                 410                 415

Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu
            420                 425                 430

Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu
        435                 440                 445

Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Leu Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys
    450                 455                 460

Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys
465                 470                 475                 480

Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg
                485                 490                 495

Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn
            500                 505                 510

Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Gln
        515                 520                 525

Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
    530                 535                 540
```

Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
545 550 555 560

Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 231
<211> 566
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A

<400> 231
Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Phe Cys Leu Ala Leu Gly
1 5 10 15

Gln Asp Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
20 25 30

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asp Asp
35 40 45

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr
50 55 60

Gly Lys Ile Cys Asn Asn Pro His Arg Ile Leu Asp Gly Ile Asp Cys
65 70 75 80

Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Val Phe Gln
85 90 95

Asn Glu Thr Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Phe Ser Asn
100 105 110

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val
115 120 125

Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Ile Thr Glu Gly Phe Thr Trp Thr
130 135 140

Gly Val Thr Gln Asn Gly Gly Ser Asn Ala Cys Lys Arg Gly Pro Gly
145 150 155 160

Asn Gly Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr Lys Ser Gly Ser Thr
165 170 175

Tyr Pro Val Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Asp Asn Phe Asp Lys
180 185 190

```
Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Asn Gln Glu Gln Thr
        195                 200                 205

Ser Leu Tyr Val Gln Glu Ser Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Arg Arg
    210                 215                 220

Ser Gln Gln Ser Ile Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Trp Val Arg
225                 230                 235                 240

Gly Gln Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly
                245                 250                 255

Asp Val Leu Val Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Gly
            260                 265                 270

Tyr Phe Lys Met Arg Thr Gly Lys Ser Ser Ile Met Ser Ser Asp Ala
        275                 280                 285

Pro Ile Asp Thr Cys Ile Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile
    290                 295                 300

Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Ile Thr Tyr Gly Ala
305                 310                 315                 320

Cys Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met
                325                 330                 335

Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala
            340                 345                 350

Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly
        355                 360                 365

Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys
    370                 375                 380

Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val
385                 390                 395                 400

Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser
                405                 410                 415

Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr
            420                 425                 430

Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu
        435                 440                 445
```

```
Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe
    450                 455                 460

Glu Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn
465                 470                 475                 480

Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Glu Ser
                485                 490                 495

Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu
            500                 505                 510

Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys
        515                 520                 525

Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys
    530                 535                 540

Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Arg Gly Asn Ile
545                 550                 555                 560

Arg Cys Asn Ile Cys Ile
                565
```

<210> 232
<211> 562
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A

<400> 232

```
Met Asn Thr Gln Ile Leu Val Phe Ala Leu Val Ala Ser Ile Pro Thr
1               5                   10                  15

Asn Ala Asp Lys Ile Cys Leu Gly His His Ala Val Ser Asn Gly Thr
            20                  25                  30

Lys Val Asn Thr Leu Thr Glu Arg Gly Val Glu Val Val Asn Ala Thr
        35                  40                  45

Glu Thr Val Glu Arg Thr Asn Val Pro Arg Ile Cys Ser Lys Gly Lys
    50                  55                  60

Arg Thr Val Asp Leu Gly Gln Cys Gly Leu Leu Gly Thr Ile Thr Gly
65                  70                  75                  80

Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Ser Ala Asp Leu Ile Ile
                85                  90                  95
```

```
Glu Arg Arg Glu Gly Ser Asp Val Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn
            100                 105                 110

Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ile Asp Lys
        115                 120                 125

Glu Thr Met Gly Phe Thr Tyr Ser Gly Ile Arg Thr Asn Gly Thr Thr
    130                 135                 140

Ser Ala Cys Arg Arg Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Glu Met Lys Trp
145                 150                 155                 160

Leu Leu Ser Asn Thr Asp Asn Ala Ala Phe Pro Gln Met Thr Lys Ser
                165                 170                 175

Tyr Lys Asn Thr Arg Lys Asp Pro Ala Leu Ile Ile Trp Gly Ile His
            180                 185                 190

His Ser Gly Ser Thr Thr Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gly Ser Gly Asn
        195                 200                 205

Lys Leu Ile Thr Val Gly Ser Ser Asn Tyr Gln Gln Ser Phe Val Pro
    210                 215                 220

Ser Pro Gly Ala Arg Pro Gln Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile Asp
225                 230                 235                 240

Phe His Trp Leu Ile Leu Asn Pro Asn Asp Thr Val Thr Phe Ser Phe
                245                 250                 255

Asn Gly Ala Phe Ile Ala Pro Asp Arg Ala Ser Phe Leu Arg Gly Lys
            260                 265                 270

Ser Met Gly Ile Gln Ser Glu Val Gln Val Asp Ala Asn Cys Glu Gly
        275                 280                 285

Asp Cys Tyr His Ser Gly Gly Thr Ile Ile Ser Asn Leu Pro Phe Gln
    290                 295                 300

Asn Ile Asn Ser Arg Ala Val Gly Lys Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln
305                 310                 315                 320

Glu Ser Leu Leu Leu Ala Thr Gly Met Lys Asn Val Pro Glu Ile Pro
                325                 330                 335

Lys Arg Arg Arg Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu
            340                 345                 350
```

```
Asn Gly Trp Glu Gly Leu Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln
        355                 360                 365

Asn Ala Gln Gly Glu Gly Thr Ala Ala Asp Tyr Lys Ser Thr Gln Ser
    370                 375                 380

Ala Ile Asp Gln Ile Thr Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr
385                 390                 395                 400

Asn Gln Gln Phe Glu Leu Ile Asp Asn Glu Phe Thr Glu Val Glu Arg
                405                 410                 415

Gln Ile Gly Asn Val Ile Asn Trp Thr Arg Asp Ser Met Thr Glu Val
            420                 425                 430

Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr
        435                 440                 445

Ile Asp Leu Ala Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Tyr Glu Arg Val Lys
    450                 455                 460

Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Glu Asp Gly Thr Gly Cys Phe Glu
465                 470                 475                 480

Ile Phe His Lys Cys Asp Asp Asp Cys Met Ala Ser Ile Arg Asn Asn
                485                 490                 495

Thr Tyr Asp His Ser Lys Tyr Arg Glu Glu Ala Ile Gln Asn Arg Ile
            500                 505                 510

Gln Ile Asp Pro Val Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Val Ile Leu
        515                 520                 525

Trp Phe Ser Phe Gly Ala Ser Cys Phe Ile Leu Leu Ala Ile Ala Met
    530                 535                 540

Gly Leu Val Phe Ile Cys Val Lys Asn Gly Asn Met Arg Cys Thr Ile
545                 550                 555                 560

Cys Ile
```

<210> 233
<211> 566
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A

<400> 233

```
Met Glu Ala Arg Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Phe Ala Ala Thr Asn
1               5                  10                  15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
            20                  25                  30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
        35                  40                  45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Lys Gly Ile
    50                  55                  60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly
65                  70                  75                  80

Asn Pro Glu Cys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
                85                  90                  95

Val Glu Thr Ser Asn Ser Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
            100                 105                 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
        115                 120                 125

Glu Lys Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Glu
    130                 135                 140

Thr Thr Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser Tyr Ala Gly Ala Ser Ser
145                 150                 155                 160

Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Lys Lys Gly Ser Ser Tyr Pro
                165                 170                 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
            180                 185                 190

Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Thr Gly Thr Asp Gln Gln Ser Leu
        195                 200                 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Ser Val Gly Ser Ser Lys Tyr Asn
    210                 215                 220

Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Ala Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
225                 230                 235                 240

Ala Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr
                245                 250                 255
```

```
Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe
            260                 265                 270

Ala Leu Asn Arg Gly Ser Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asp Ala Pro
        275                 280                 285

Val His Asp Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro His Gly Ala Ile Asn
    290                 295                 300

Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys
305                 310                 315                 320

Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Ala Thr Gly Leu Arg
                325                 330                 335

Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
            340                 345                 350

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
        355                 360                 365

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser
    370                 375                 380

Thr Gln Asn Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
385                 390                 395                 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn
                405                 410                 415

Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
            420                 425                 430

Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
        435                 440                 445

Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Arg Asn Leu Tyr Glu
    450                 455                 460

Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
465                 470                 475                 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asp Ala Cys Met Glu Ser Val
                485                 490                 495

Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
            500                 505                 510
```

Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr
515 520 525

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu
530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 234
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 234
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Lys
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Val Pro Gly Pro Val Phe Gly Ile Phe Pro Pro Trp Ser Tyr Phe
100 105 110

Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 235
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 235

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser His Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Arg Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 236
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 236

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 237
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 237
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 238
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 238

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

<210> 239
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 239

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 240
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 240

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

<210> 241
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 241

```
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1               5                   10                  15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
            20                  25                  30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
```

35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 242
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 242
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 243
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 243

```
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1               5                  10                  15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
            20                  25                  30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 244
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 244

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
            20                  25                  30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
    50                  55                  60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65                  70                  75                  80
```

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 245
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 245
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antihemaglutinina aislado que comprende tres regiones hipervariables de la cadena pesada (HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3) y tres regiones hipervariables de la cadena ligera (HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3), en el que:

   (a) HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 191;

   (b) HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 193;

   (c) HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 194;

   (d) HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 195;

   (e) HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 196; y

   (f) HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 197.

2. El anticuerpo antihemaglutinina aislado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 235.

3. El anticuerpo antihemaglutinina aislado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 234.

4. El anticuerpo antihemaglutinina aislado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 234, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 235.

5. El anticuerpo antihemaglutinina aislado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139.

6. El anticuerpo antihemaglutinina aislado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147.

7. El anticuerpo antihemaglutinina aislado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139.

8. El anticuerpo antihemaglutinina aislado de la reivindicación 1 a 7, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.

9. Anticuerpo antihemaglutinina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como un medicamento.

10. Anticuerpo antihemaglutinina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento, inhibición o prevención de la infección por el virus de la gripe A.

11. El anticuerpo antihemaglutinina para su uso de la reivindicación 9 o 10, en el que el anticuerpo antihemaglutinina se usa en combinación con un agente terapéutico adicional.

12. El anticuerpo antihemaglutinina para su uso de la reivindicación 11, en el que el agente terapéutico adicional es un inhibidor de la neuraminidasa, un anticuerpo antihemaglutinina o un anticuerpo anti-M2.

13. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

16. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 15.

17. Un procedimiento de producción de un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 16 para que se produzca el anticuerpo.

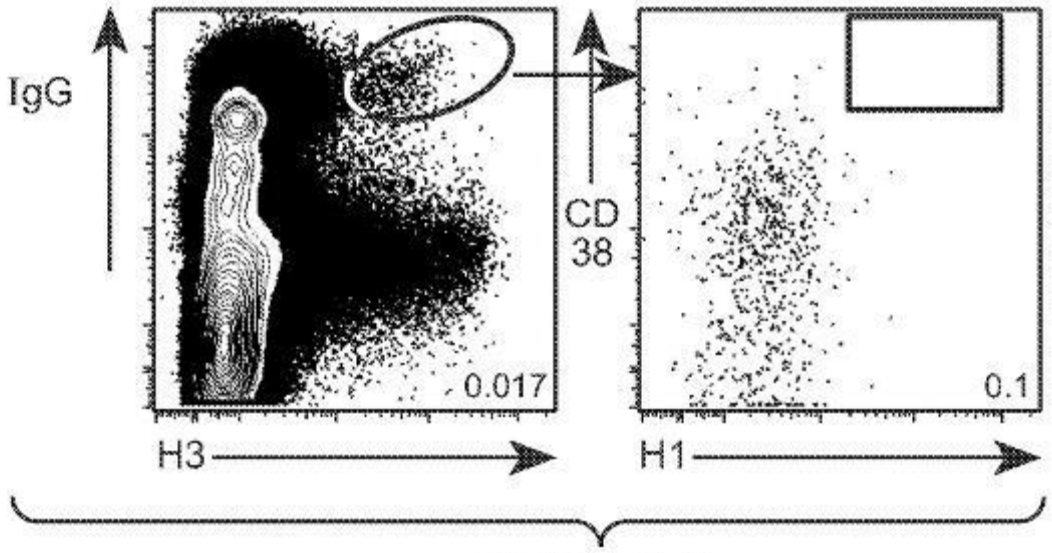
IgG
CD 38
0.017
0.1
H3
H1

FIG. 1A

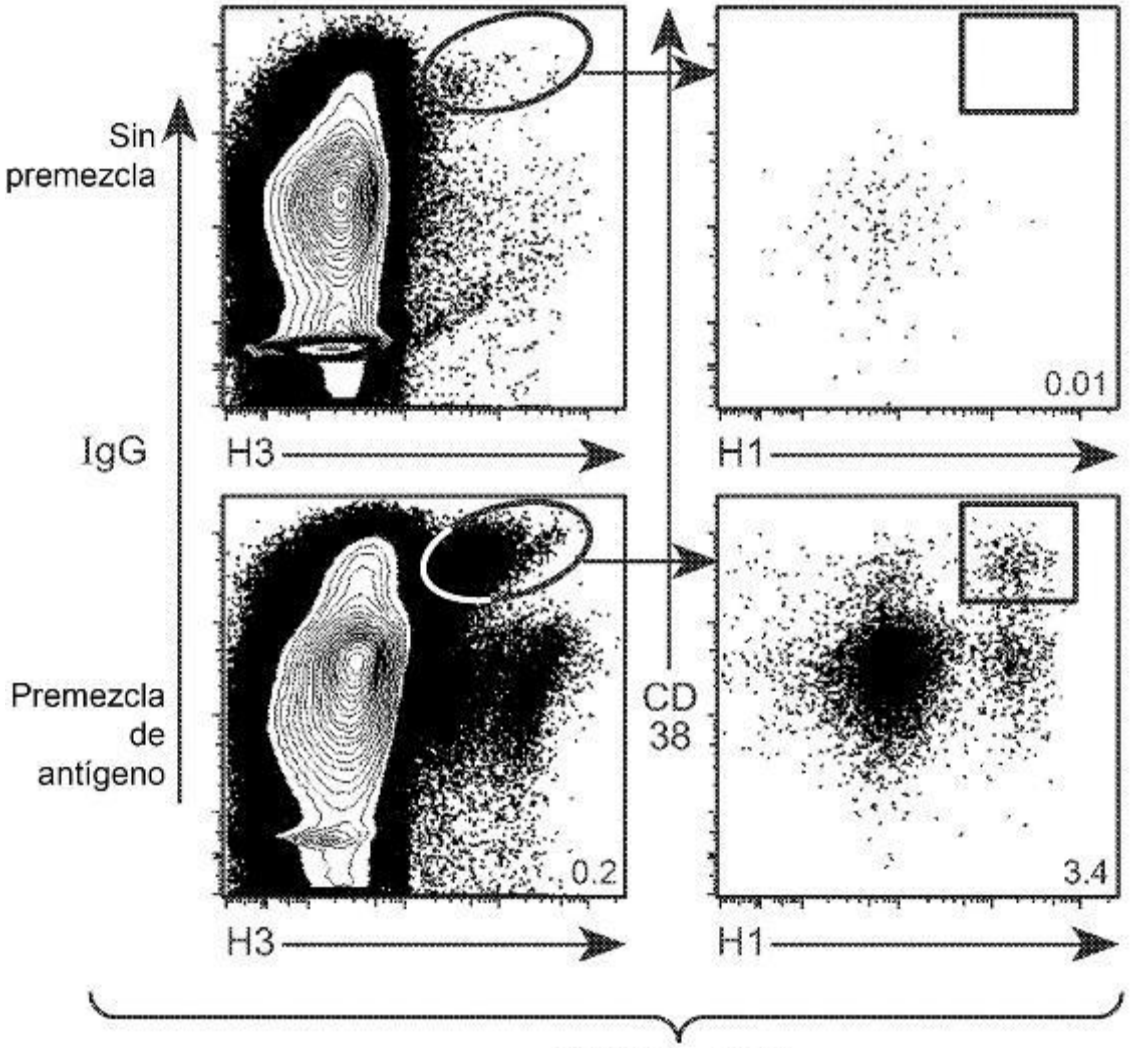
Sin premezcla
IgG
Premezcla de antígeno
CD 38
0.01
0.2
3.4
H3
H1
H3
H1

FIG. 1B

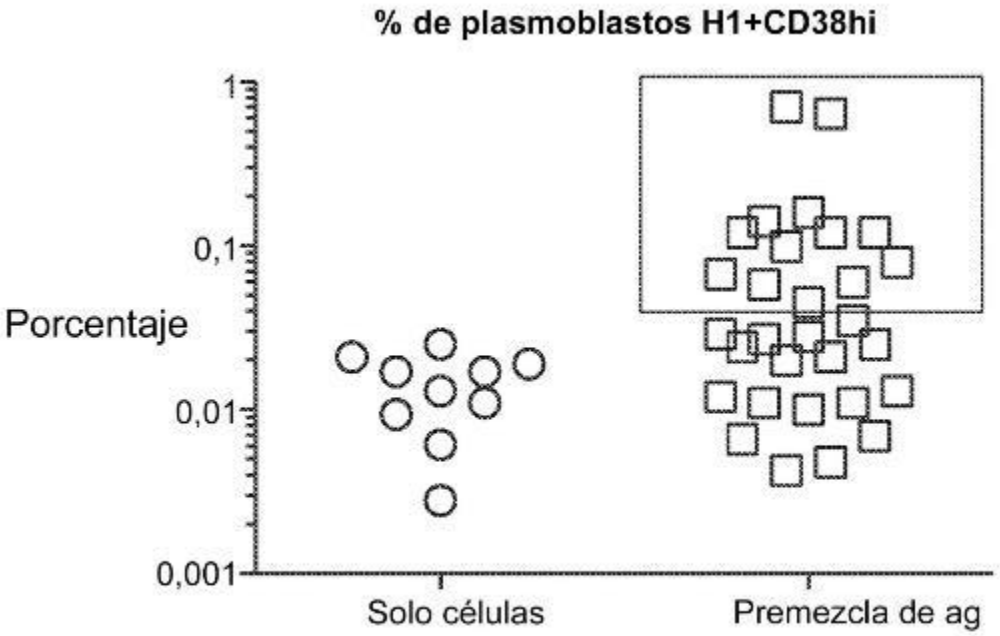
% de plasmoblastos H1+CD38hi
Porcentaje
1
0,1
0,01
0,001
Solo células
Premezcla de ag

FIG. 2

		37,18		39,29		81,39		36,89		mAb 9		mAb 23	
Cepa de la gripe	Subtipo de HA	CI50 (nM)	IC del 95% (nM)	CI50 (nM)	IC del 95% (nM)	CI50 (nM)	IC del 95% (nM)	CI50 (nM)	IC del 95% (nM)	CI50 (nM)	IC del 95% (nM)	CI50 (nM)	IC del 95% (nM)
A/CA/7/2009	H1	1,1	0,75 - 1,6	2,5	2,0 - 3,1	2,1	1,1 - 3,8	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A/Brisbane/59/2007	H1	2,3	1,8 - 3,0	1,9	1,2 - 2,9	0,65	0,46 - 0,94	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A/Solomon/3/2006	H1	8,0	3,9 - 16,6	25,1	20,1 - 31,4	14,6a	12,3 - 17,4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A/Nueva Caledonia/20/1999	H1	3,1	1,3 - 7,4	9,2	5,7 - 15,0	6,1	4,7 - 7,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A/PR/8/1934	H1	1,2	0,81 - 1,9	2,0	1,3 - 3,3	1,9	1,2 - 3,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A/Japón/305/1957	H2	2,4	1,4 - 4,1	6,0	4,4 - 8,1	3,7	2,4 - 5,6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A/Victoria/361/2011	H3	NA	NA	3,4	2,4 - 4,8	3,6	2,4 - 5,3	9,7	8,0 - 11,9	41,0	26,3 - 64,1	12,0	7,2 - 20,2
A/Perth/16/2009	H3	NA	NA	3,0	2,4 - 3,8	1,6	1,2 - 2,0	1,1	0,86 - 1,5	13,5	10,4 - 17,5	4,2	3,3 - 5,4
A/Brisbane/10/2007	H3	NA	NA	2,3	2,0 - 2,7	1,9	1,7 - 2,2	1,9	1,5 - 2,4	26,1	18,2 - 37,4	6,3	4,6 - 8,0
A/Wisconsin/67/2005	H3	NA	NA	1,3	0,88 - 1,8	0,81	0,64 - 1,0	1,6	0,81 - 3,3	7,3	4,5 - 11,9	0,85	0,58 - 1,3
A/Victoria/3/1975	H3	NA	NA	2,5	1,9 - 3,4	2,8	2,2 - 3,7	2,2	0,94 - 5,0	17,2	9,3 - 31,9	3,7	2,3 - 6,0
A/Port Chalmers/1/1973	H3	NA	NA	2,2	1,6 - 3,1	1,5	1,1 - 1,9	1,9	0,75 - 4,6	18,4	12,5 - 26,9	2,4	1,5 - 3,8
A/HK/8/1968	H3	NA	NA	45,1	25,7 - 79,2	26,3	14,5 - 47,8	34,7	19,8 - 60,7	843	295 - 2406	336	240 - 470
A/Aichi/2/1968	H3	NA	NA	35,0	21,1 - 58,0	7,3	3,7 - 14,1	13,9	8,2 - 23,4	1172	589 - 2330	271	176 - 419

FIG. 3

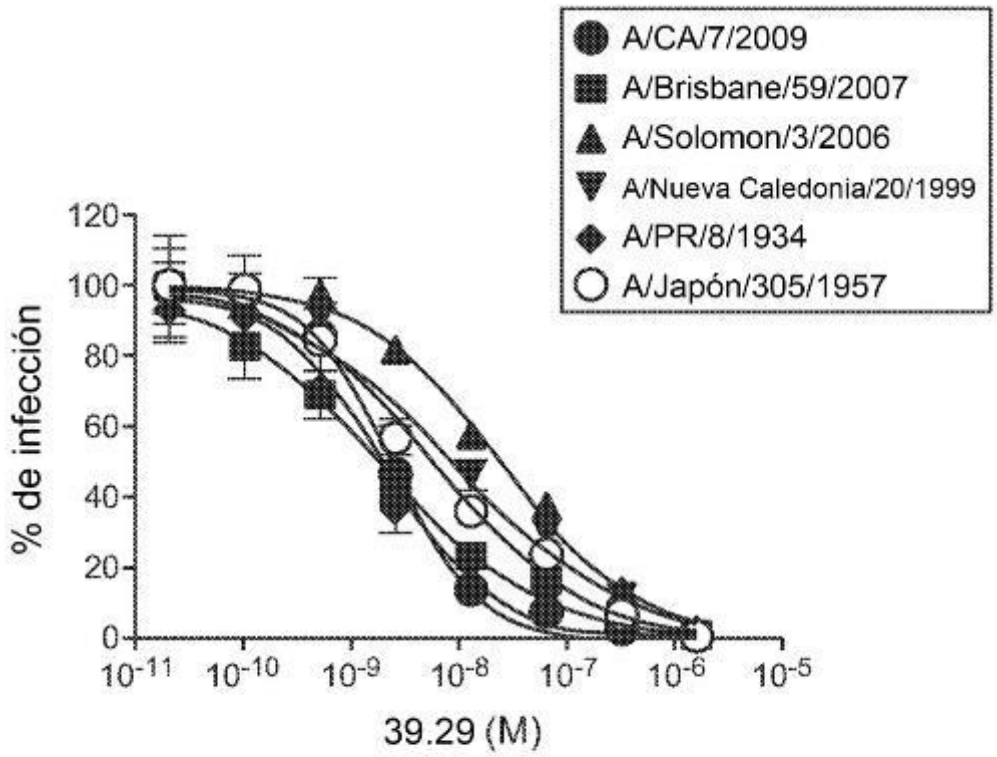
A/CA/7/2009
A/Brisbane/59/2007
A/Solomon/3/2006
A/Nueva Caledonia/20/1999
A/PR/8/1934
A/Japón/305/1957
% de infección
120
100
80
60
40
20
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
39.29 (M)

FIG. 4A

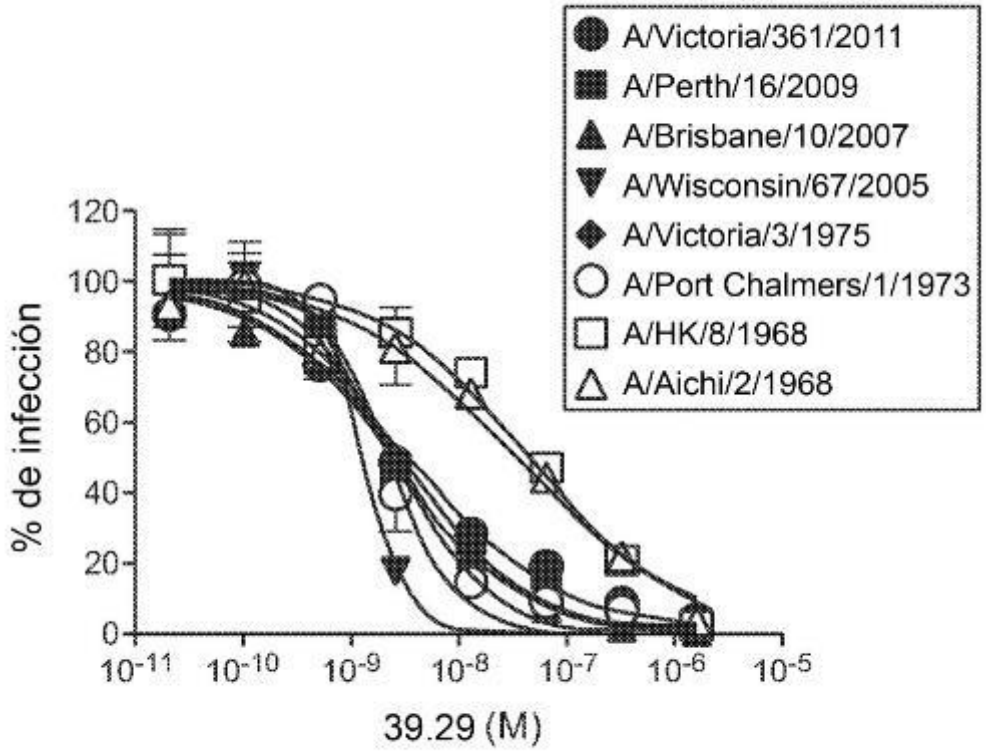
A/Victoria/361/2011
A/Perth/16/2009
A/Brisbane/10/2007
A/Wisconsin/67/2005
A/Victoria/3/1975
A/Port Chalmers/1/1973
A/HK/8/1968
A/Aichi/2/1968
% de infección
120
100
80
60
40
20
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
39.29 (M)

FIG. 4B

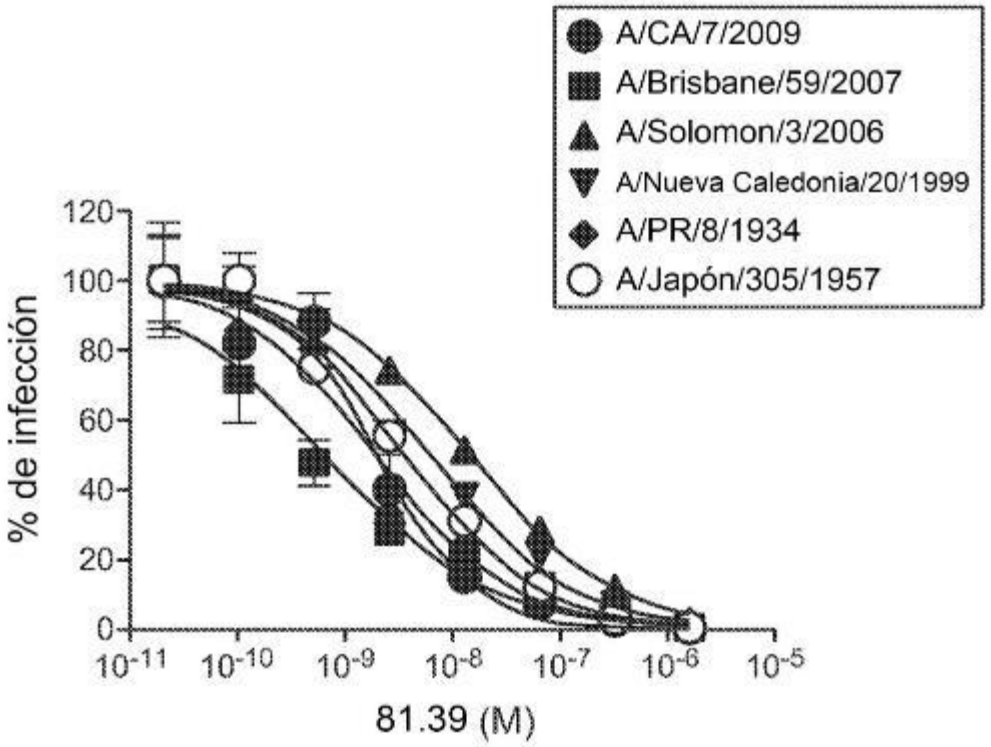
A/CA/7/2009
A/Brisbane/59/2007
A/Solomon/3/2006
A/Nueva Caledonia/20/1999
A/PR/8/1934
A/Japón/305/1957
% de infección
120
100
80
60
40
20
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
81.39 (M)

FIG. 5A

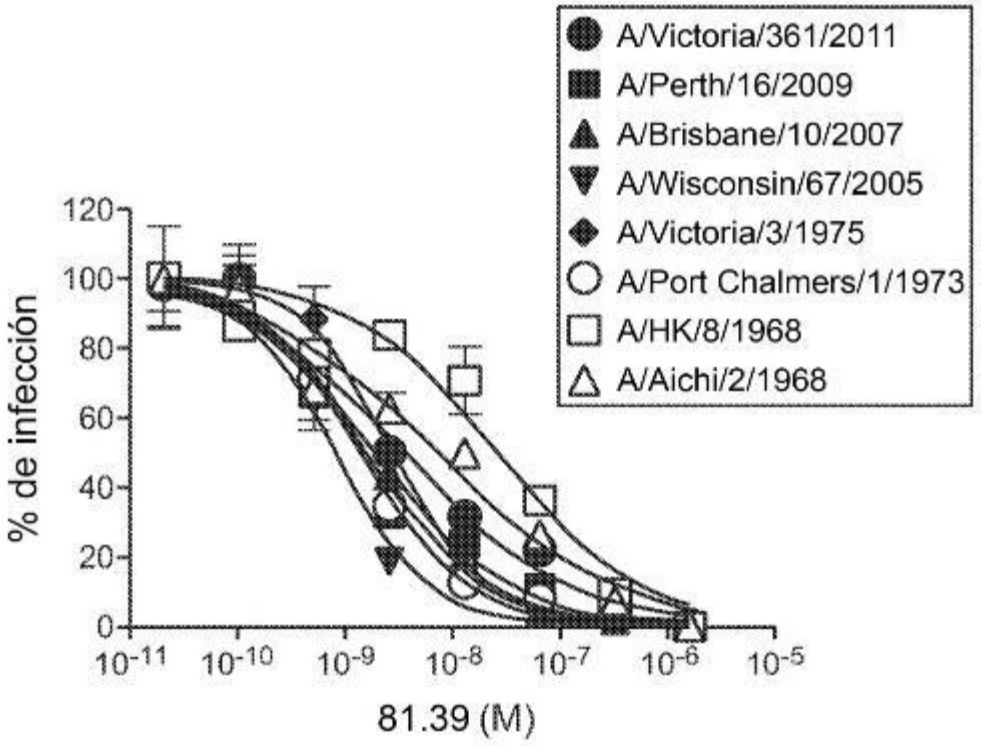
A/Victoria/361/2011
A/Perth/16/2009
A/Brisbane/10/2007
A/Wisconsin/67/2005
A/Victoria/3/1975
A/Port Chalmers/1/1973
A/HK/8/1968
A/Aichi/2/1968
% de infección
120
100
80
60
40
20
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
81.39 (M)

FIG. 5B

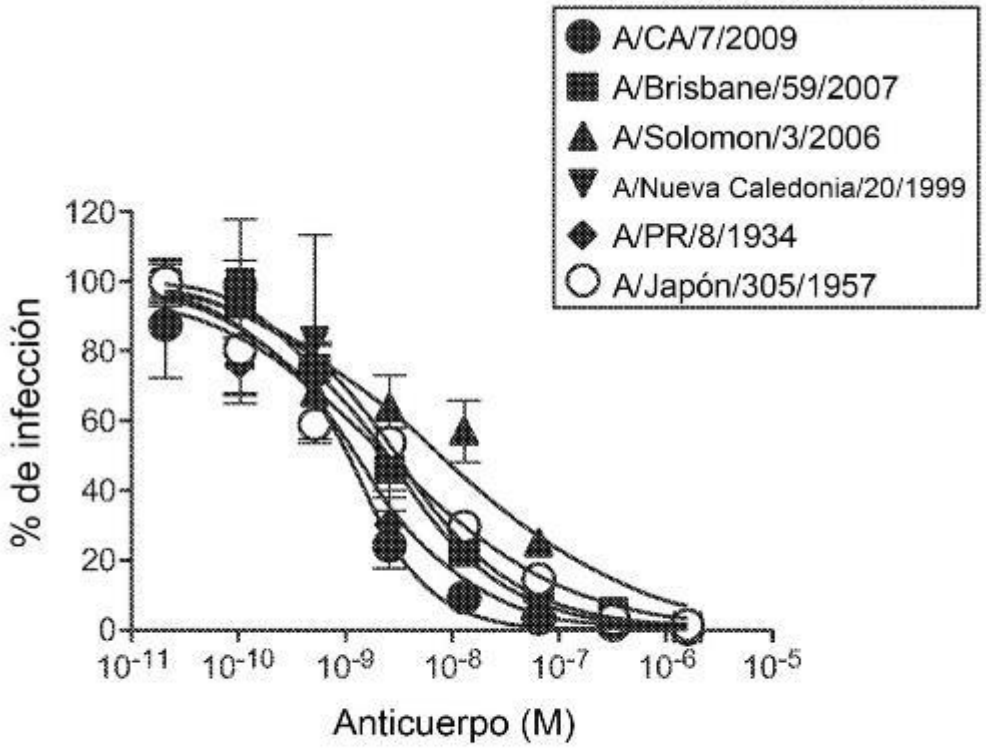
A/CA/7/2009
A/Brisbane/59/2007
A/Solomon/3/2006
A/Nueva Caledonia/20/1999
A/PR/8/1934
A/Japón/305/1957
% de infección
120
100
80
60
40
20
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
Anticuerpo (M)

FIG. 6

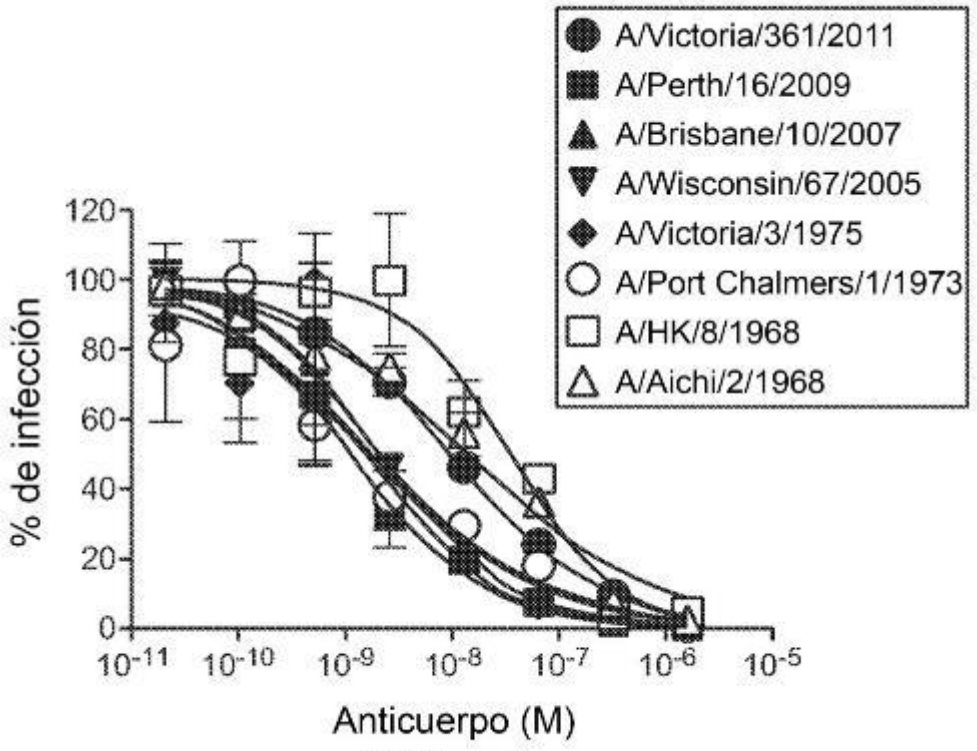
A/Victoria/361/2011
A/Perth/16/2009
A/Brisbane/10/2007
A/Wisconsin/67/2005
A/Victoria/3/1975
A/Port Chalmers/1/1973
A/HK/8/1968
A/Aichi/2/1968
% de infección
120
100
80
60
40
20
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
Anticuerpo (M)

FIG. 7

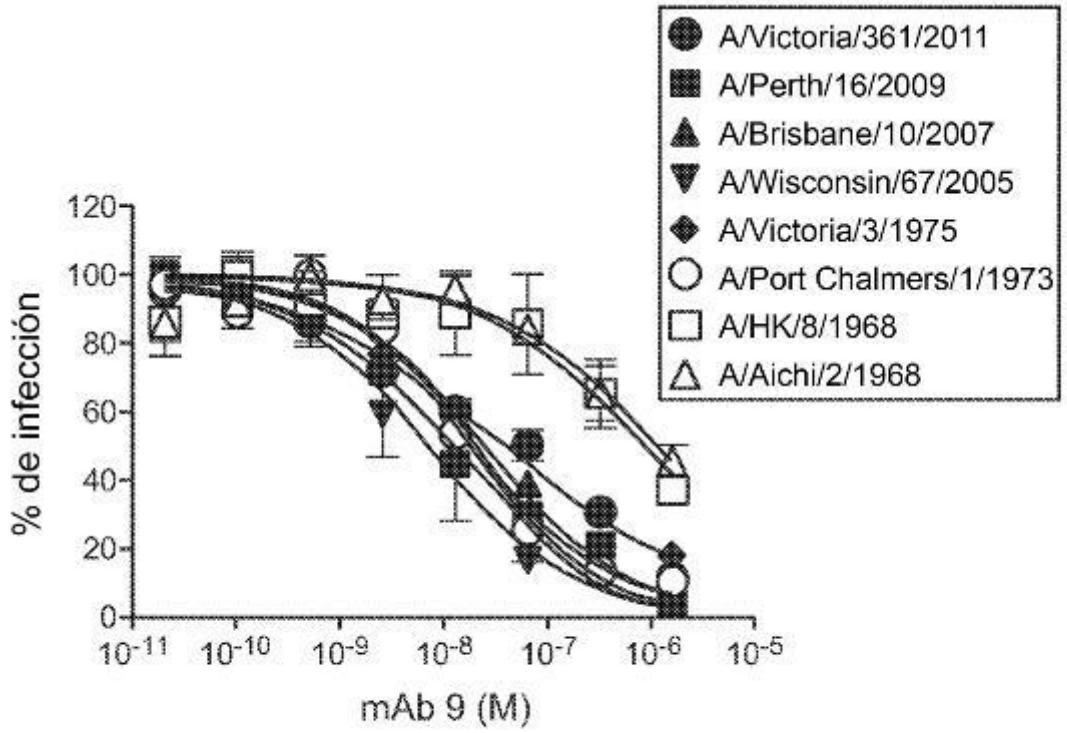
A/Victoria/361/2011
A/Perth/16/2009
A/Brisbane/10/2007
A/Wisconsin/67/2005
A/Victoria/3/1975
A/Port Chalmers/1/1973
A/HK/8/1968
A/Aichi/2/1968
% de infección
120
100
80
60
40
20
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
mAb 9 (M)

FIG. 8

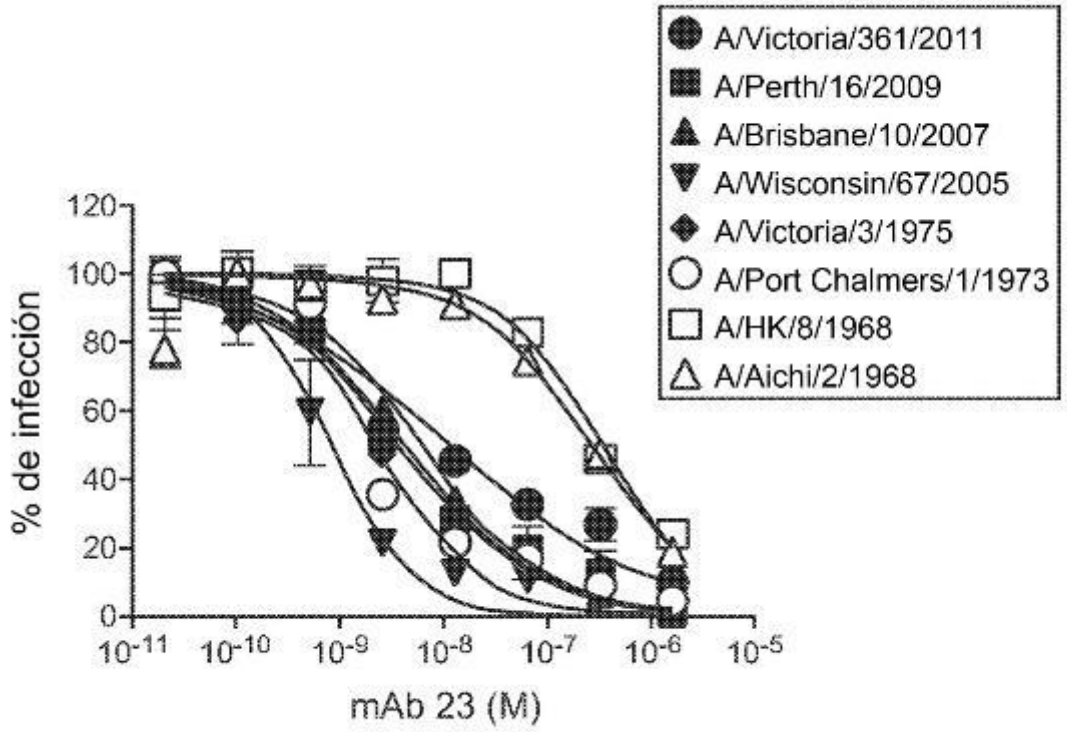
A/Victoria/361/2011
A/Perth/16/2009
A/Brisbane/10/2007
A/Wisconsin/67/2005
A/Victoria/3/1975
A/Port Chalmers/1/1973
A/HK/8/1968
A/Aichi/2/1968
% de infección
120
100
80
60
40
20
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
mAb 23 (M)

FIG. 9

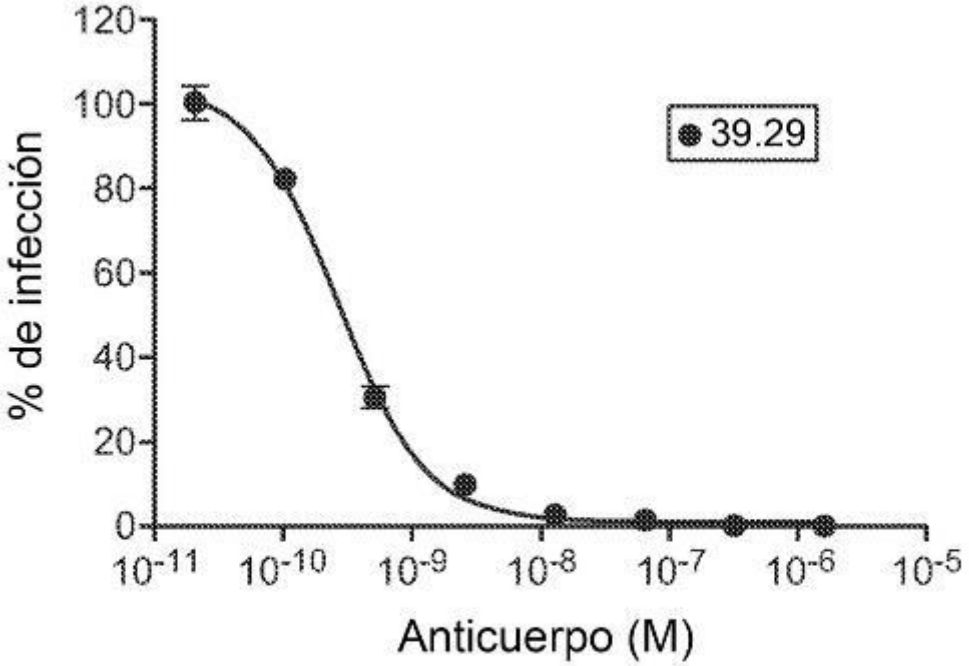
120
100
80
60
40
20
0
% de infección
39.29
10^{-11}
10^{-10}
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}
10^{-6}
10^{-5}
Anticuerpo (M)

FIG. 10

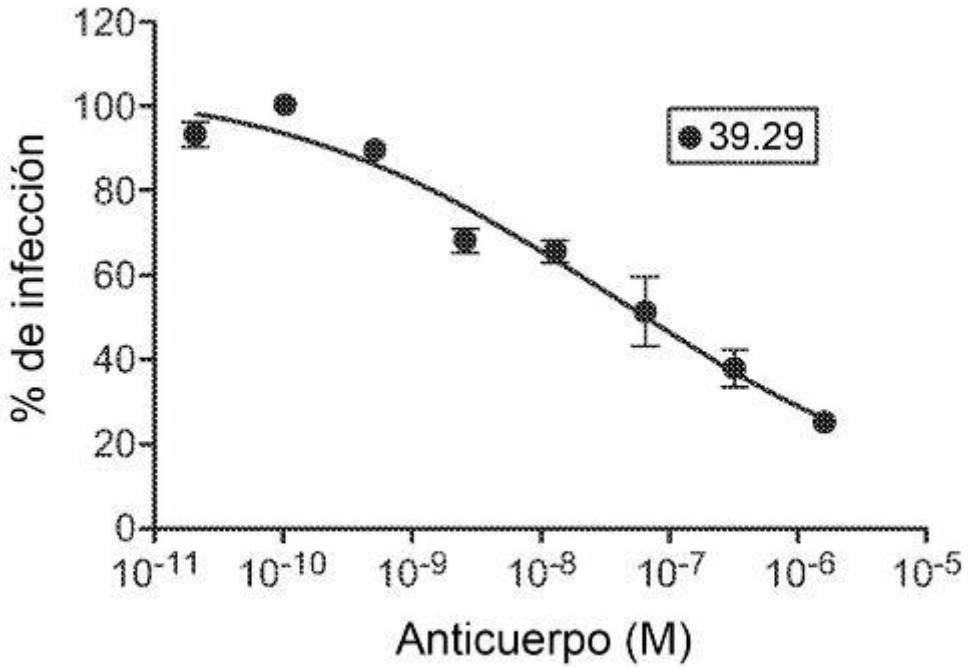
120
100
80
60
40
20
0
% de infección
39.29
10^{-11}
10^{-10}
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}
10^{-6}
10^{-5}
Anticuerpo (M)

FIG. 11

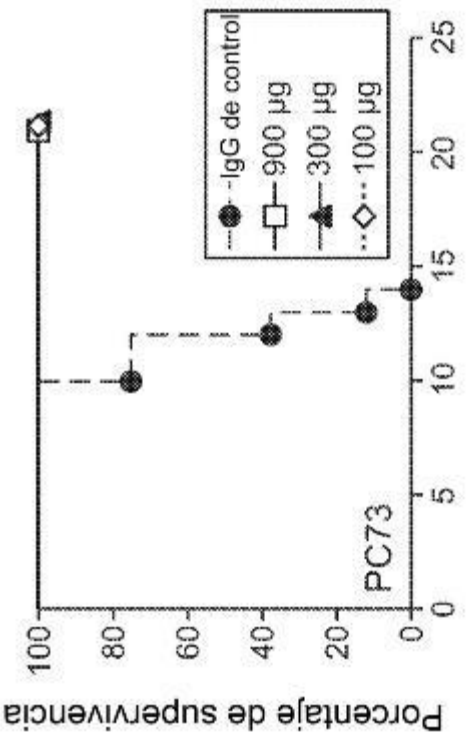

FIG. 12A

FIG. 12B

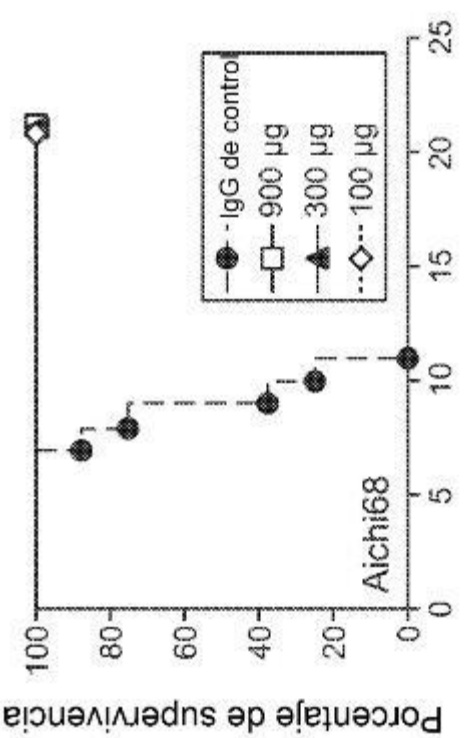

FIG. 12C

FIG. 12D

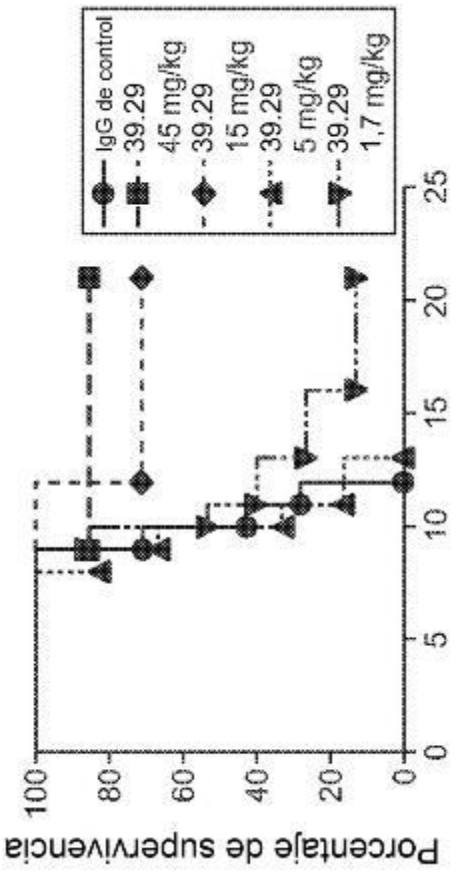

FIG. 14

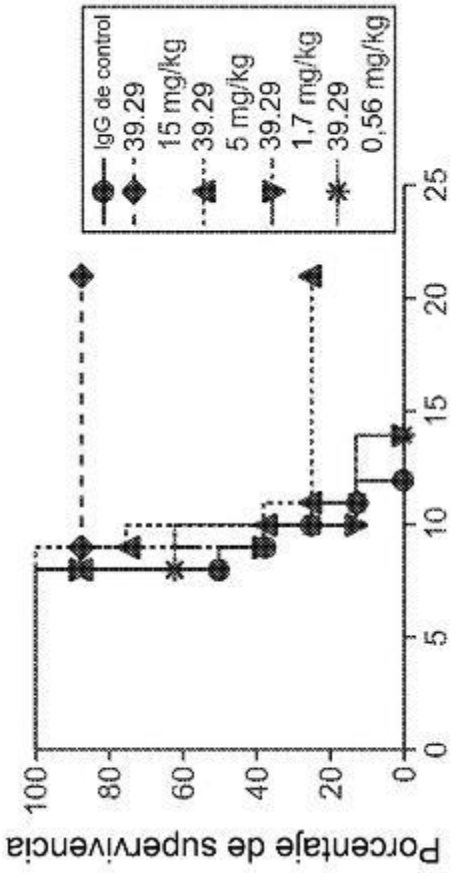

FIG. 13

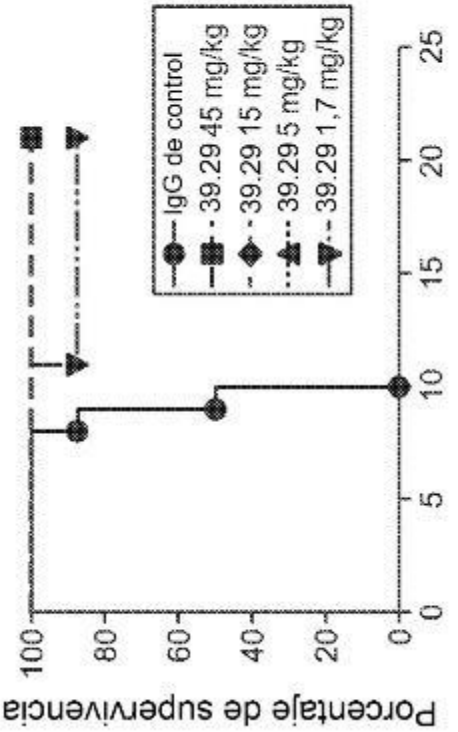

FIG. 16

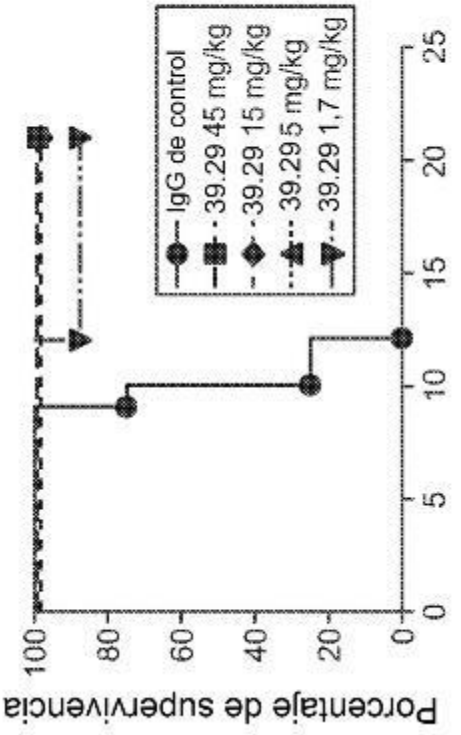

FIG. 15

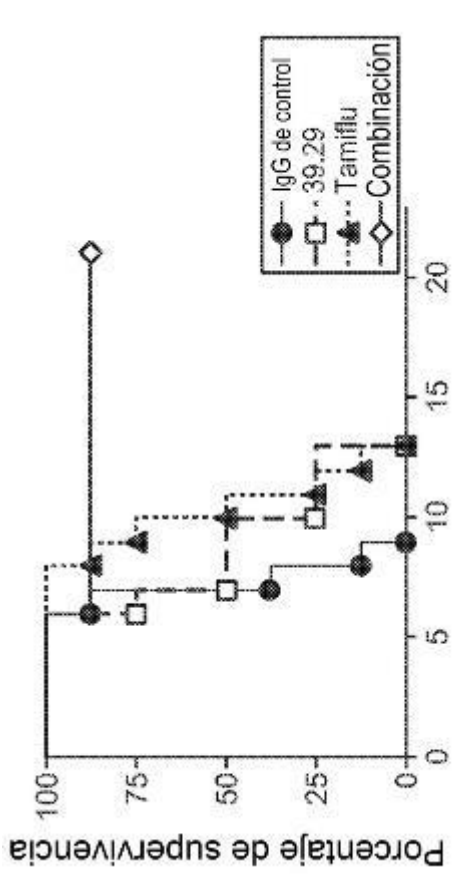

FIG. 18

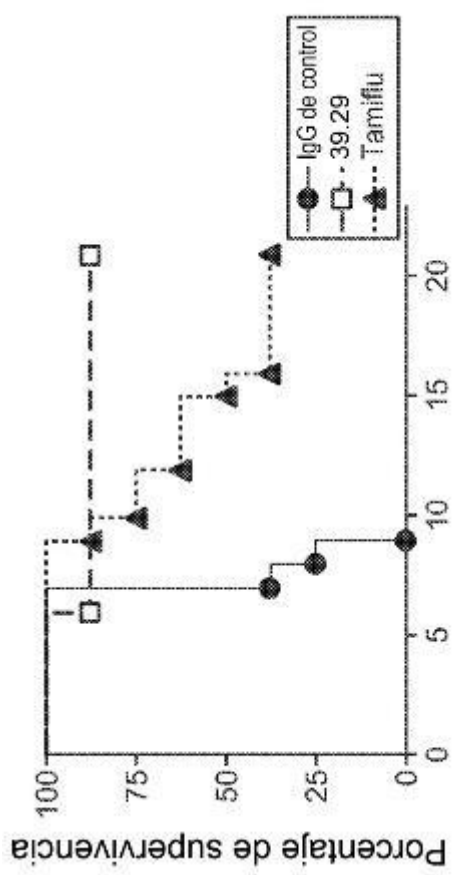

FIG. 17

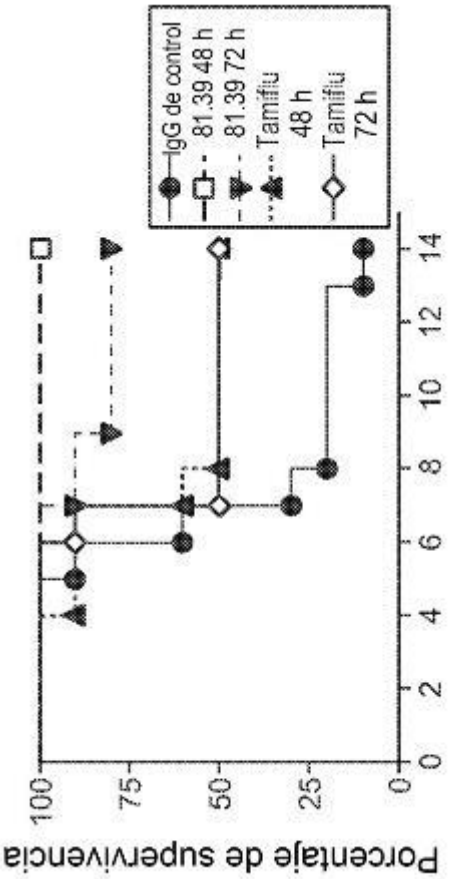

FIG. 19B

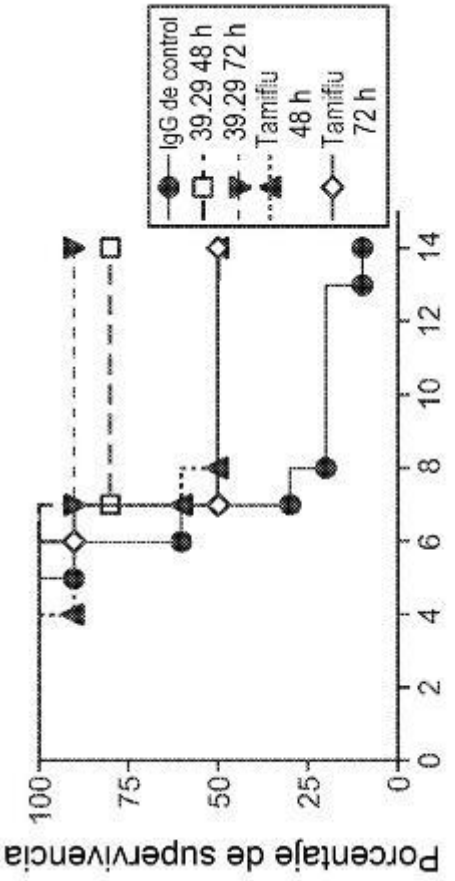

FIG. 19A

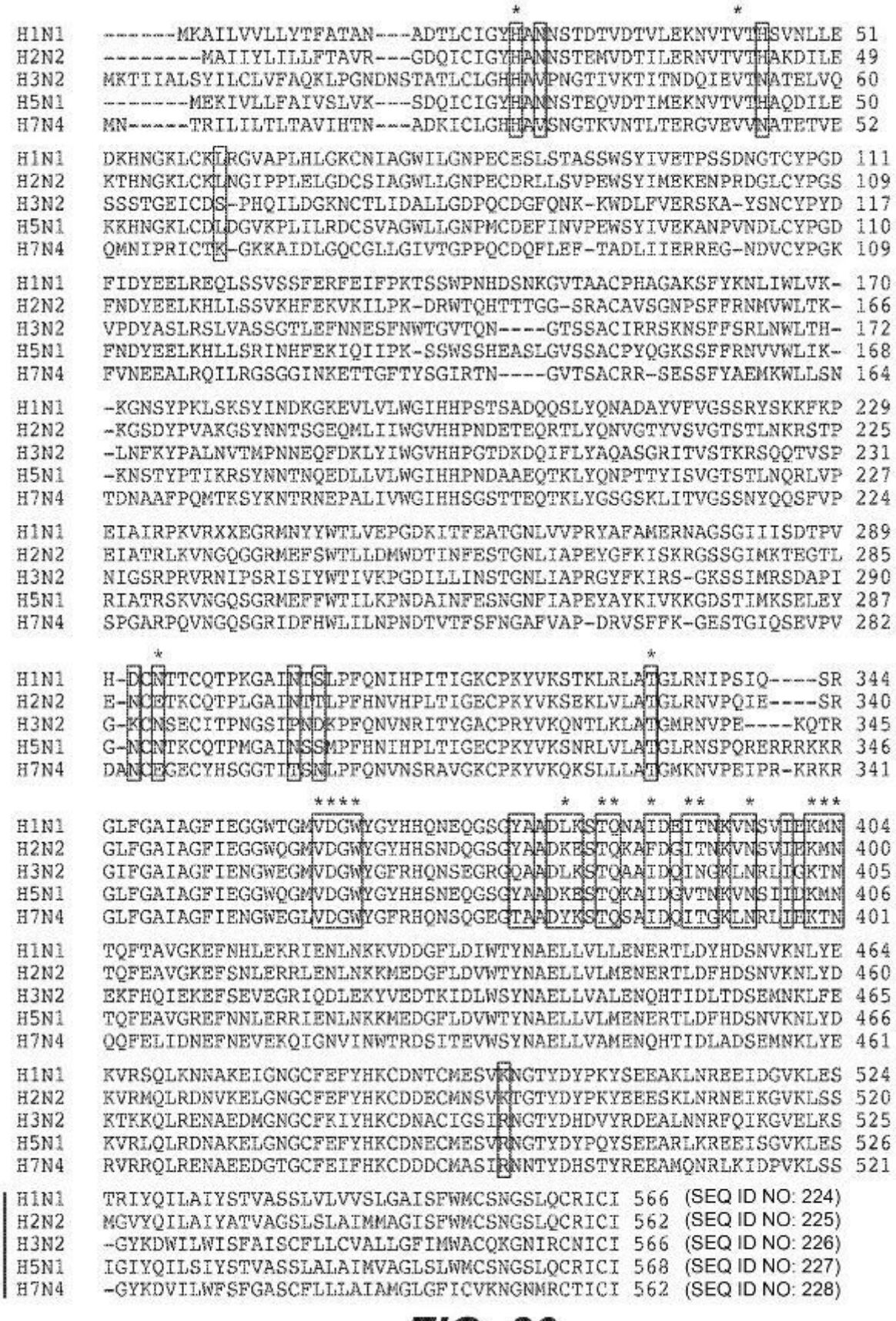
H1N1 -------MKAILVVLLYTFATAN---ADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLE 51
H2N2 --------MAIIYLILLFTAVR---GDQICIGYHANNSTEMVDTILERNVTVTHAKDILE 49
H3N2 MKTIIALSYILCLVFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTIVKTITNDQIEVTNATELVQ 60
H5N1 --------MEKIVLLFAIVSLVK---SDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILE 50
H7N4 MN-----TRILILTLTAVIHTN---ADKICLGHHAVSNGTKVNTLTERGVEVVNATETVE 52
H1N1 DKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGD 111
H2N2 KTHNGKLCKLNGIPPLELGDCSIAGWLLGNPECDRLLSVPEWSYIMEKENPRDGLCYPGS 109
H3N2 SSSTGEICDS-PHQILDGKNCTLIDALLGDPQCDGFQNK-KWDLFVERSKA-YSNCYPYD 117
H5N1 KKHNGKLCDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANPVNDLCYPGD 110
H7N4 QMNIPRICTK-GKKAIDLGQCGLLGIVTGPPQCDQFLEF-TADLIIERREG-NDVCYPGK 109
H1N1 FIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVK- 170
H2N2 FNDYEELKHLLSSVKHFEKVKILPK-DRWTQHTTTGG-SRACAVSGNPSFFRNMVWLTK- 166
H3N2 VPDYASLRSLVASSGTLEFNNESFNWTGVTQN----GTSSACIRRSKNSFFSRLNWLTH- 172
H5N1 FNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPK-SSWSSHEASLGVSSACPYQGKSSFFRNVVWLIK- 168
H7N4 FVNEEALRQILRGSGGINKETTGFTYSGIRTN----GVTSACRR-SESSFYAEMKWLLSN 164
H1N1 -KGNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFVGSSRYSKKFKP 229
H2N2 -KGSDYPVAKGSYNNTSGEQMLIIWGVHHPNDETEQRTLYQNVGTYVSVGTSTLNKRSTP 225
H3N2 -LNFKYPALNVTMPNNEQFDKLYIWGVHHPGTDKDQIFLYAQASGRITVSTKRSQQTVSP 231
H5N1 -KNSTYPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVP 227
H7N4 TDNAAFPQMTKSYKNTRNEPALIVWGIHHSGSTTEQTKLYGSGSKLITVGSSNYQQSFVP 224
H1N1 EIAIRPKVRXXEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPV 289
H2N2 EIATRLKVNGQGGRMEFSWTLLDMWDTINFESTGNLIAPEYGFKISKRGSSGIMKTEGTL 285
H3N2 NIGSRPRVRNIPSRISIYWTIVKPGDILLINSTGNLIAPRGYFKIRS-GKSSIMRSDAPI 290
H5N1 RIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSTIMKSELEY 287
H7N4 SPGARPQVNGQSGRIDFHWLILNPNDTVTFSFNGAFVAP-DRVSFFK-GESTGIQSEVPV 282
H1N1 H-DCNTTCQTPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQ-----SR 344
H2N2 E-NCETKCQTPLGAINTTLPFHNVHPLTIGECPKYVKSEKLVLATGLRNVPQIE-----SR 340
H3N2 G-KCNSECITPNGSIPNDKPFQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMRNVPE-----KQTR 345
H5N1 G-NCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNRLVLATGLRNSPQRERRRKKR 346
H7N4 DANCEGECYHSGGTITSNLPFQNVNSRAVGKCPKYVKQKSLLLATGMKNVPEIPR-KRKR 341
H1N1 GLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMN 404
H2N2 GLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNDQGSGYAADKESTQKAFDGITNKVNSVIEKMN 400
H3N2 GIFGAIAGFIENGWEGMVDGWYGFRHQNSEGRGQAADLKSTQAAIDQINGKLNRLIGKTN 405
H5N1 GLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMN 406
H7N4 GLFGAIAGFIENGWEGLVDGWYGFRHQNSQGEGTAADYKSTQSAIDQITGKLNRLIEKTN 401
H1N1 TQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYE 464
H2N2 TQFEAVGKEFSNLERRLENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYD 460
H3N2 EKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLFE 465
H5N1 TQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYD 466
H7N4 QQFELIDNEFNEVEKQIGNVINWTRDSITEVWSYNAELLVAMENQHTIDLADSEMNKLYE 461
H1N1 KVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLES 524
H2N2 KVRMQLRDNVKELGNGCFEFYHKCDDECMNSVKTGTYDYPKYEEESKLNRNEIKGVKLSS 520
H3N2 KTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKS 525
H5N1 KVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEISGVKLES 526
H7N4 RVRRQLRENAEEDGTGCFEIFHKCDDDCMASIRNNTYDHSTYREEAMQNRLKIDPVKLSS 521
H1N1 TRIYQILAIYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI 566 (SEQ ID NO: 224)
H2N2 MGVYQILAIYATVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGSLQCRICI 562 (SEQ ID NO: 225)
H3N2 -GYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI 566 (SEQ ID NO: 226)
H5N1 IGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCSNGSLQCRICI 568 (SEQ ID NO: 227)
H7N4 -GYKDVILWFSFGASCFLLLAIAMGLGFICVKNGNMRCTICI 562 (SEQ ID NO: 228)

FIG. 20

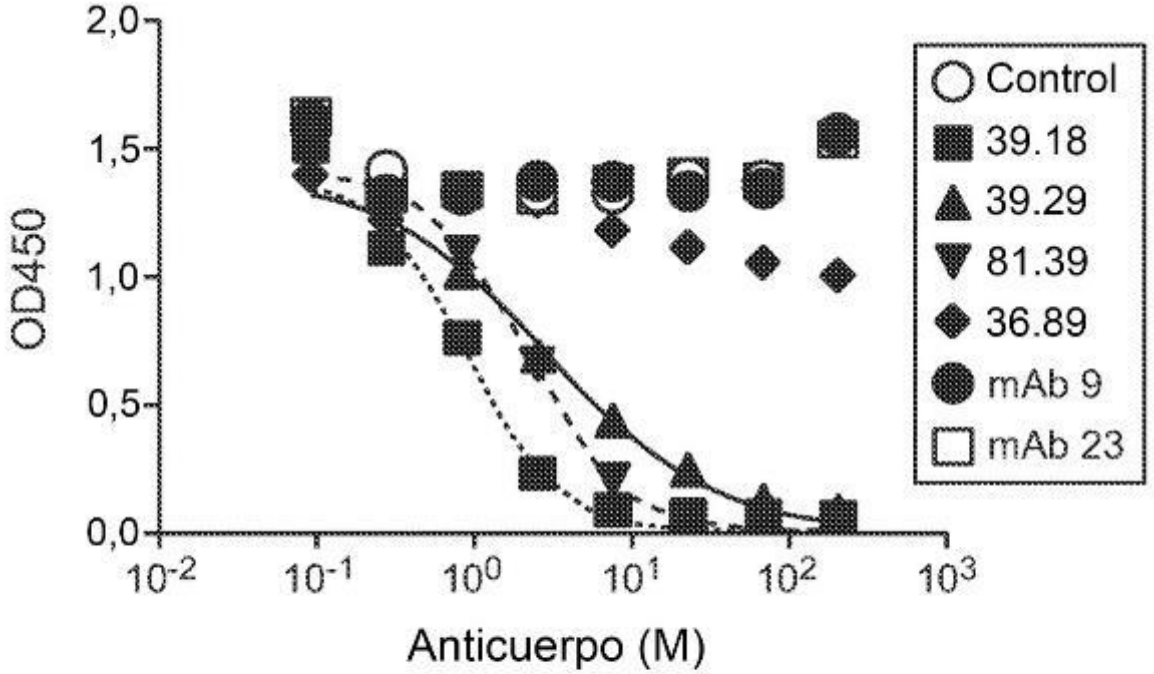

FIG. 21A

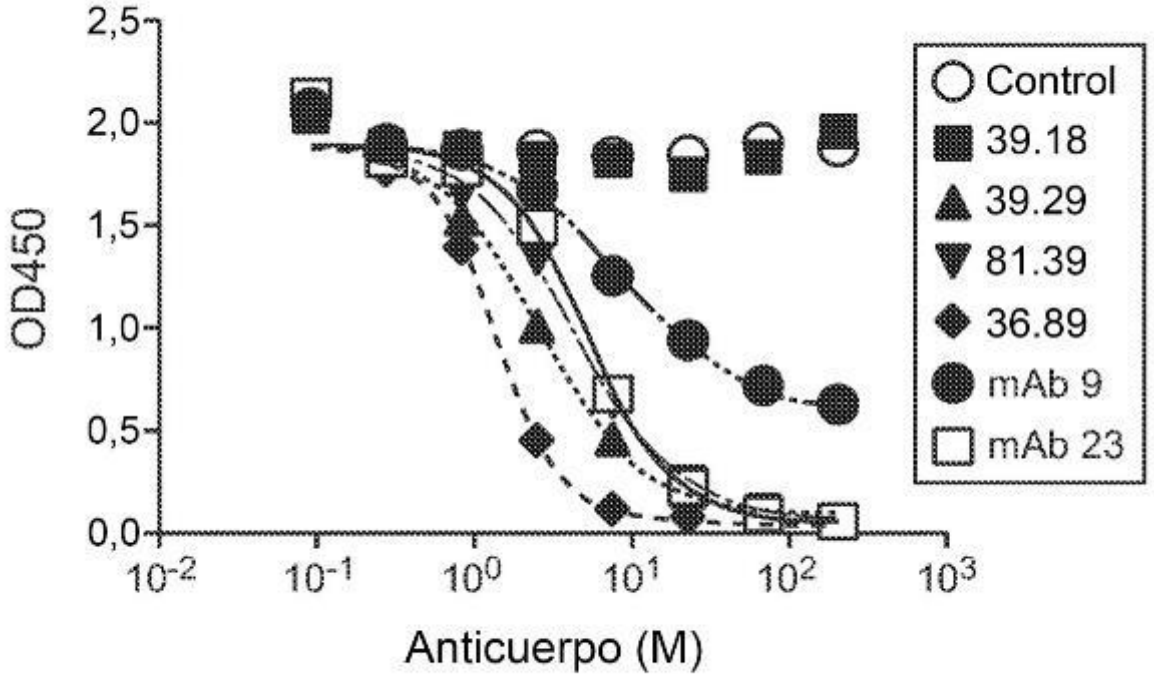

FIG. 21B

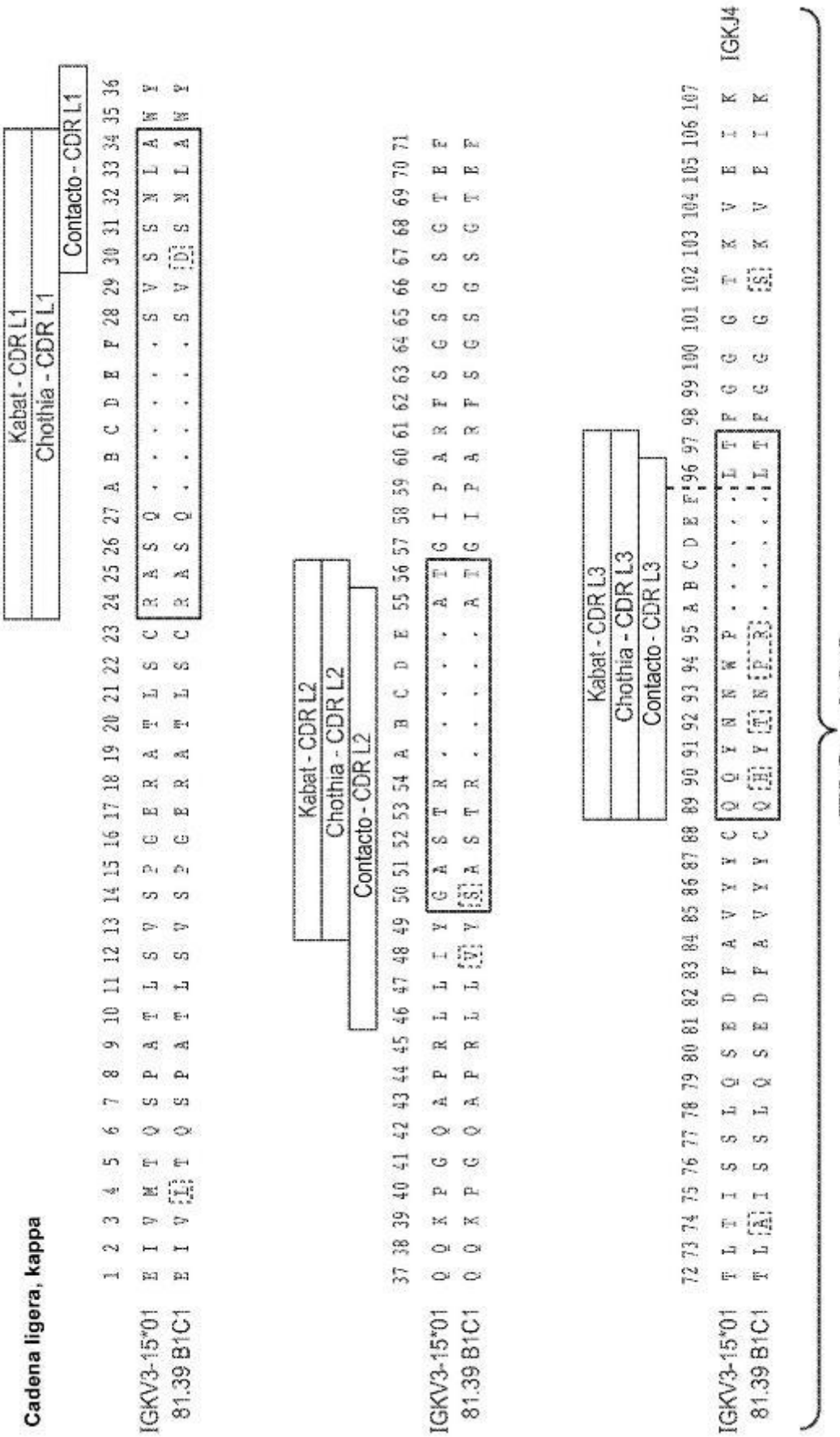
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
81.39 B1C1
IGKJ4

FIG. 22A

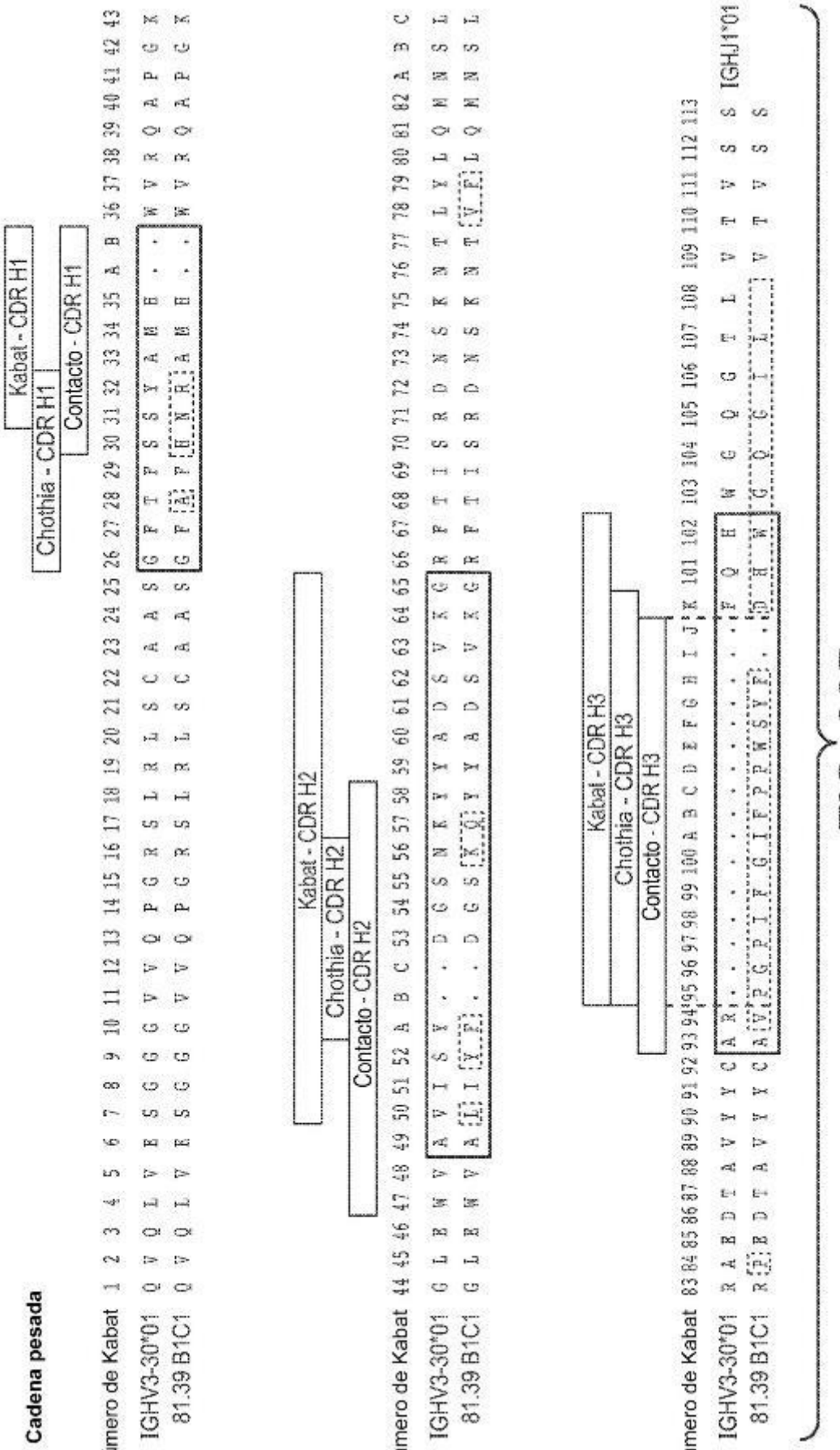
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV3-30*01
81.39 B1C1
IGHJ1*01

FIG. 22B

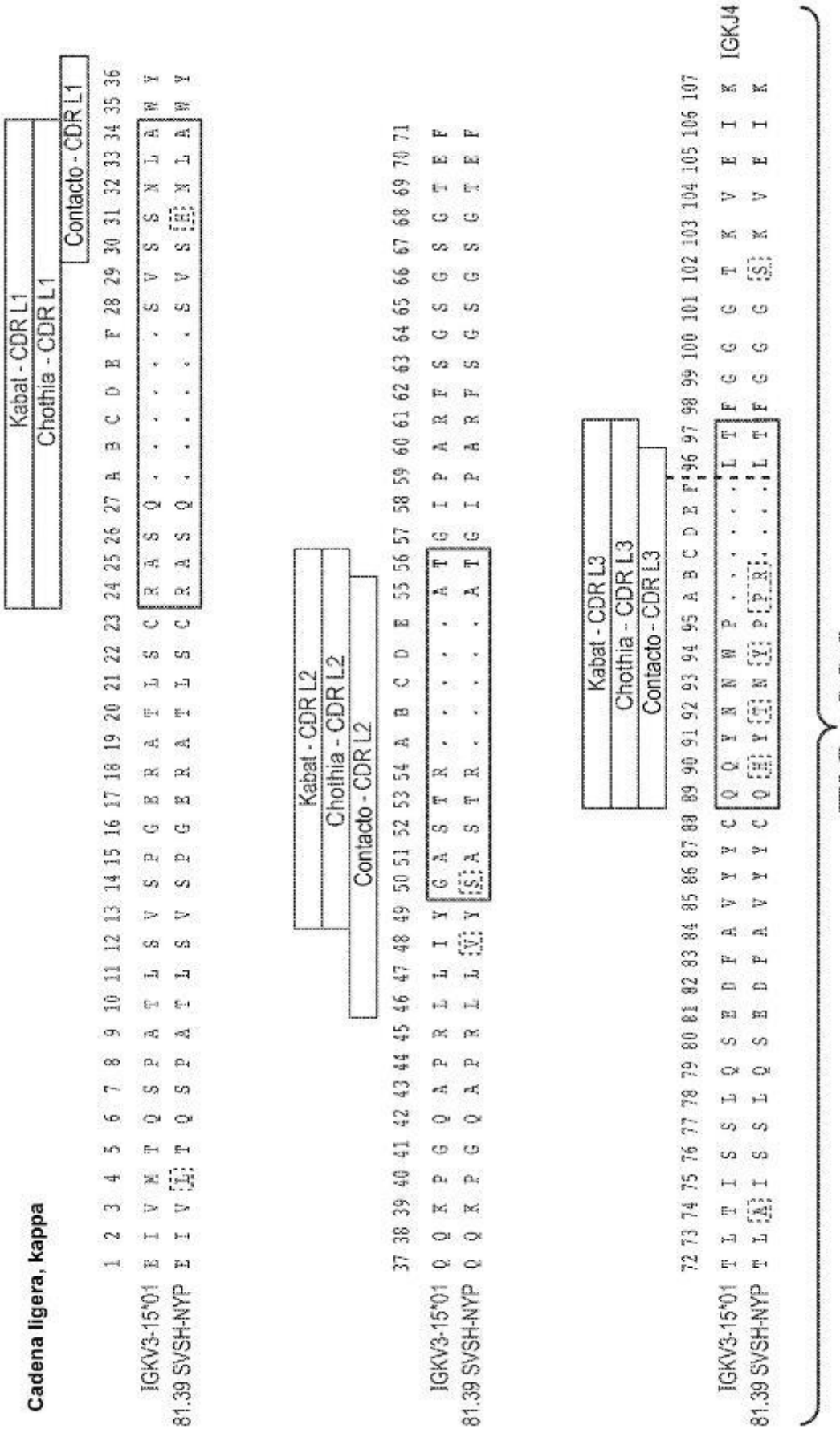
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
81.39 SVSH-NYP
IGKJ4

FIG. 23A

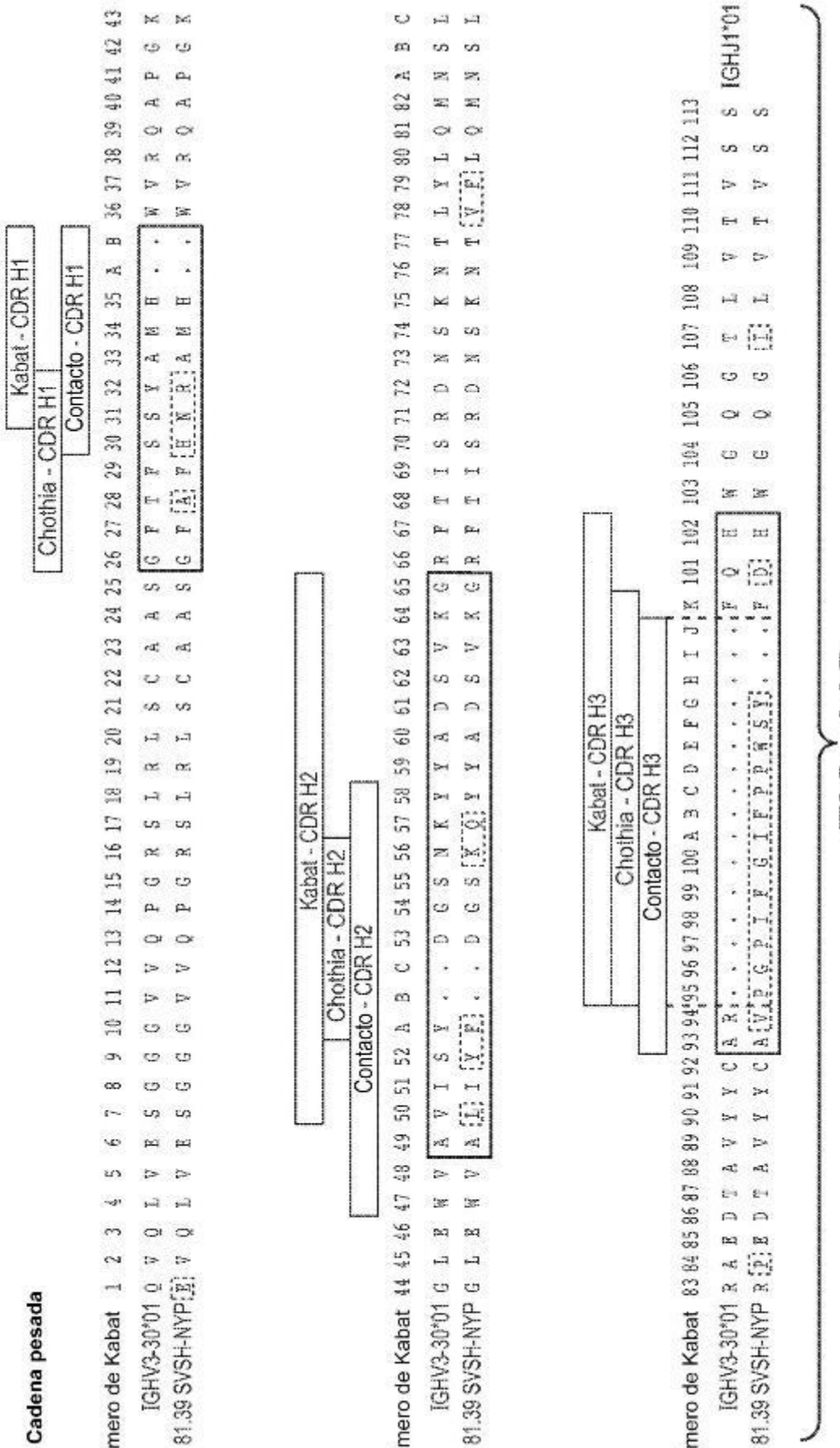
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Choithia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV3-30*01
81.39 SVSH-NYP
IGHJ1*01

FIG. 23B

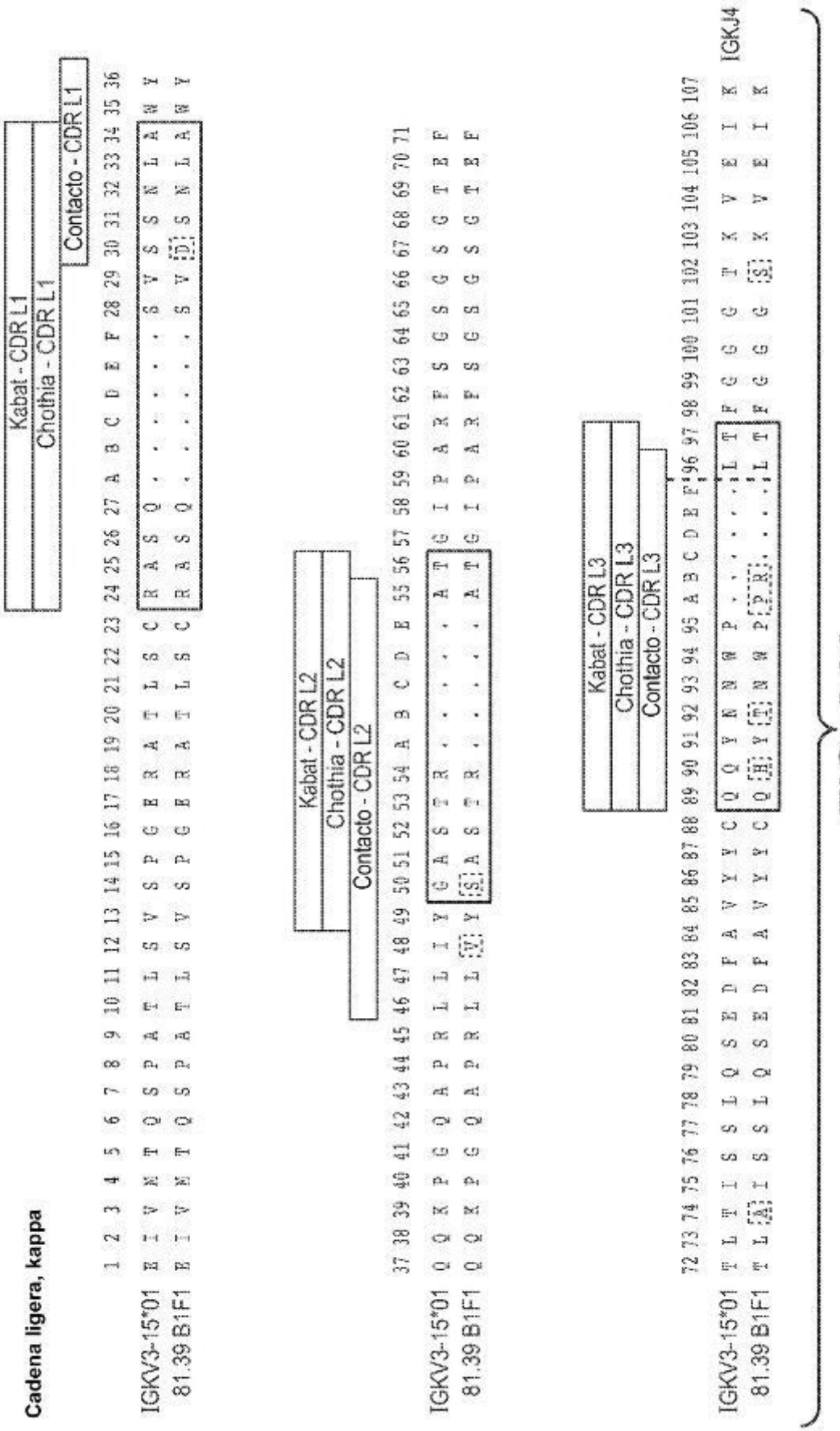
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
81.39 B1F1
IGKJ4

FIG. 24A

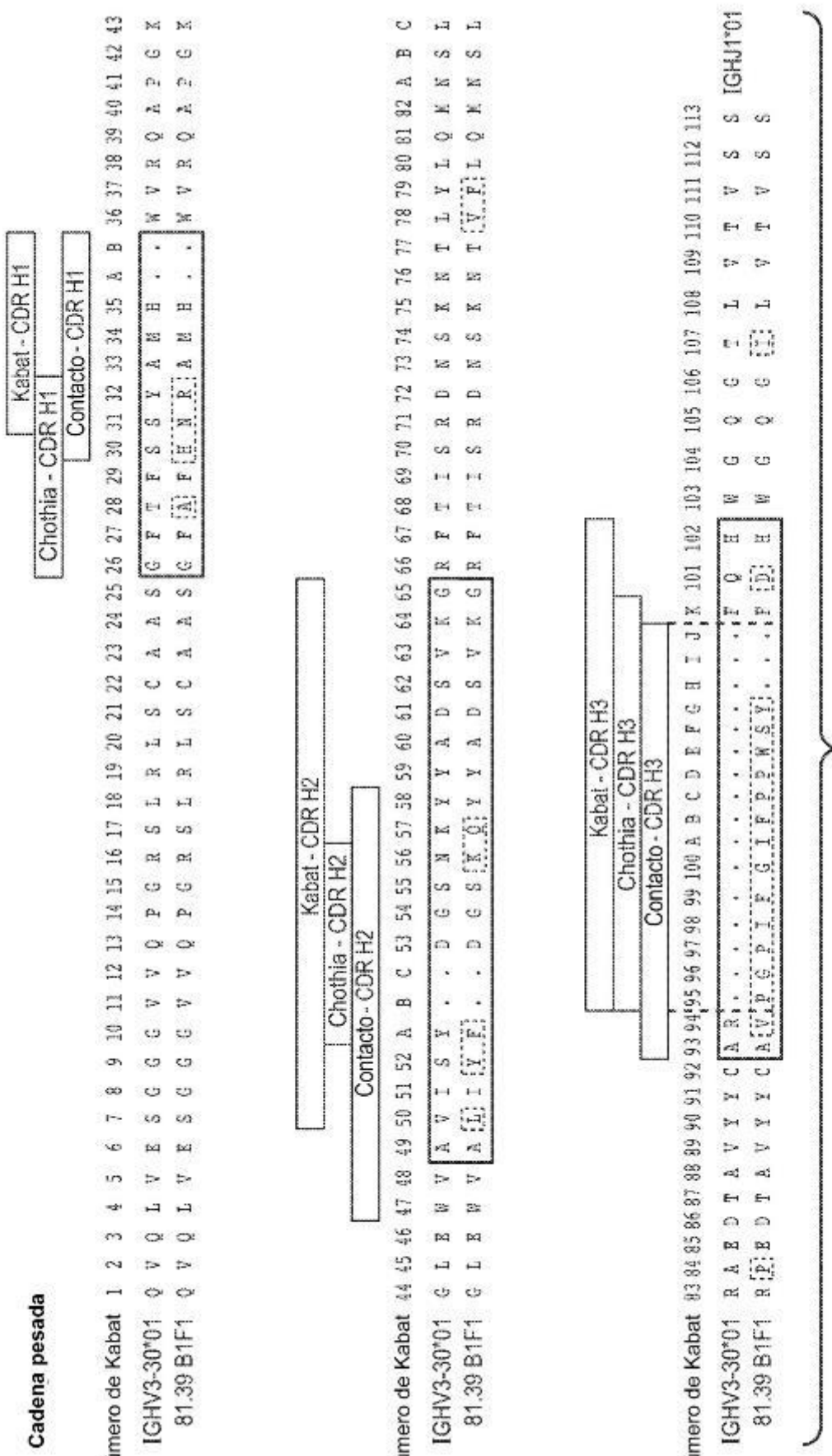
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV3-30*01
81.39 B1F1
IGHJ1*01

FIG. 24B

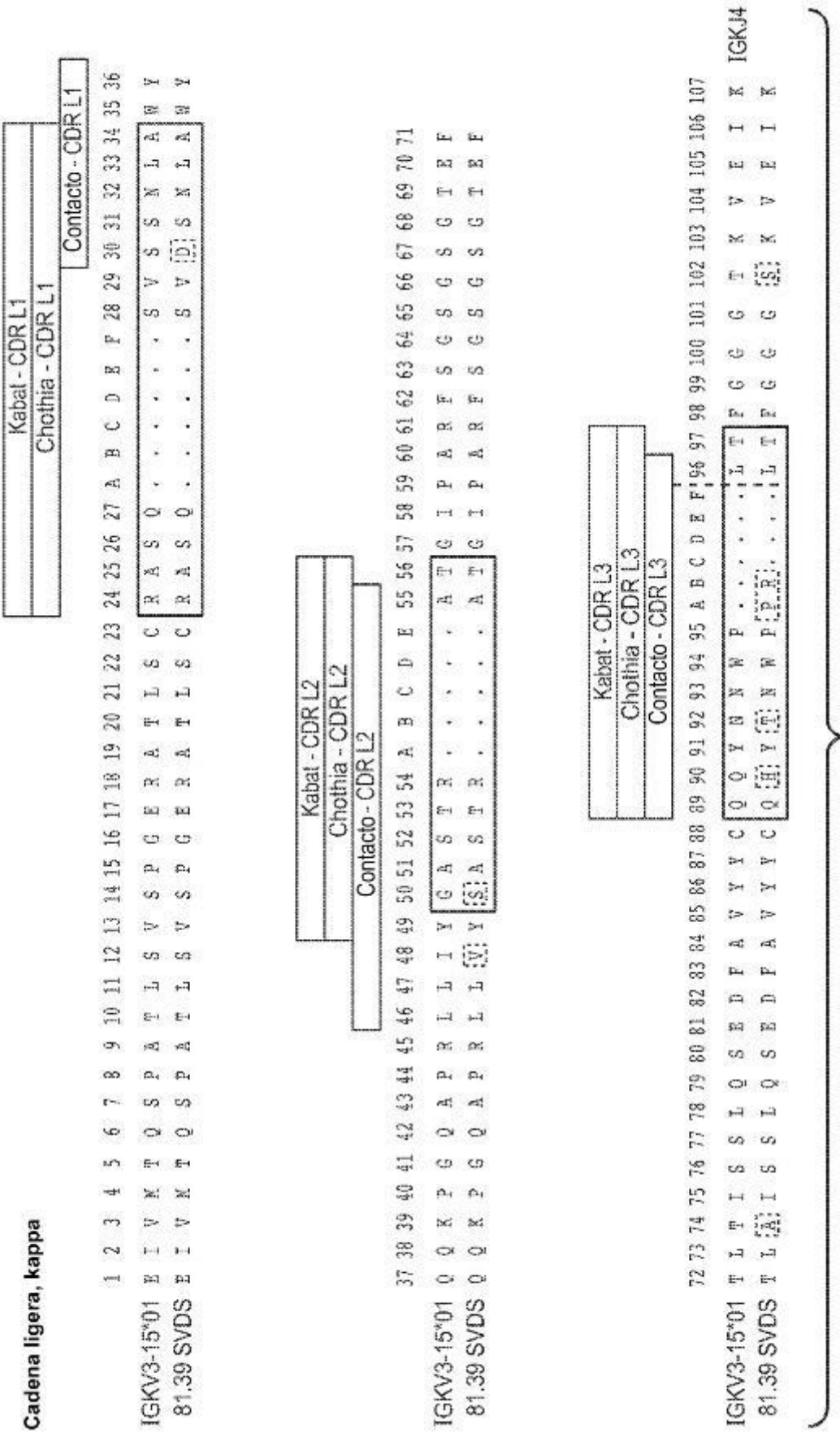
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
81.39 SVDS
IGKJ4

FIG. 25A

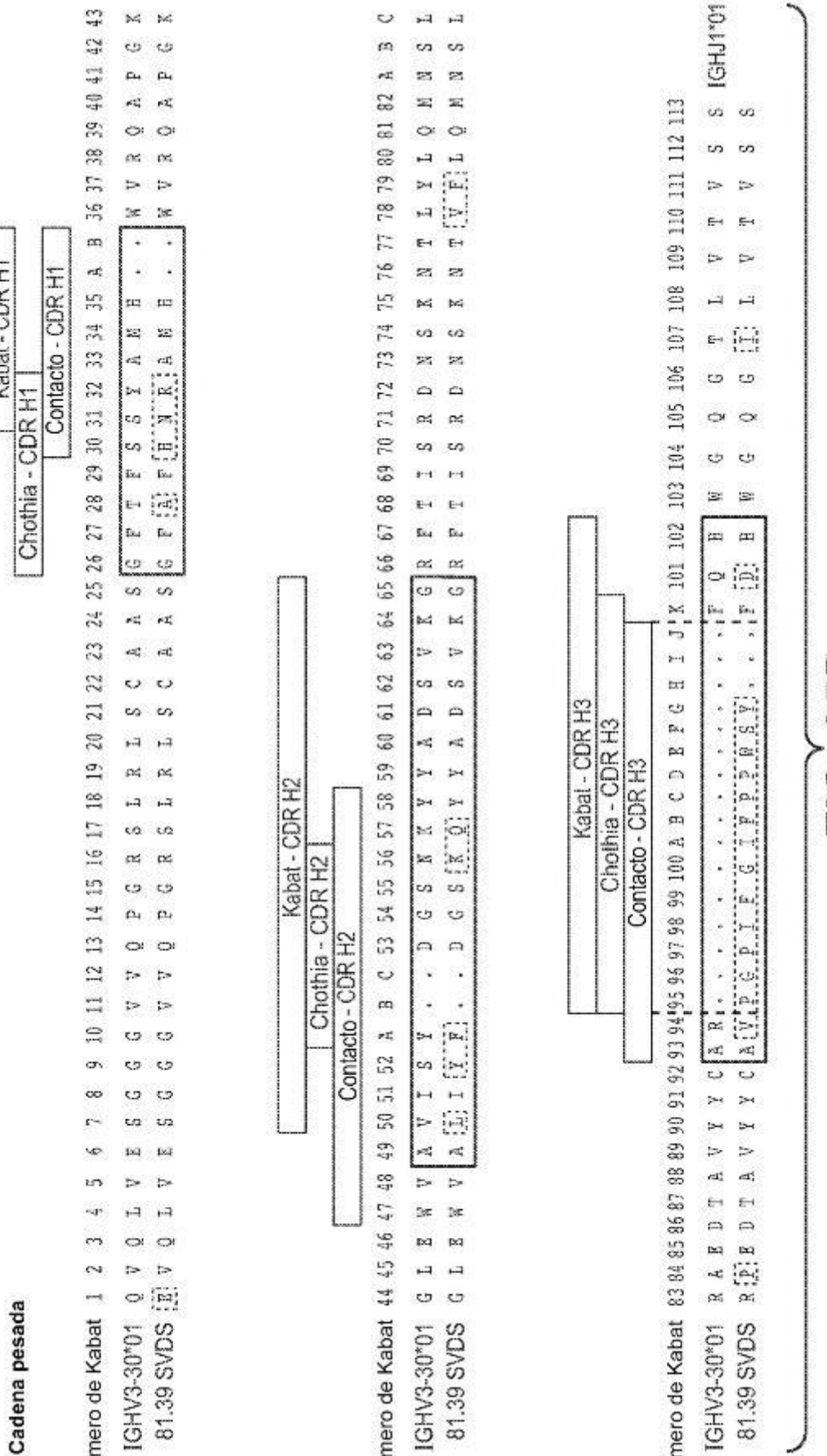
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV3-30*01
81.39 SVDS
IGHJ1*01

FIG. 25B

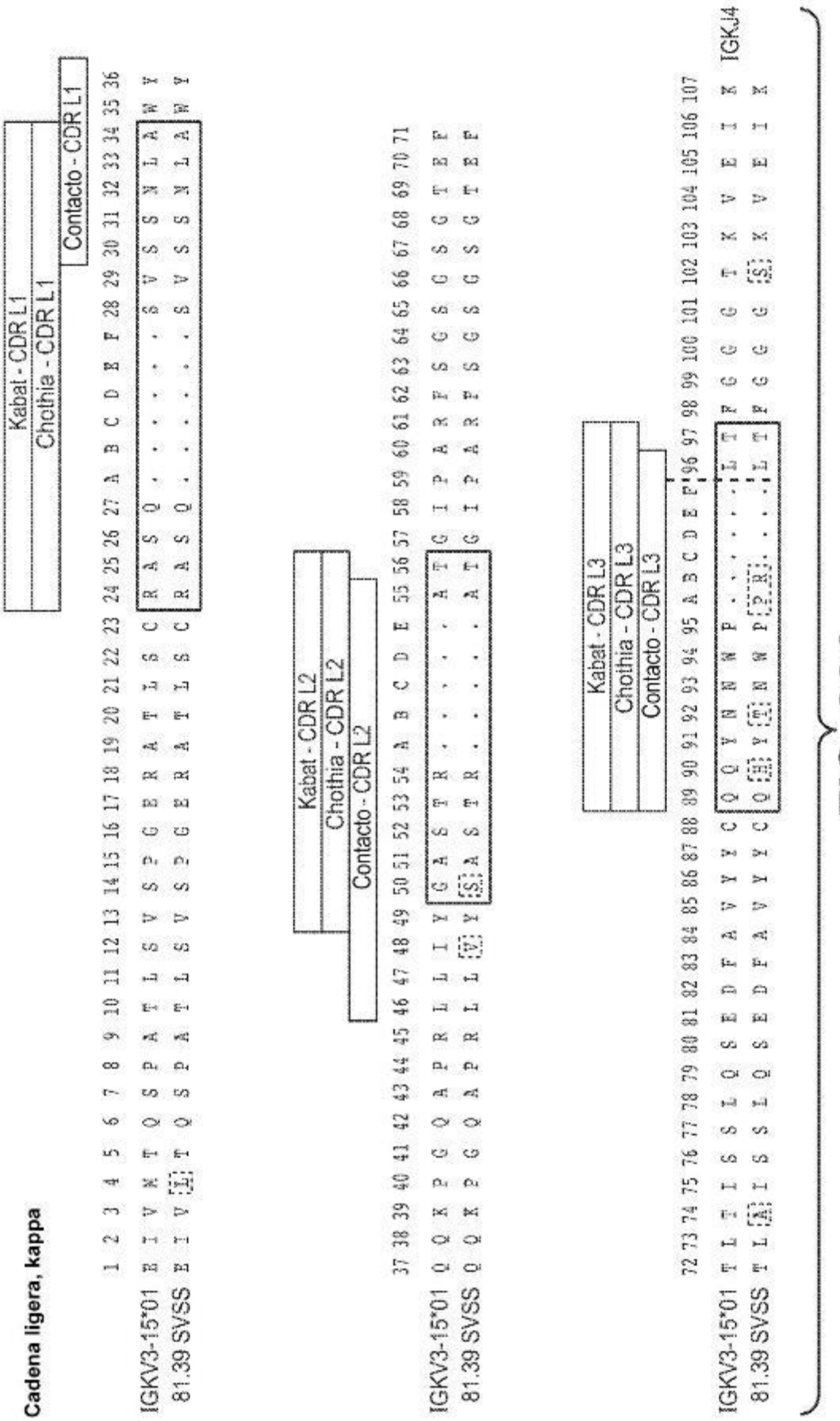
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
81.39 SVSS
IGKJ4

FIG. 26A

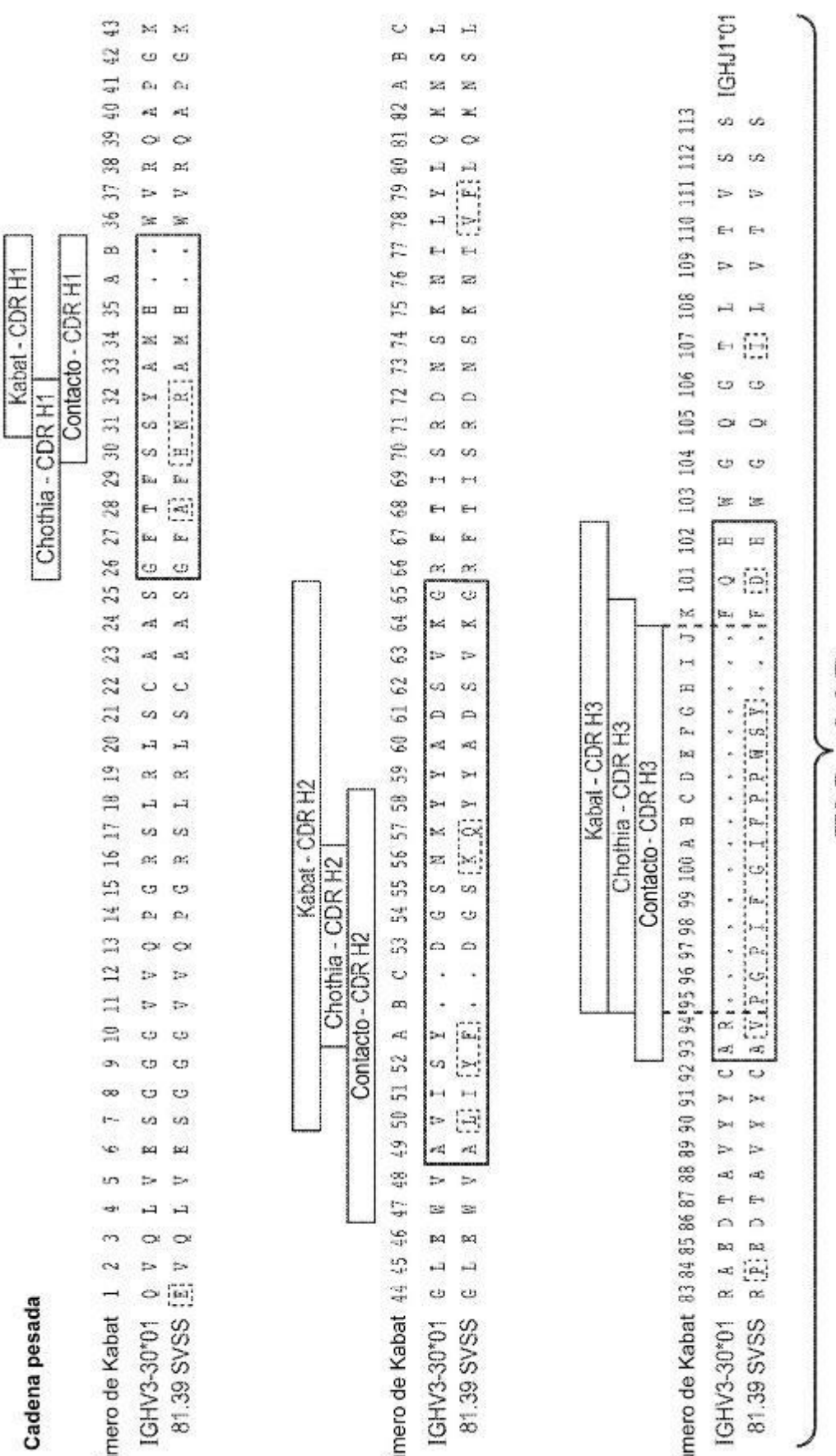
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV3-30*01
81.39 SVSS
IGHJ1*01

FIG. 26B

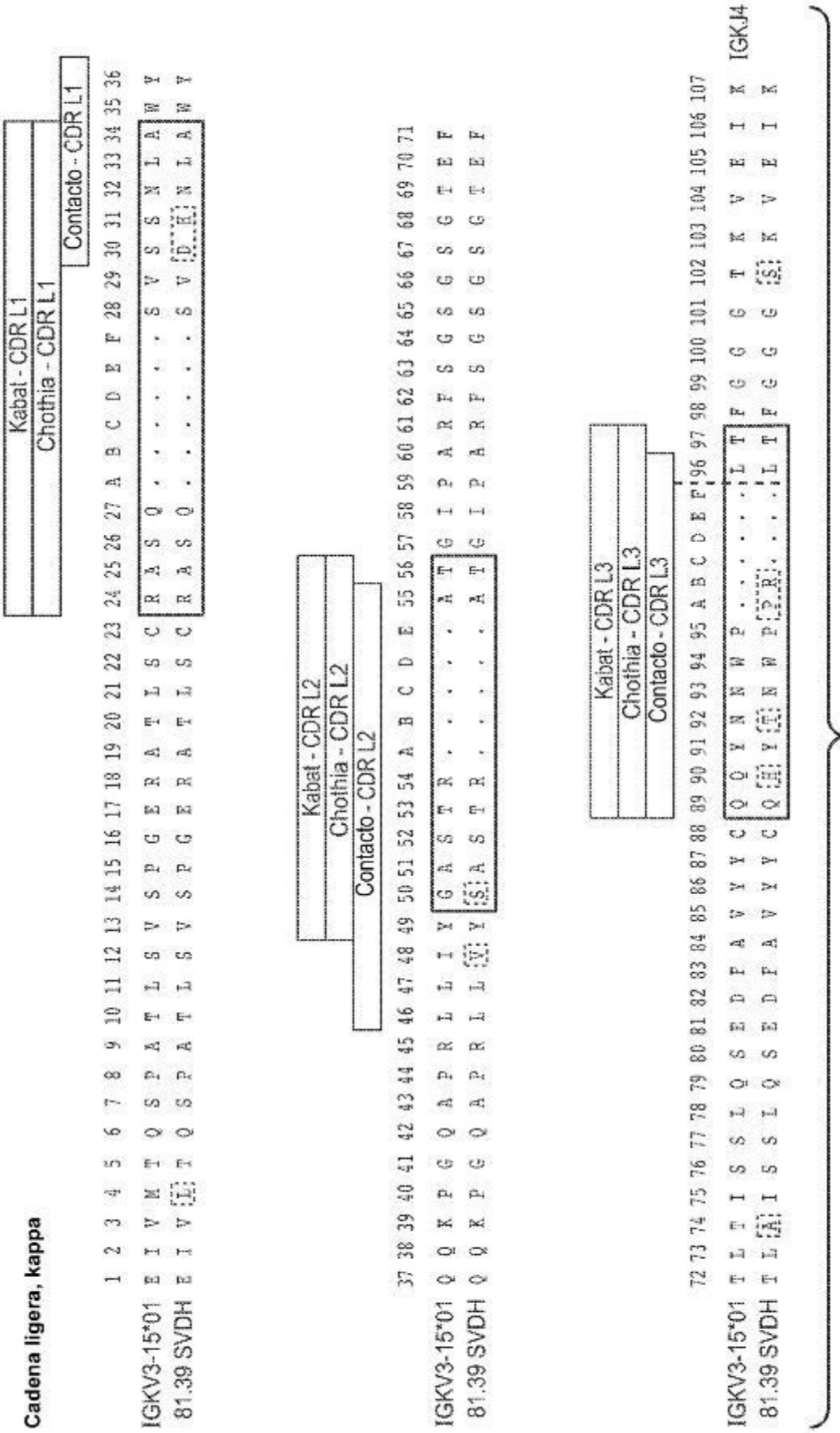
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
81.39 SVDH
IGKJ4

FIG. 27A

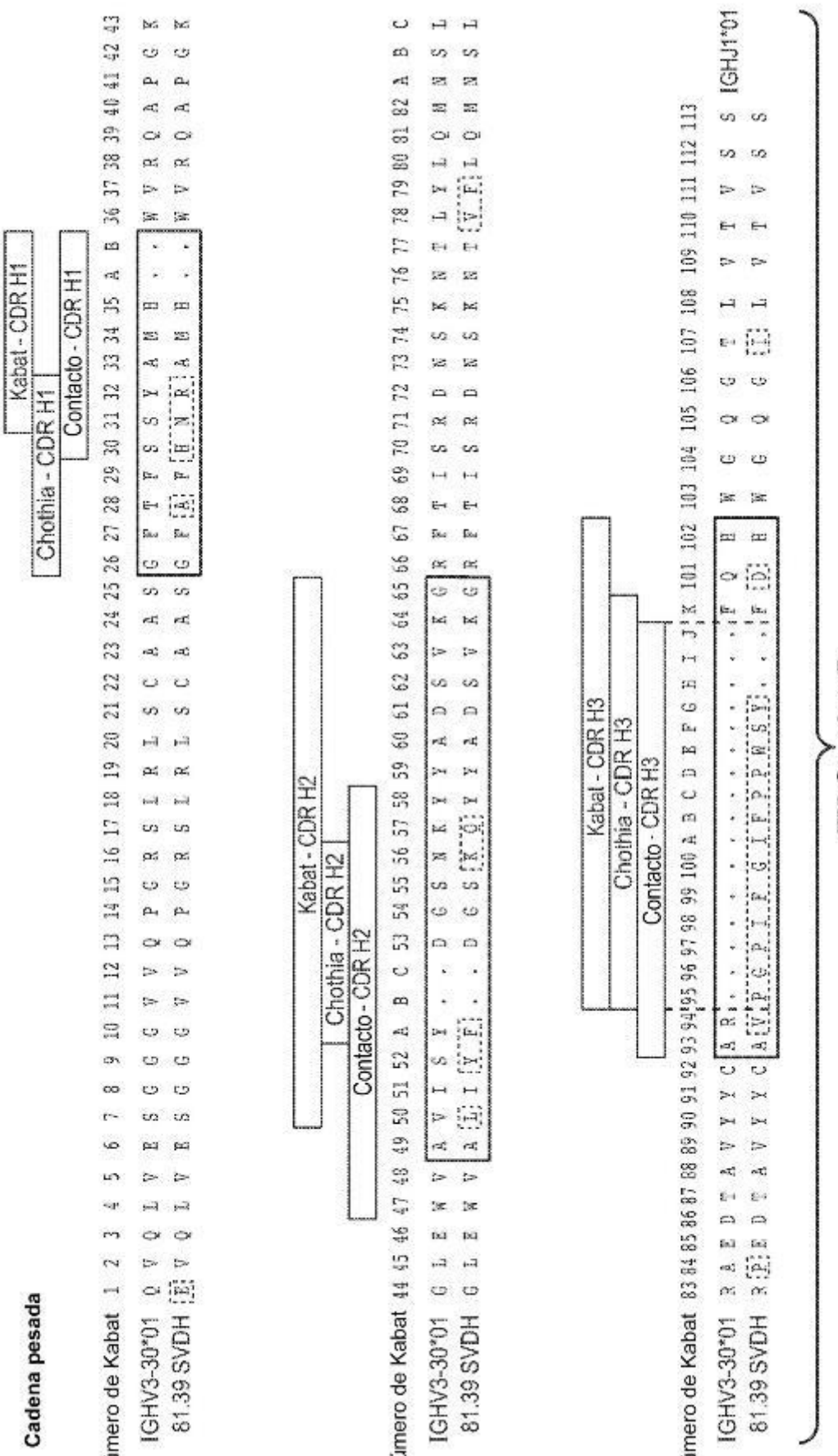
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV3-30*01
81.39 SVDH
IGHJ1*01

FIG. 27B

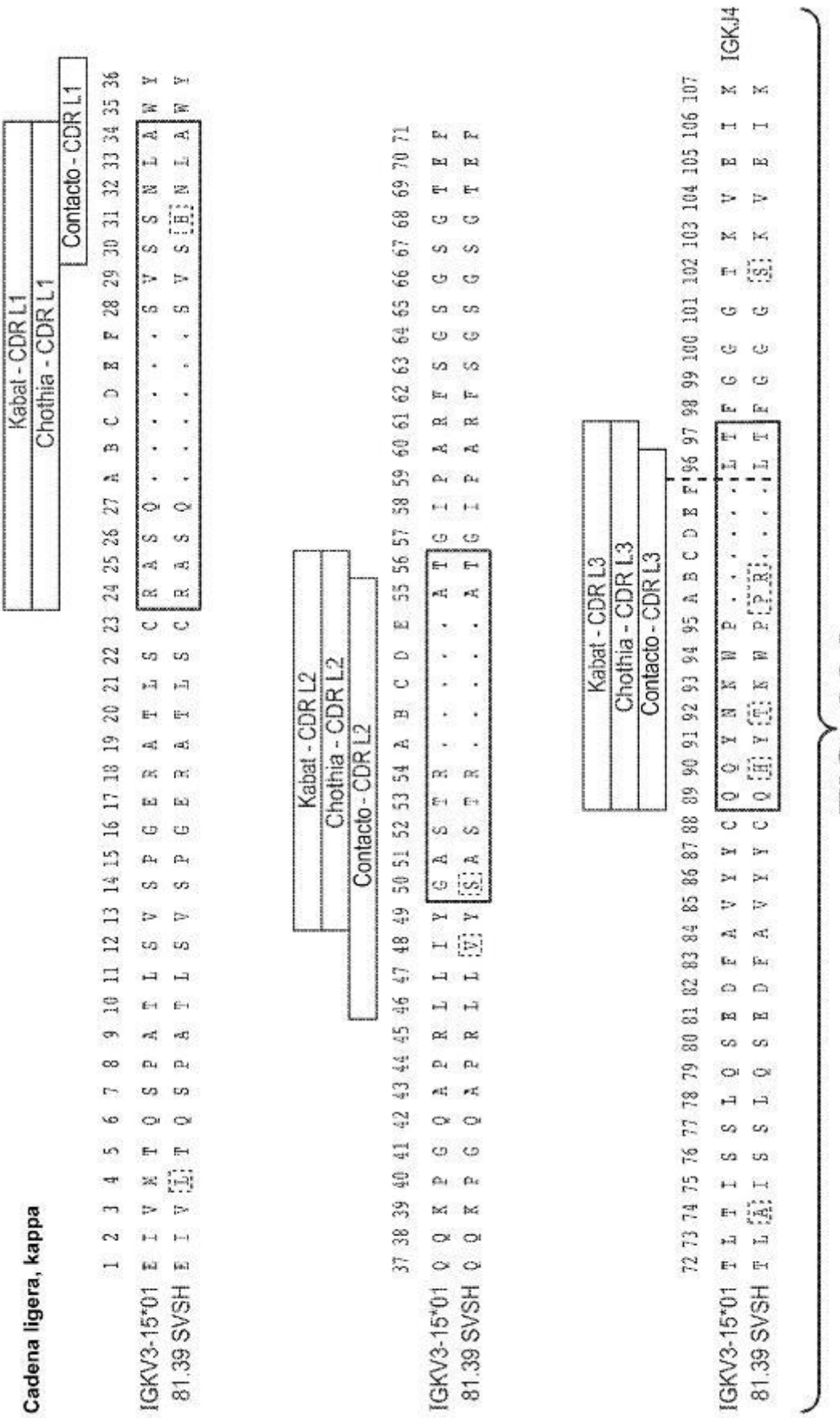
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
81.39 SVSH
IGKJ4

FIG. 28A

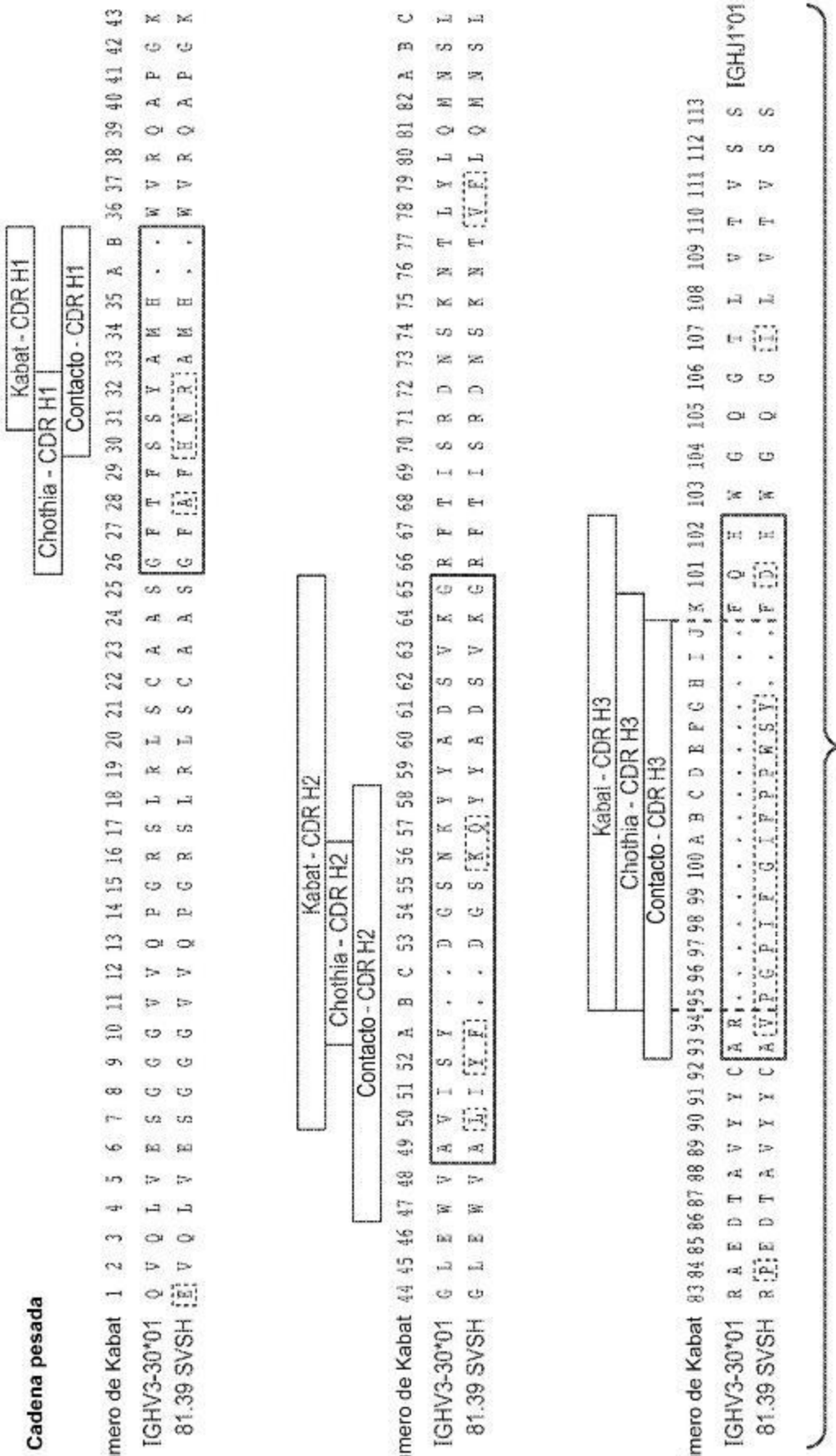
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV3-30*01
81.39 SVSH
IGHJ1*01

FIG. 28B

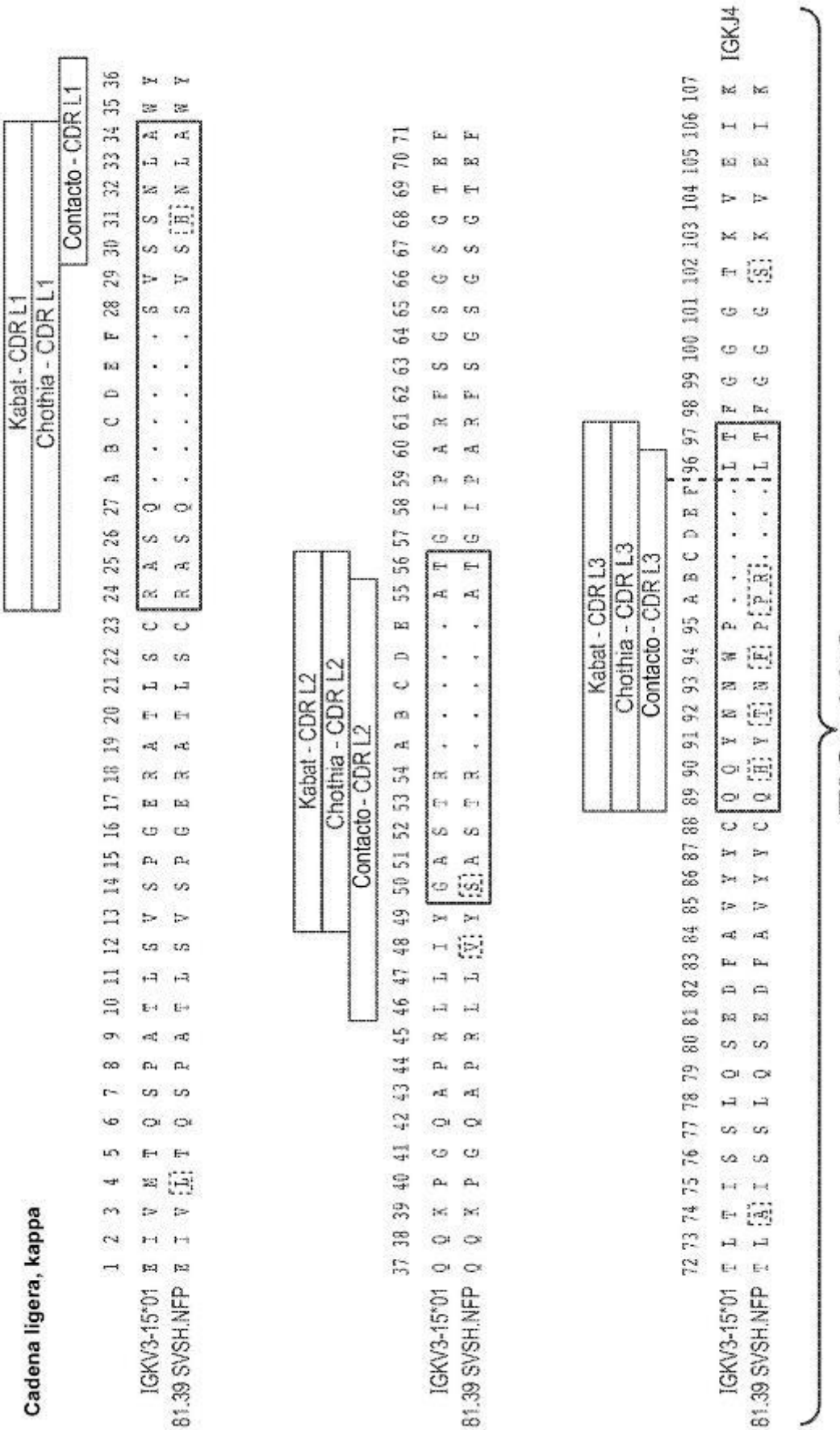
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
81.39 SVSH.NFP
IGKJ4

FIG. 29A

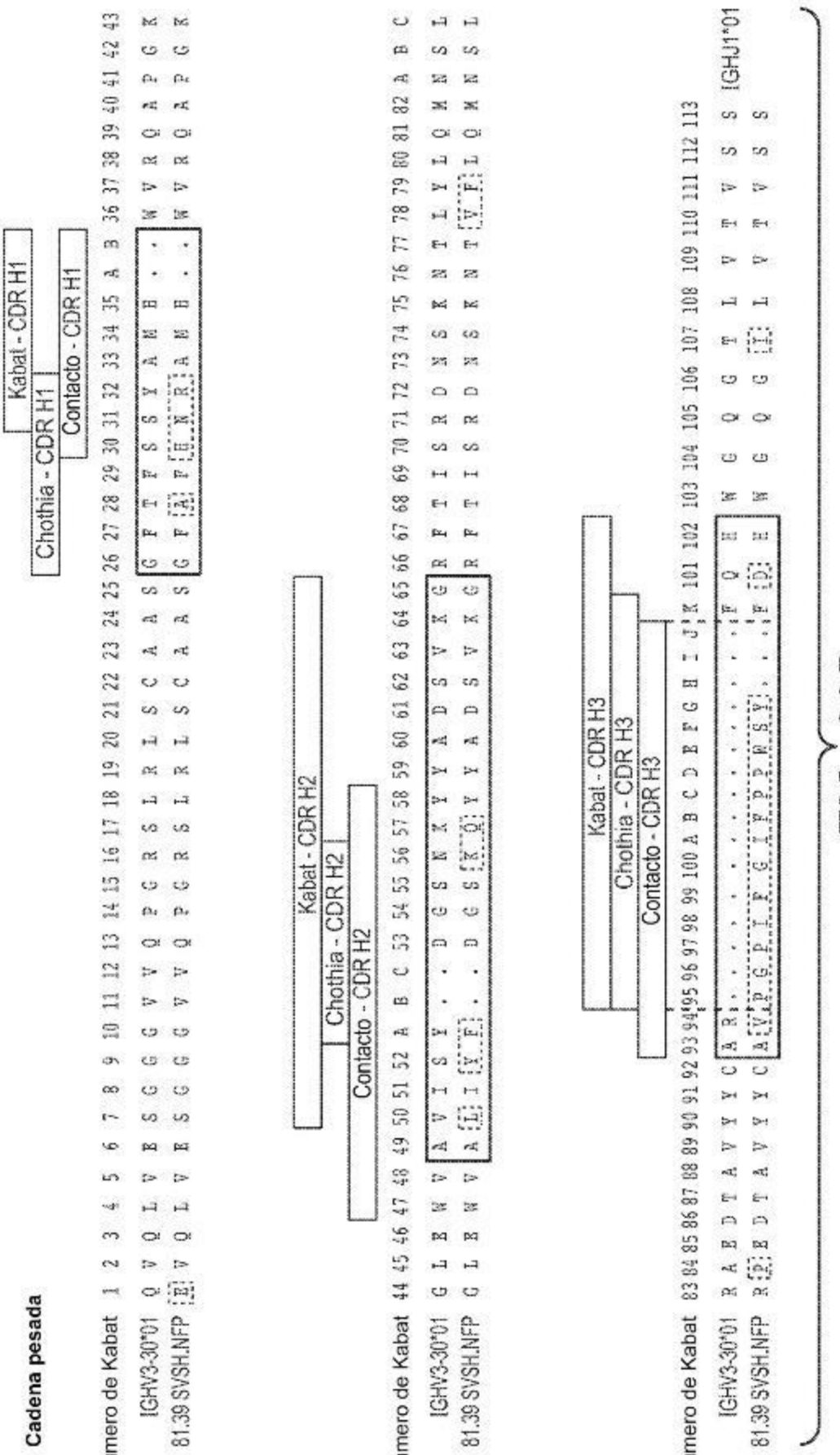
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV3-30*01
81.39 SVSH.NFP
IGHJ1*01

FIG. 29B

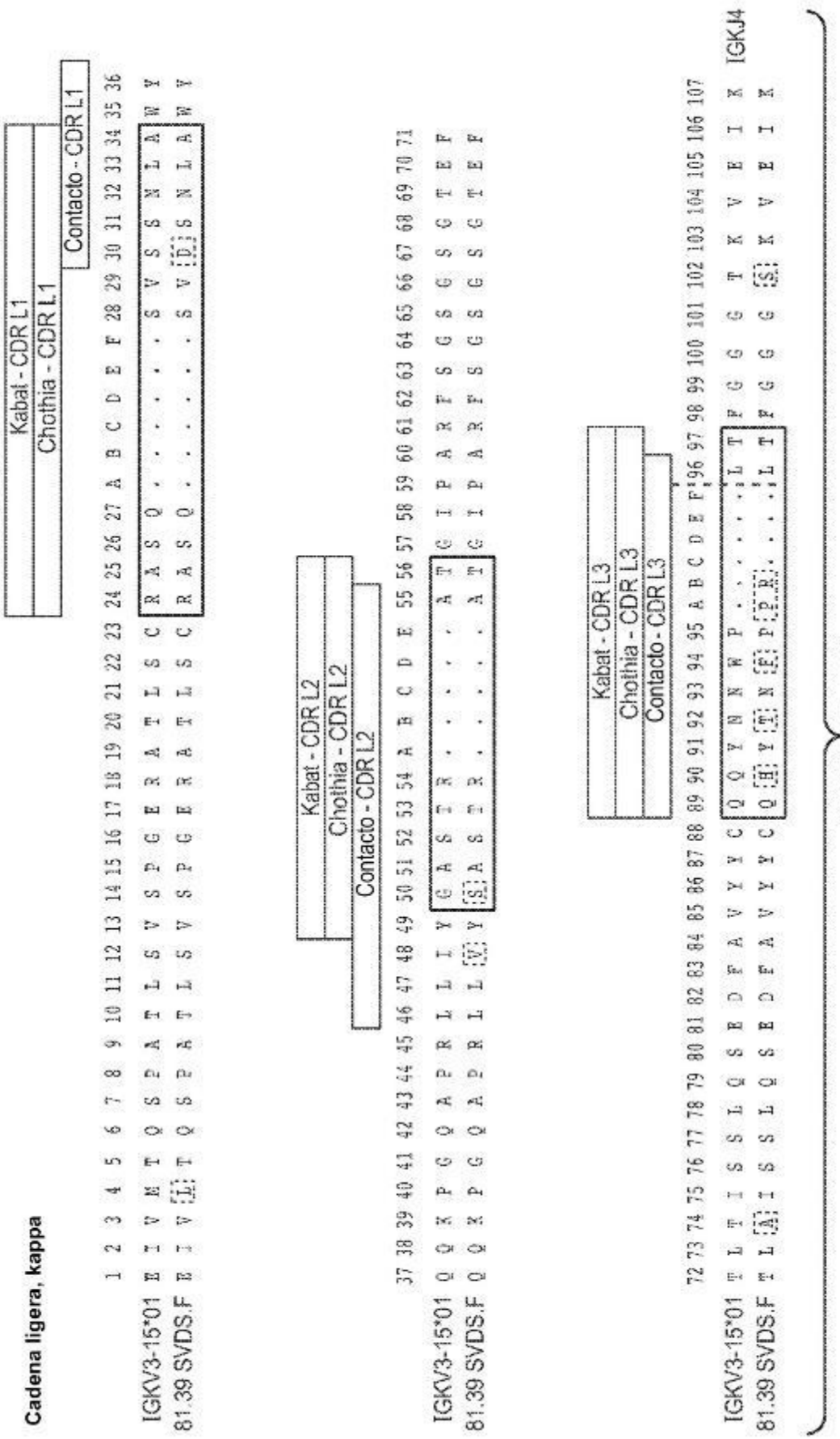
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
81.39 SVDS.F
IGKJ4

FIG. 30A

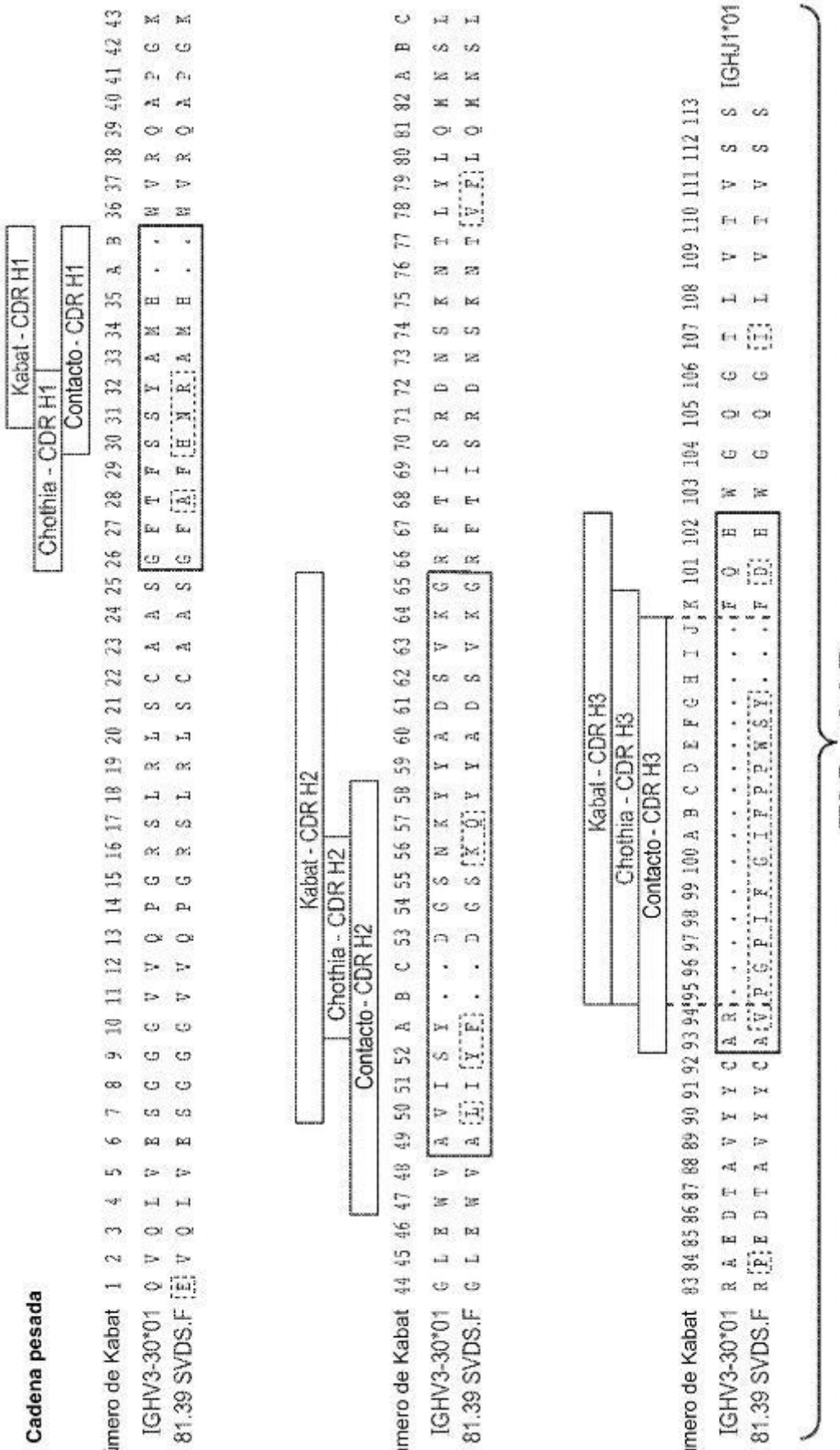
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV3-30*01
81.39 SVDS.F
IGHJ1*01

FIG. 30B

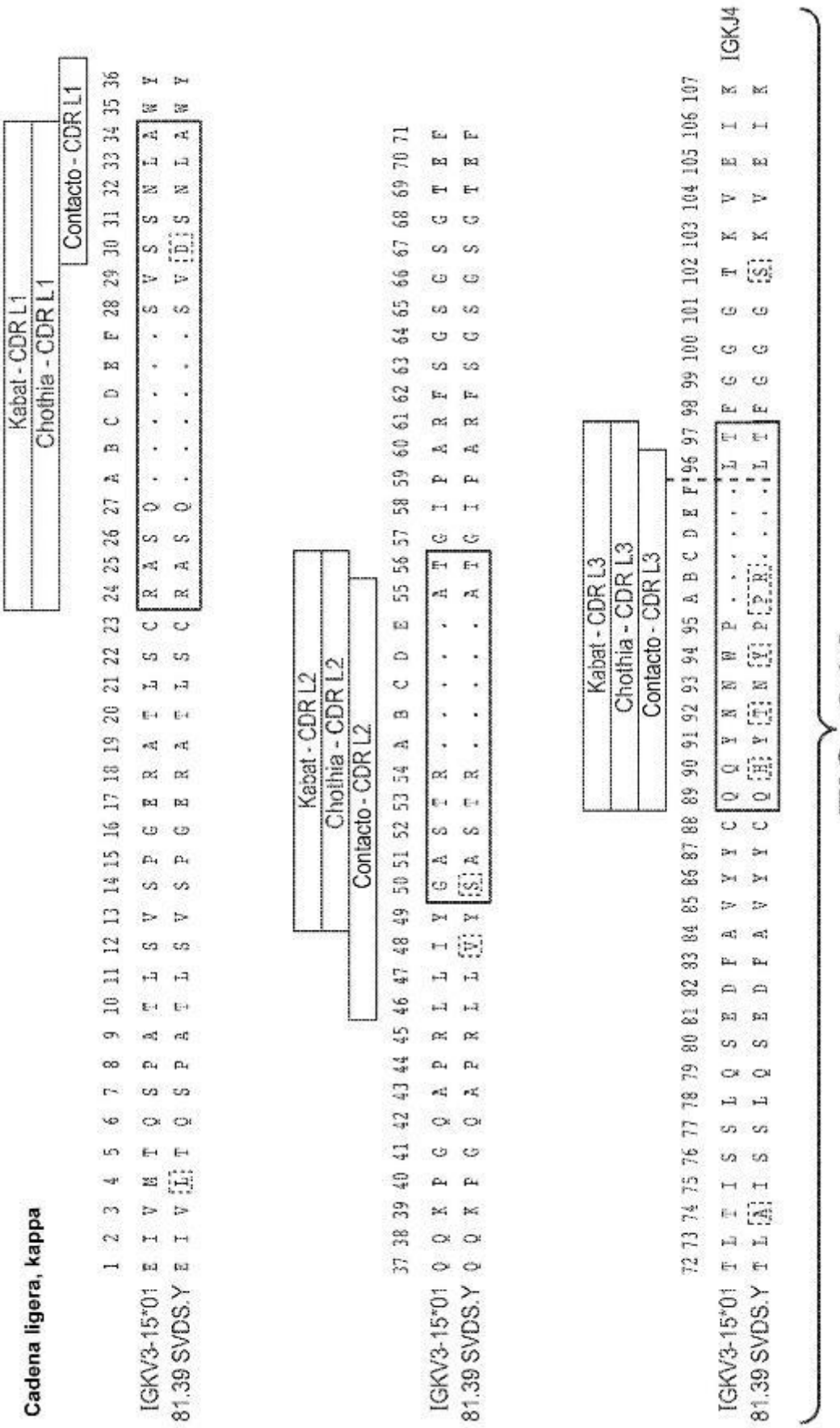
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
81.39 SVDS.Y
IGKJ4

FIG. 31A

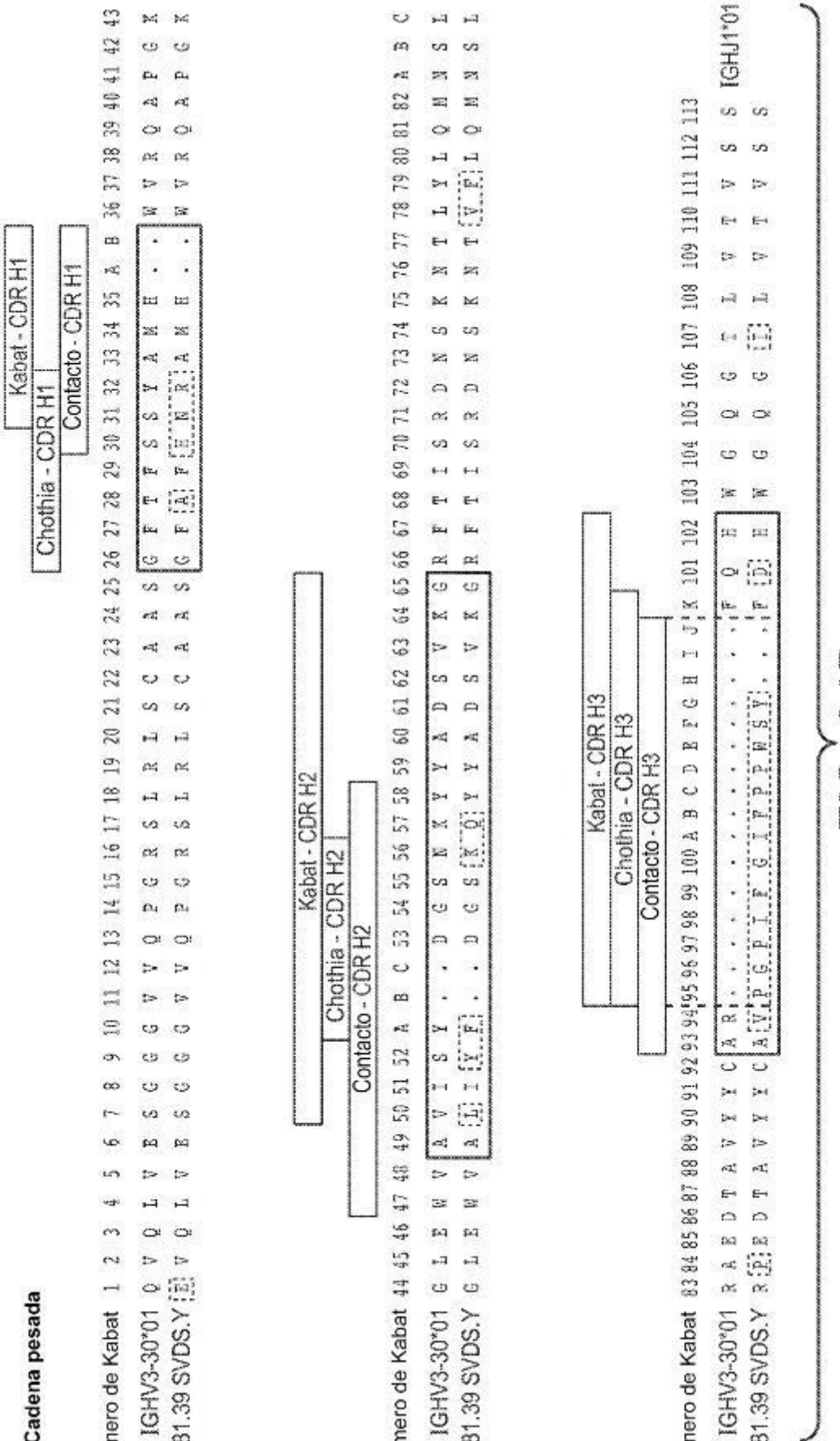
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV3-30*01
81.39 SVDS.Y
IGHJ1*01

FIG. 31B

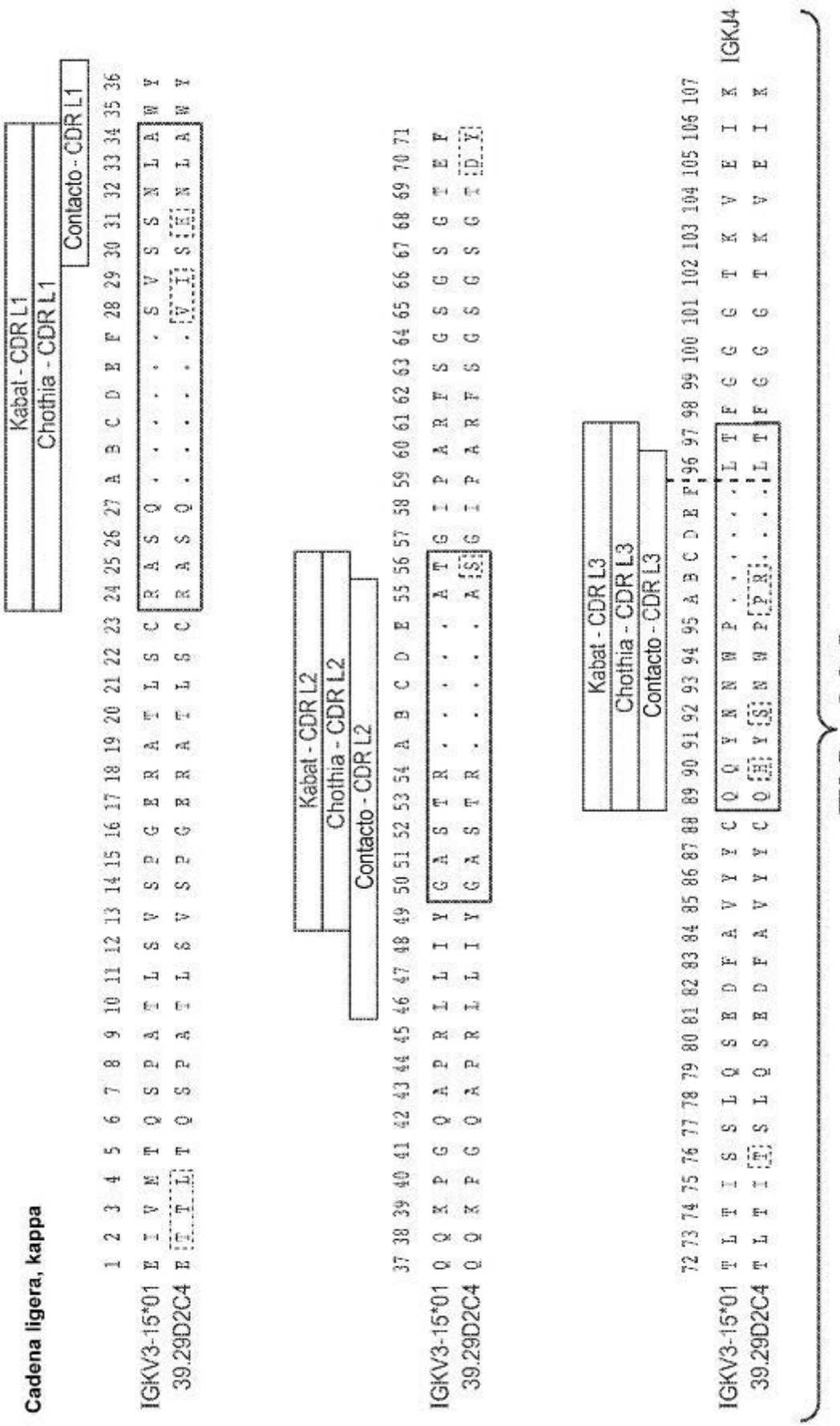
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
39.29D2C4
IGKJ4

FIG. 32A

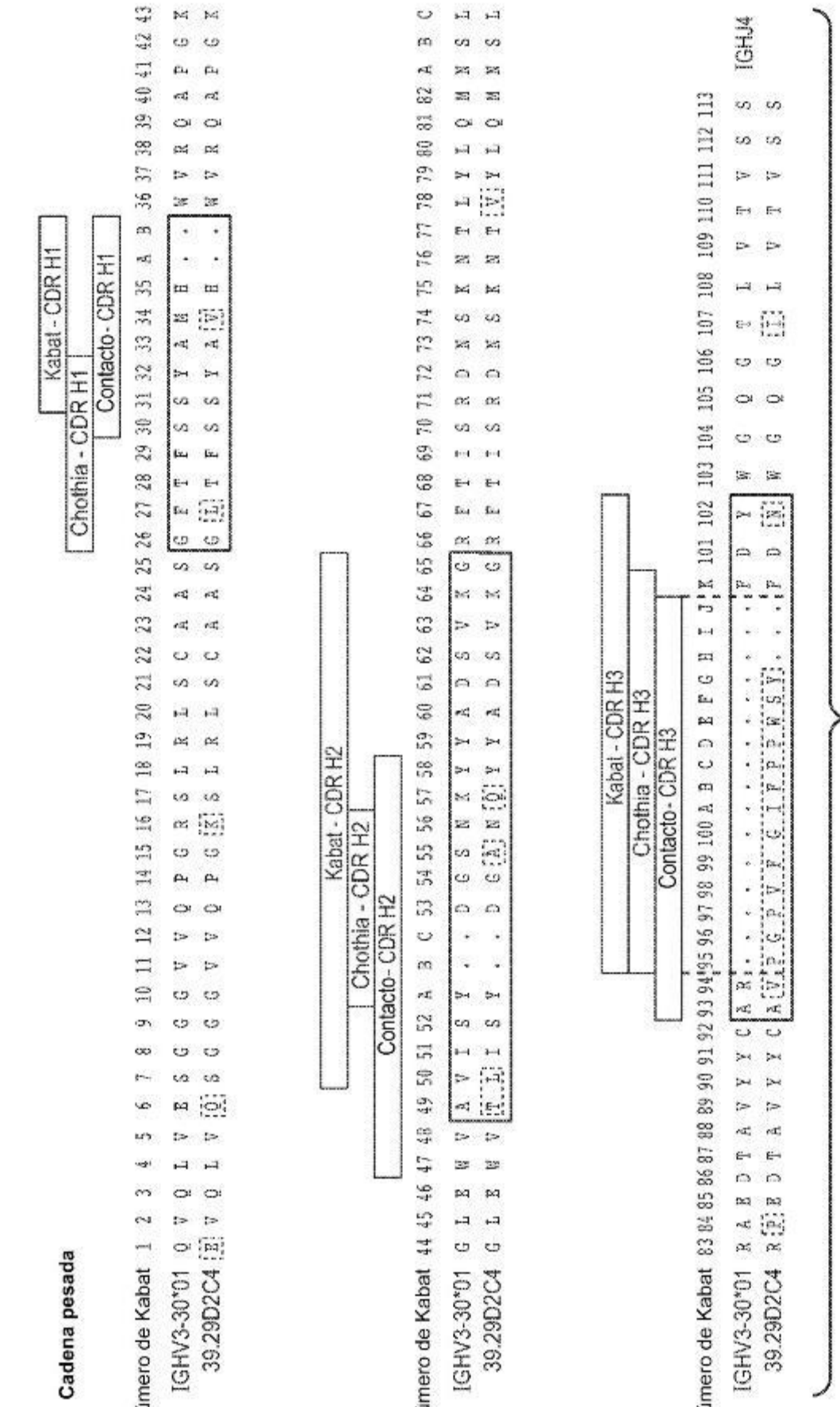
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV3-30*01
39.29D2C4
IGHJ4

FIG. 32B

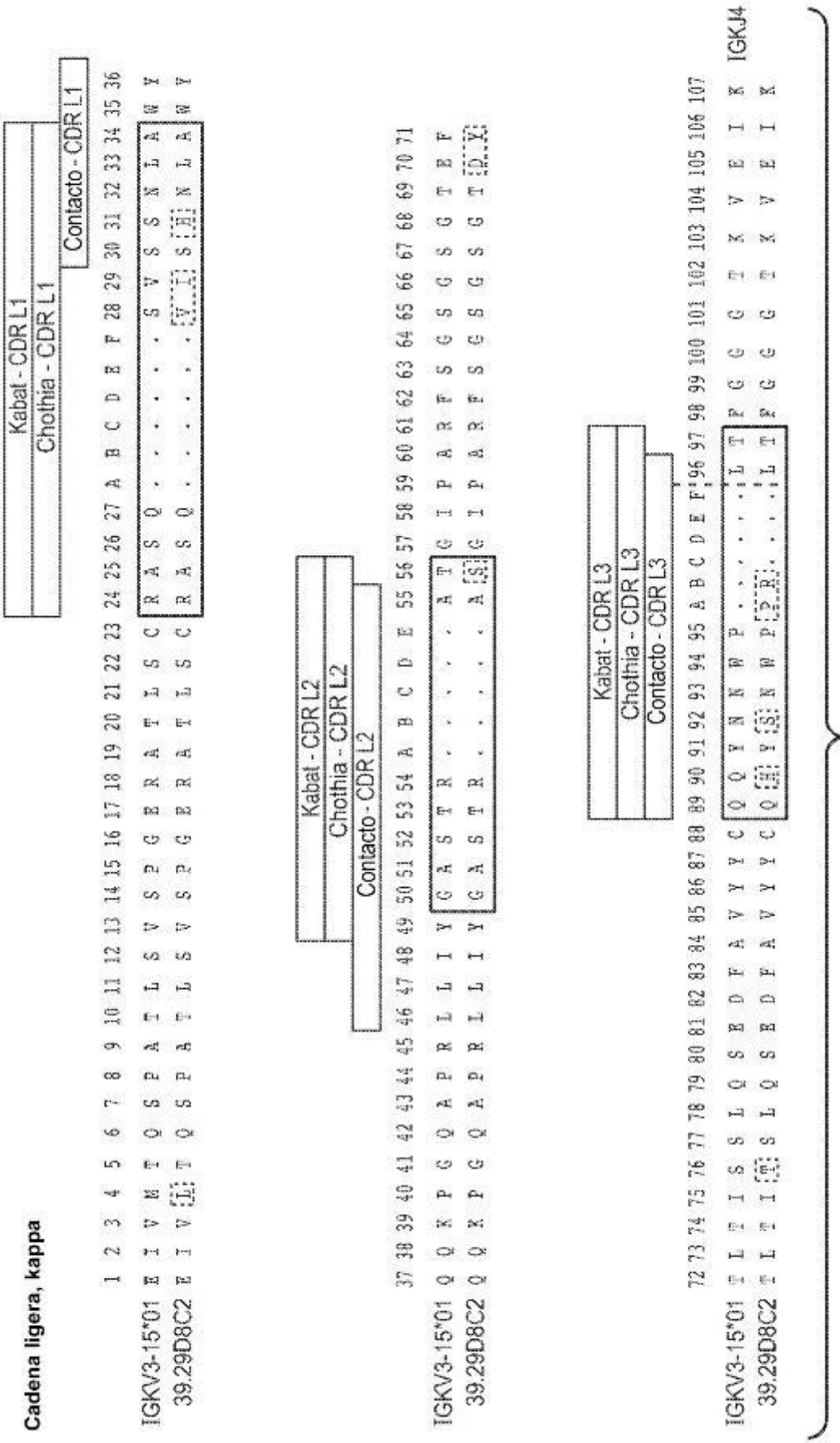
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
39.29D8C2
IGKJ4

FIG. 33A

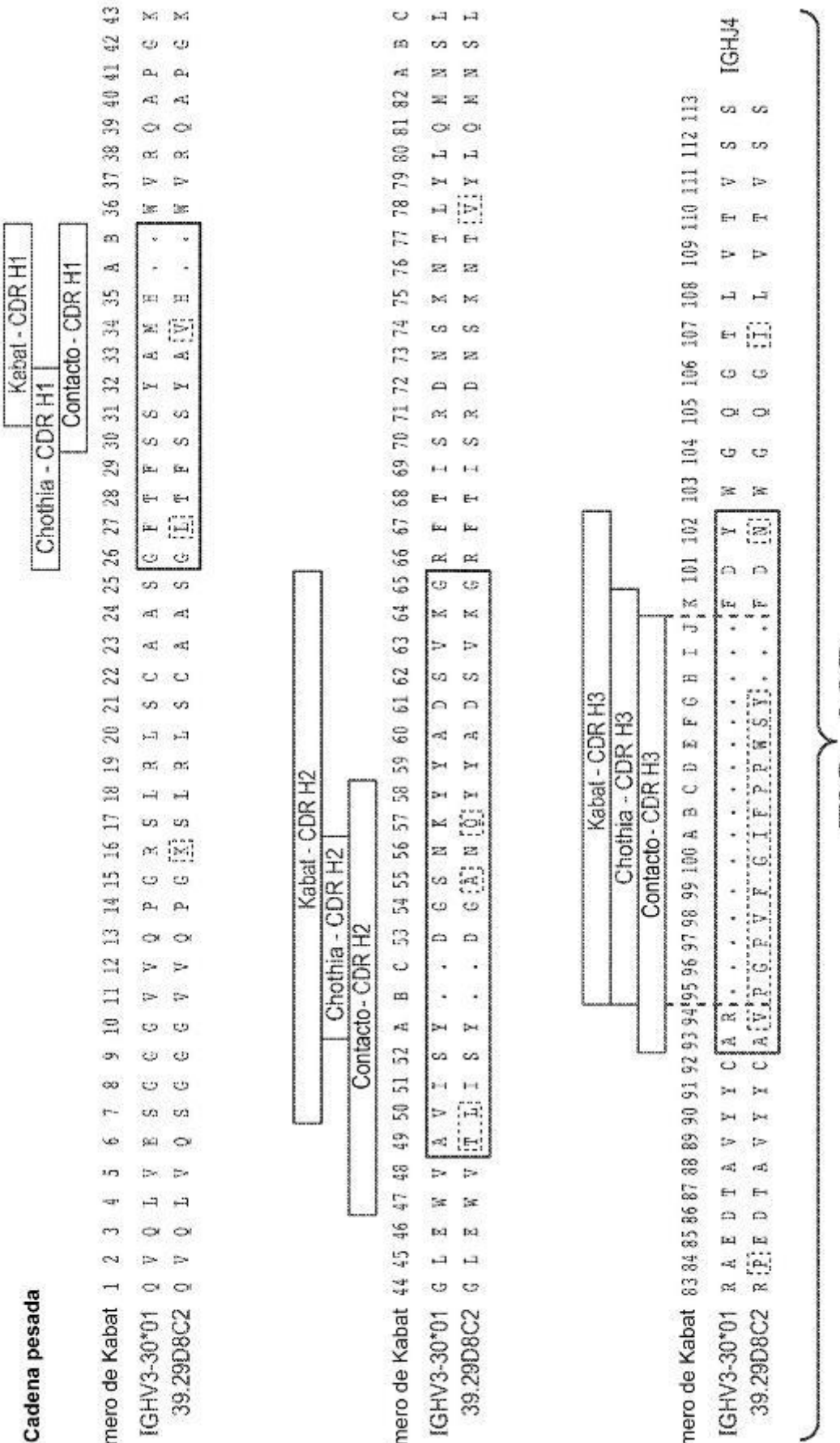
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV3-30*01
39.29D8C2
IGHJ4

FIG. 33B

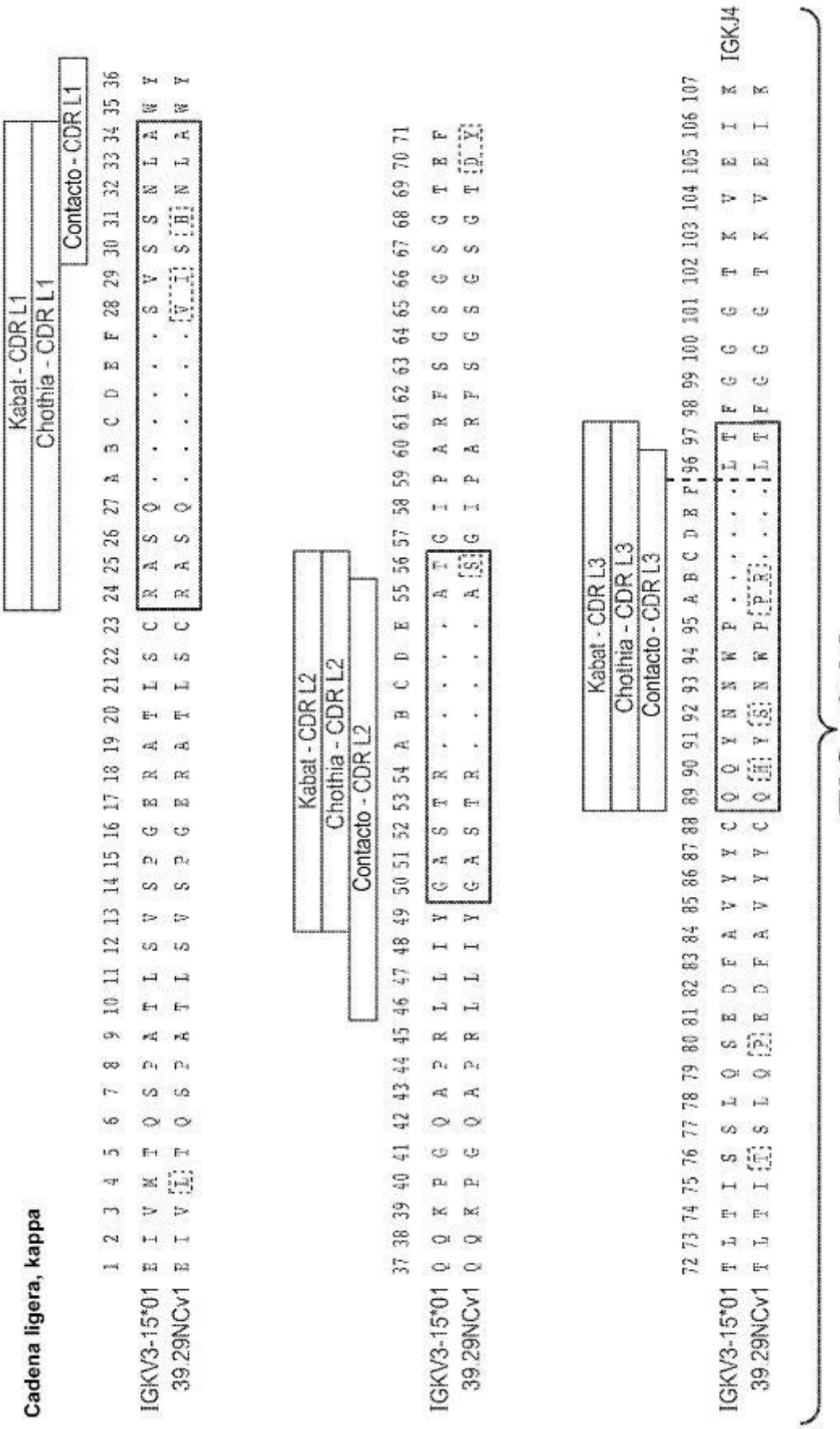
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
39.29NCv1
IGKJ4

FIG. 34A

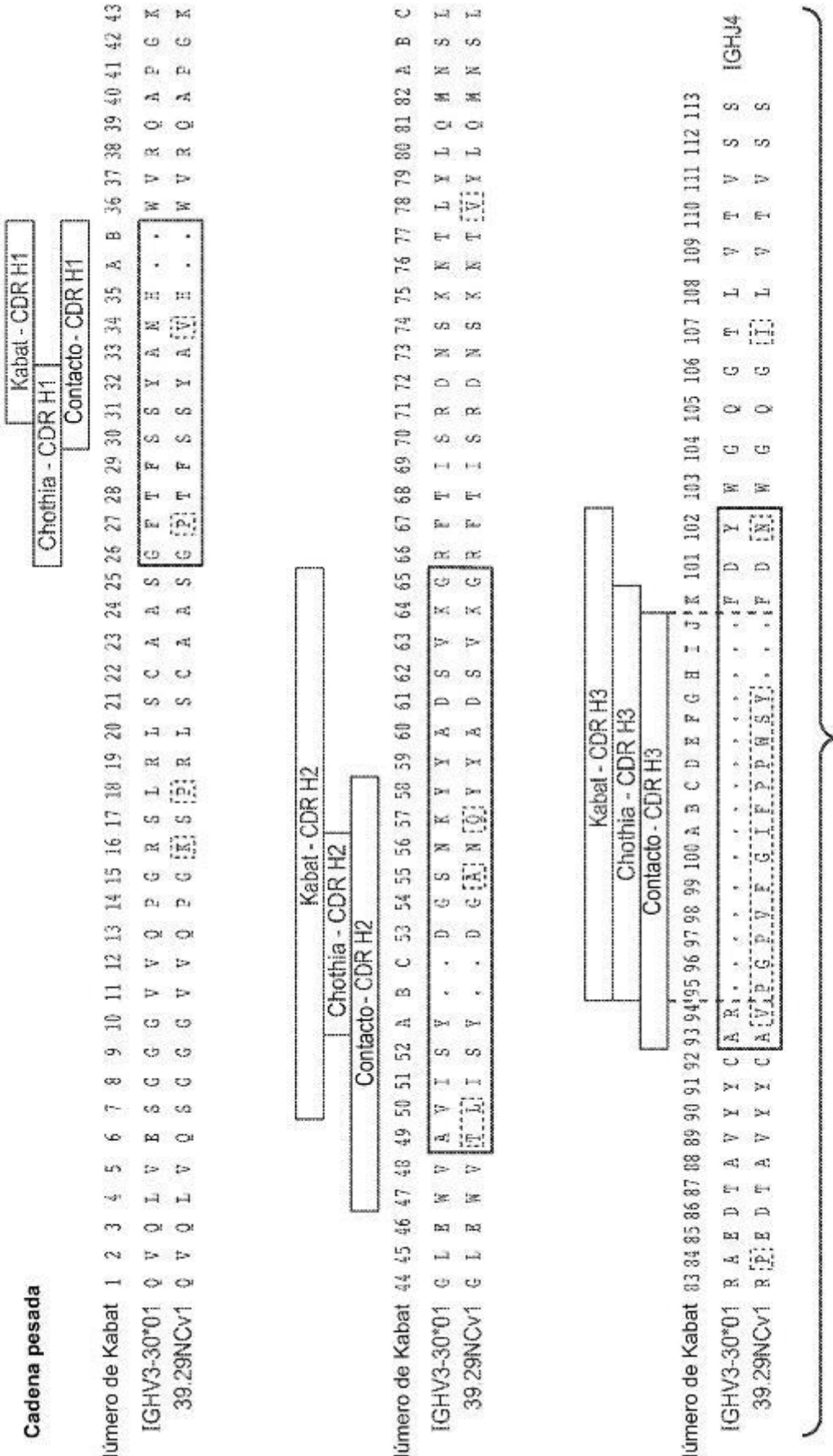
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV3-30*01
39.29NCv1
IGHJ4

FIG. 34B

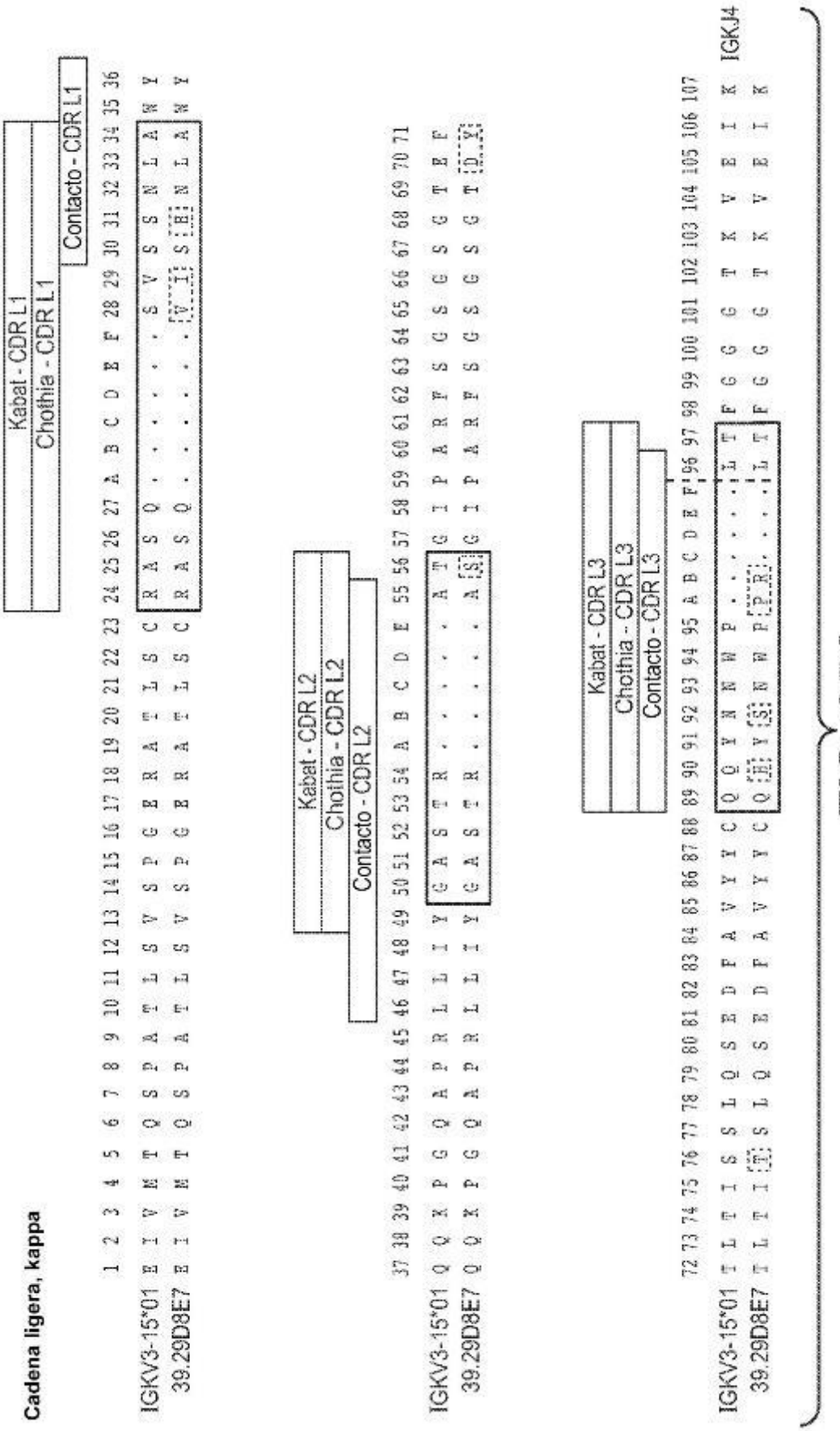
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
39.29D8E7
IGKJ4

FIG. 35A

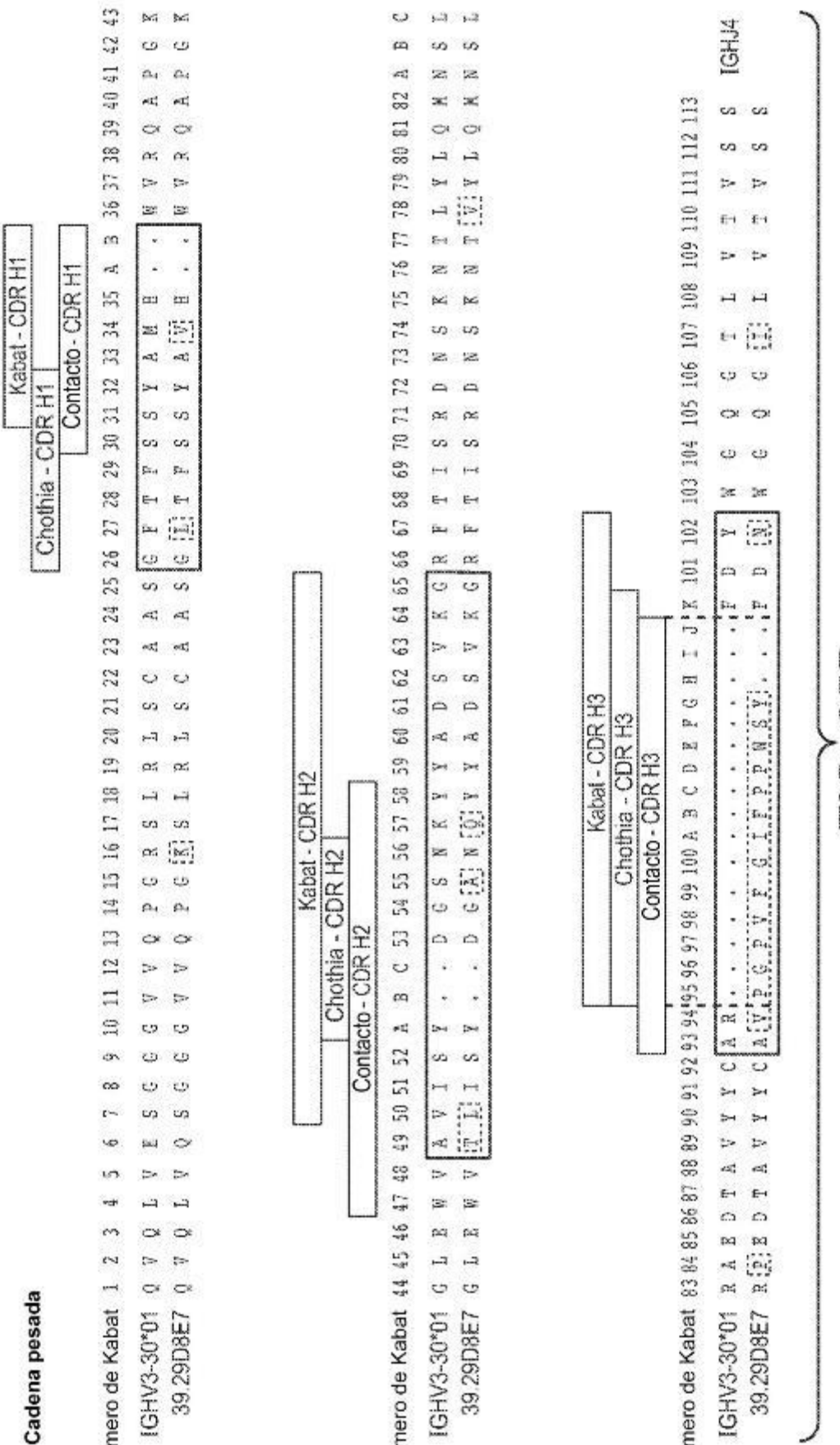
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV3-30*01
39.29D8E7
IGHJ4

FIG. 35B

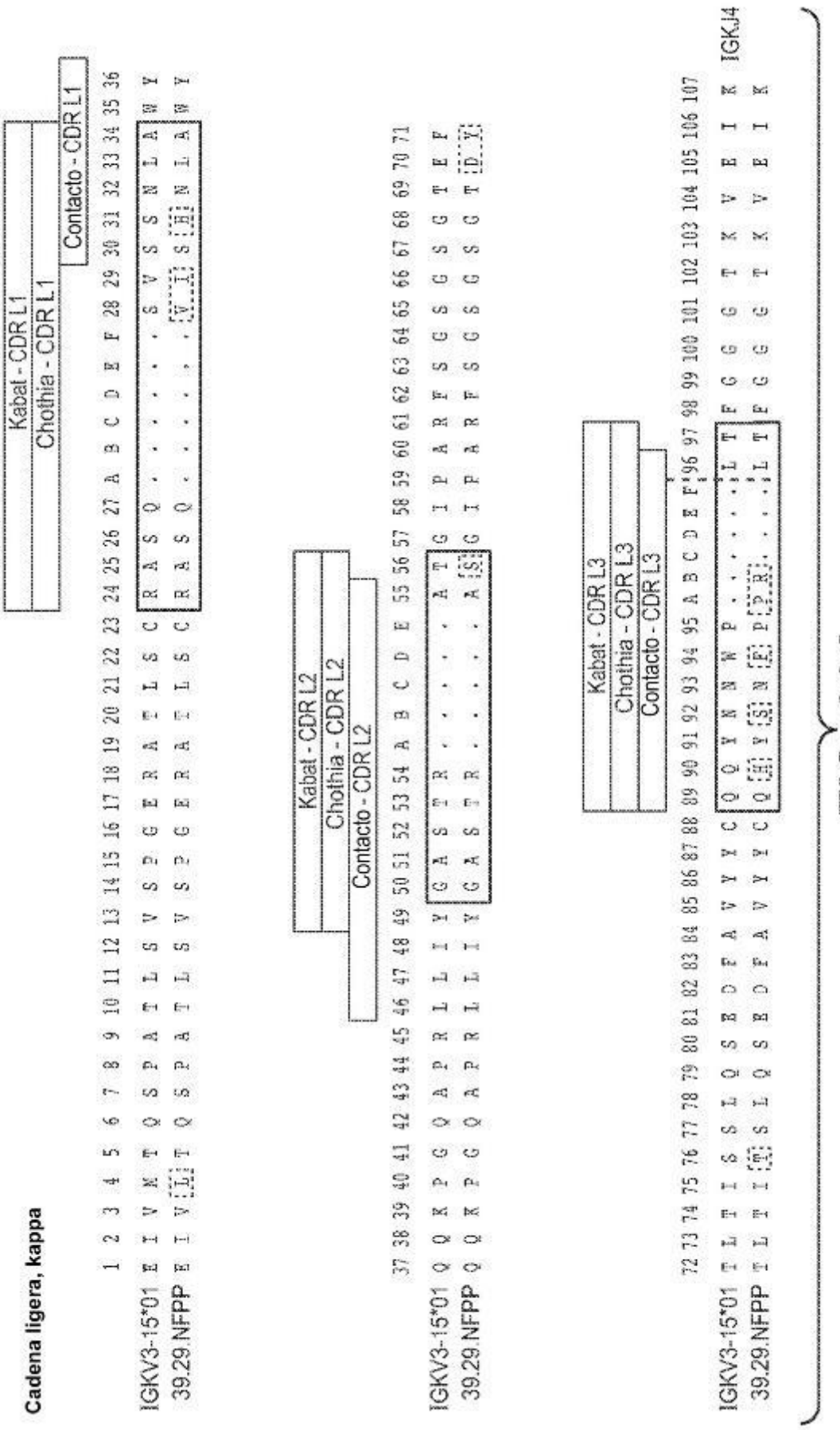
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
39.29.NFPP
IGKJ4

FIG. 36A

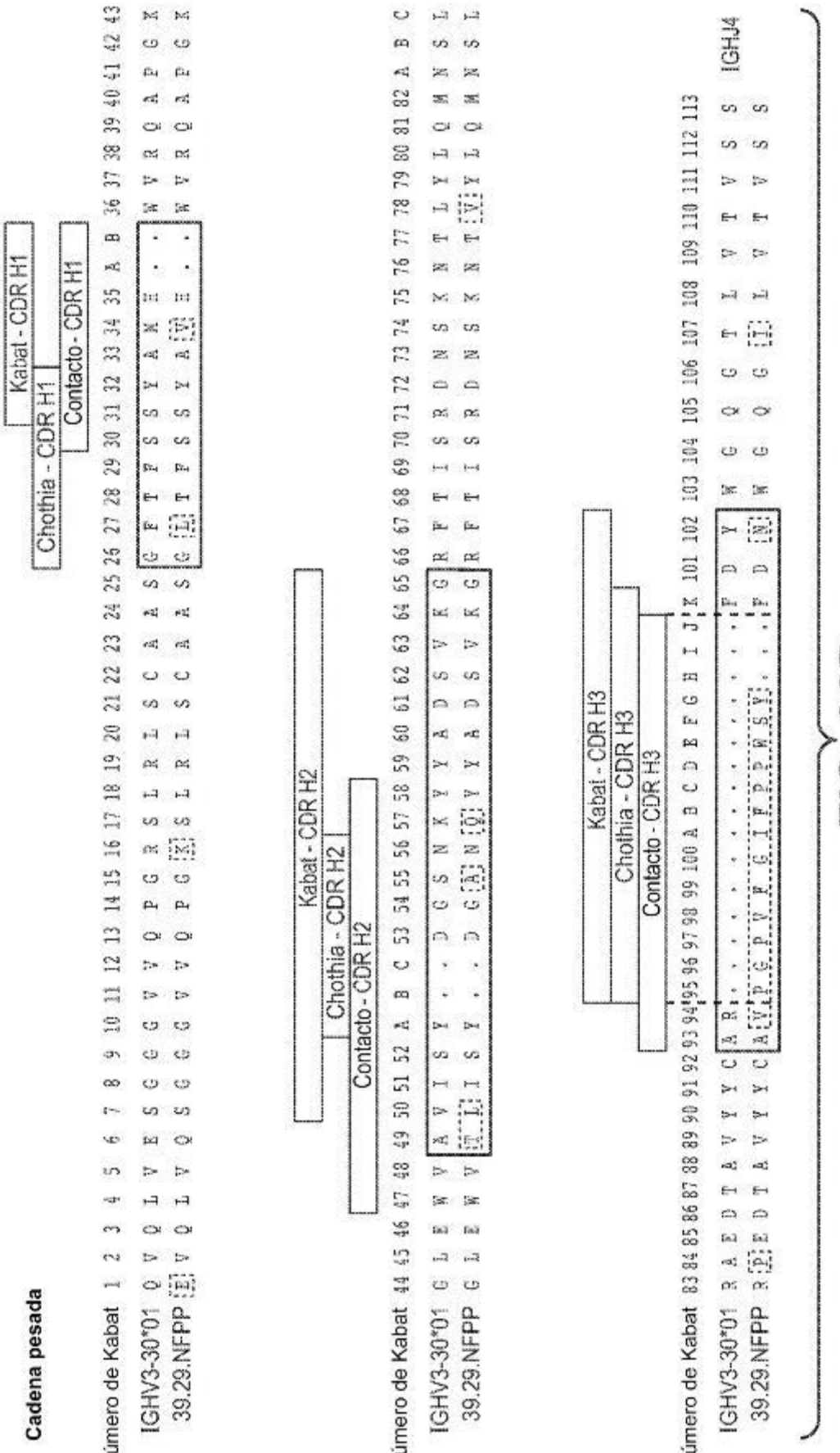
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
IGHJ4

FIG. 36B

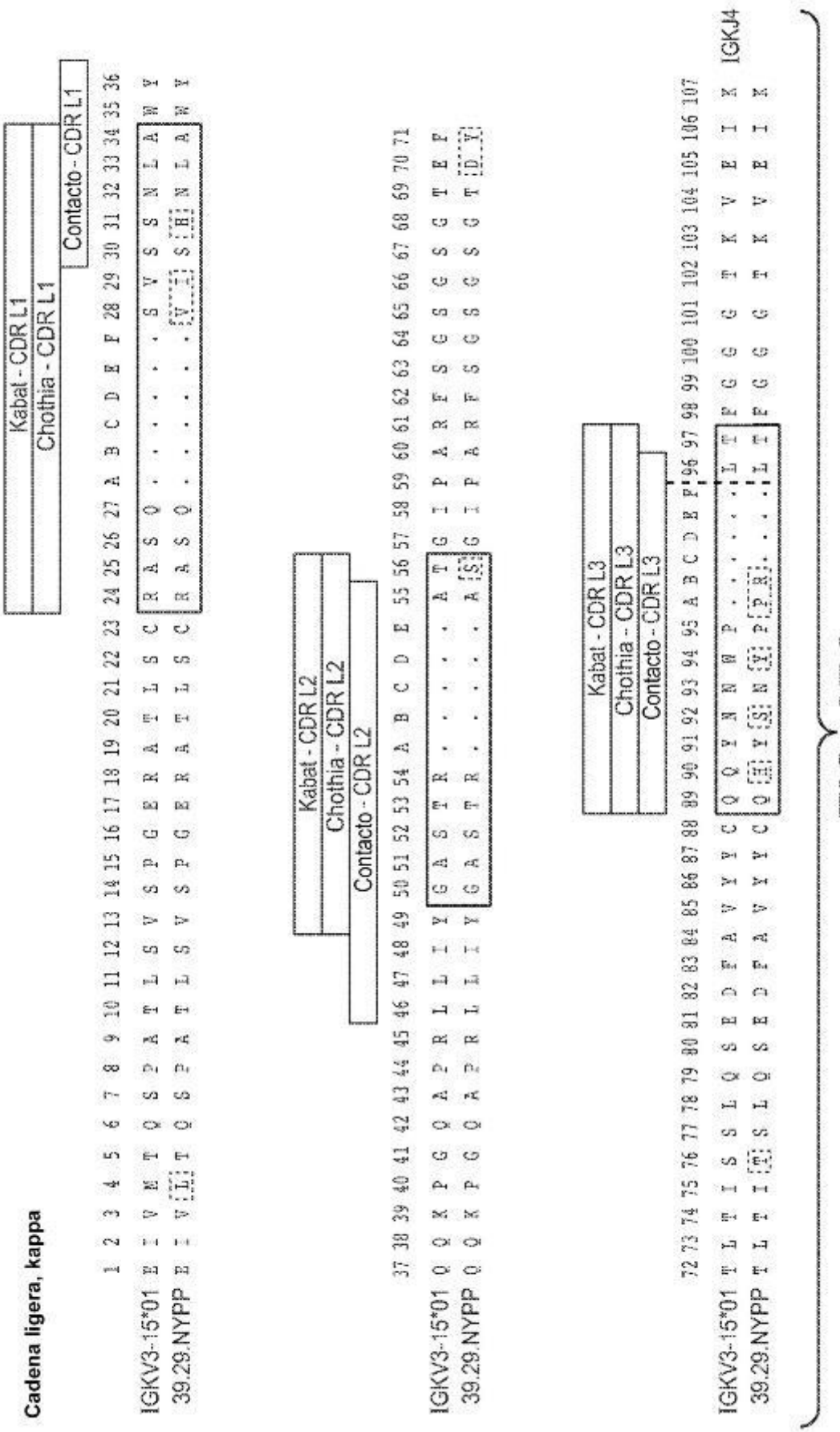
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
39.29.NYPP
IGKJ4

FIG. 37A

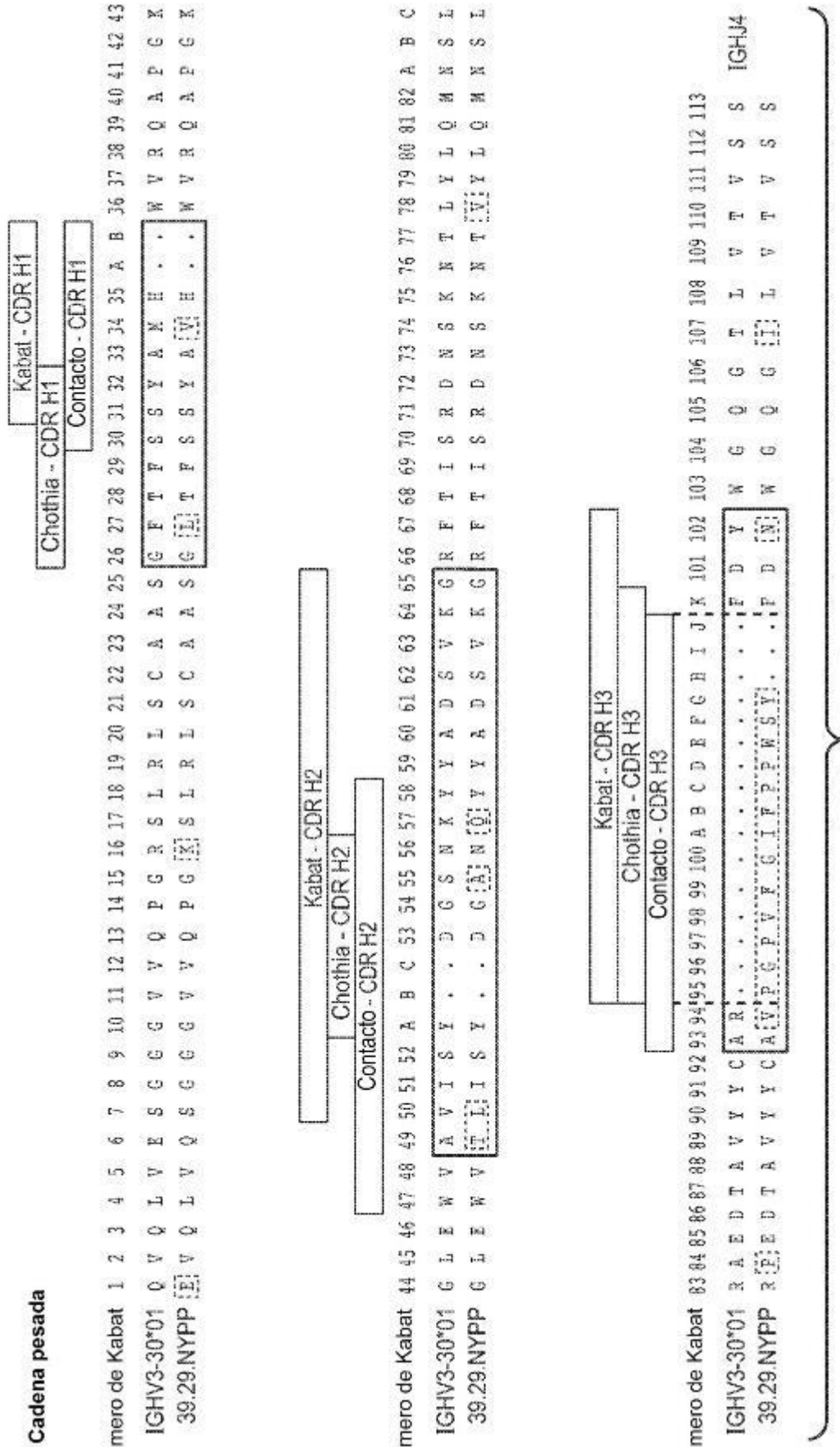
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
IGHJ4

FIG. 37B

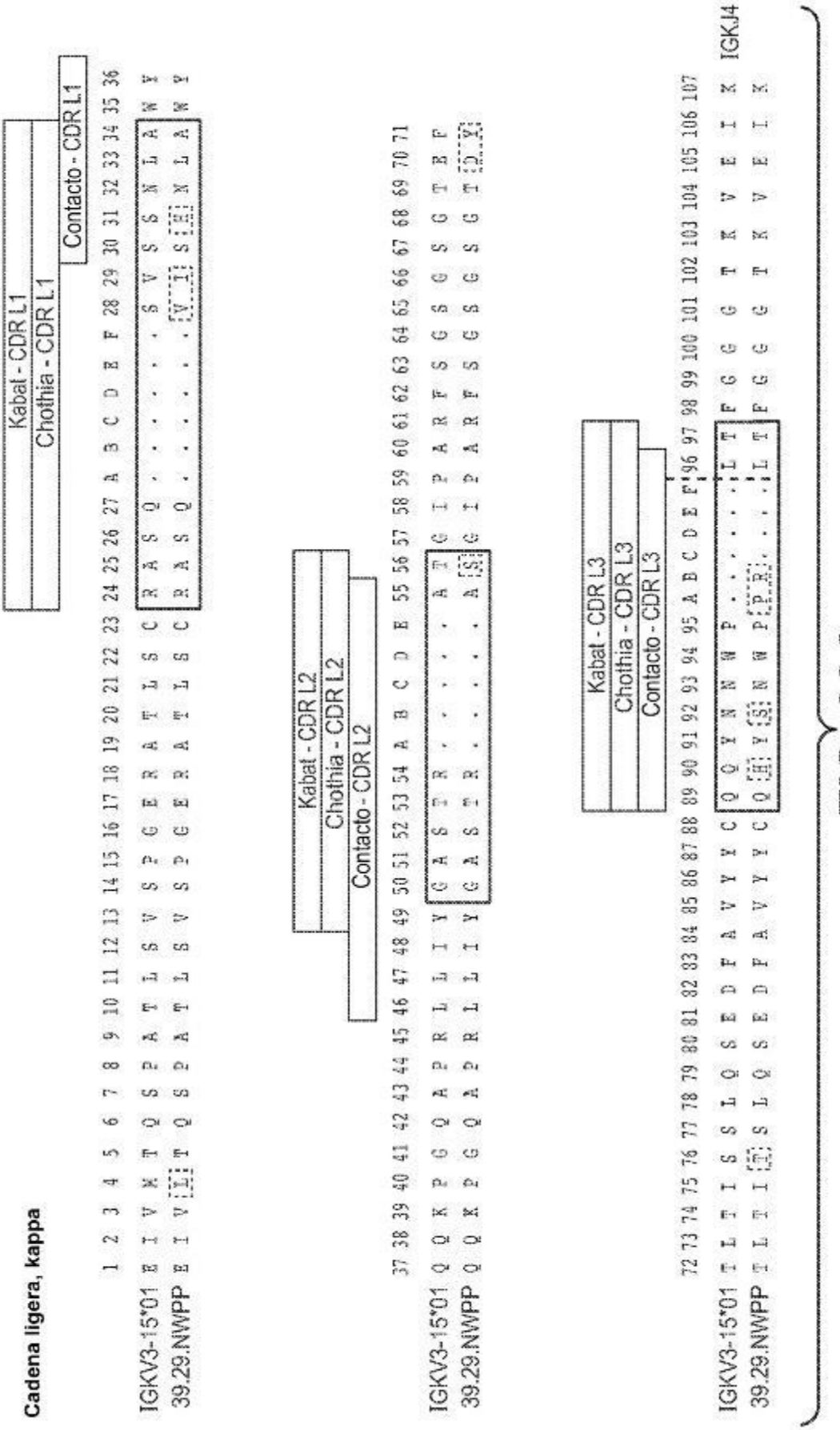
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
39.29.NWPP
IGKJ4

FIG. 38A

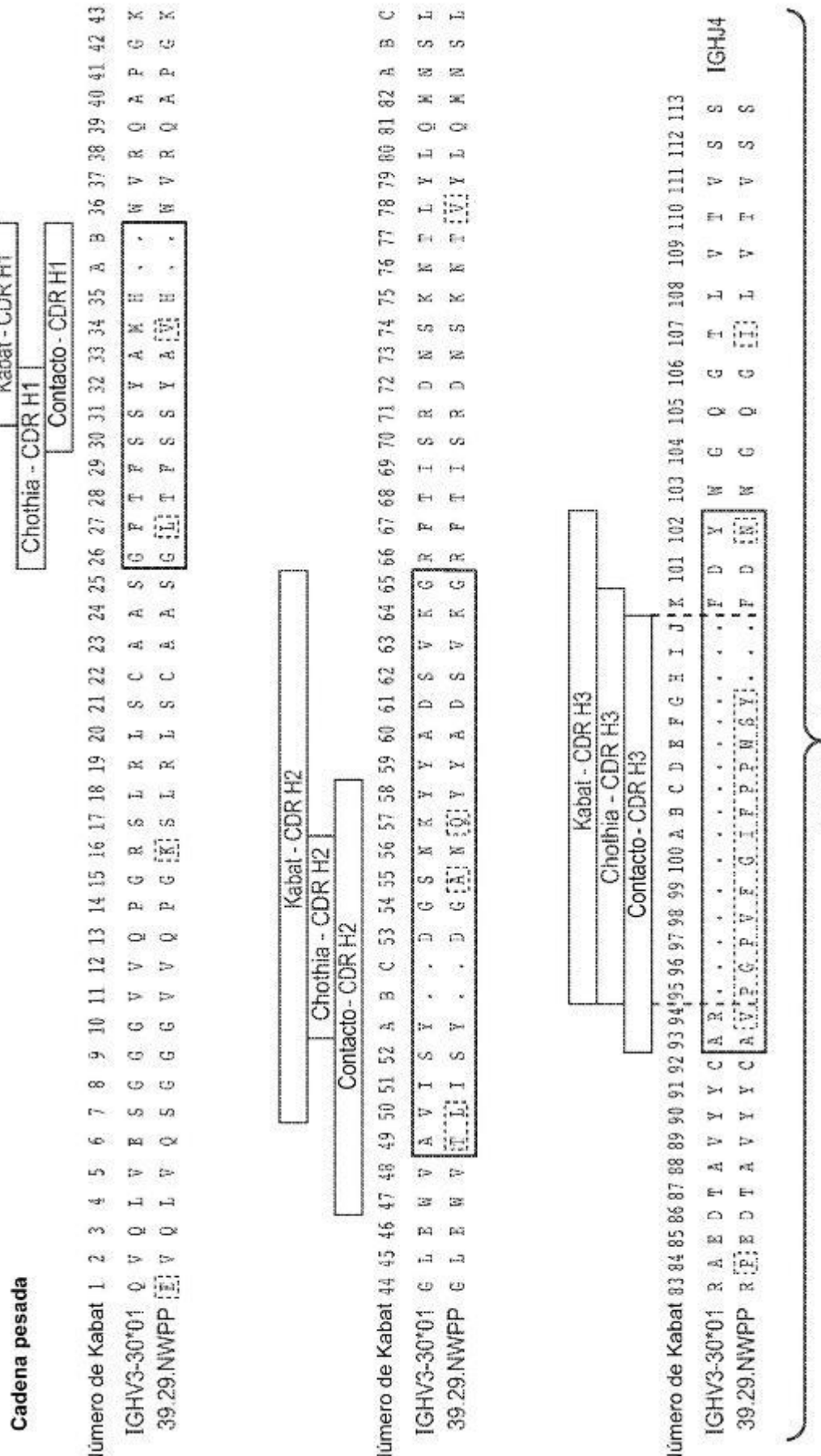
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
IGHJ4

FIG. 38B

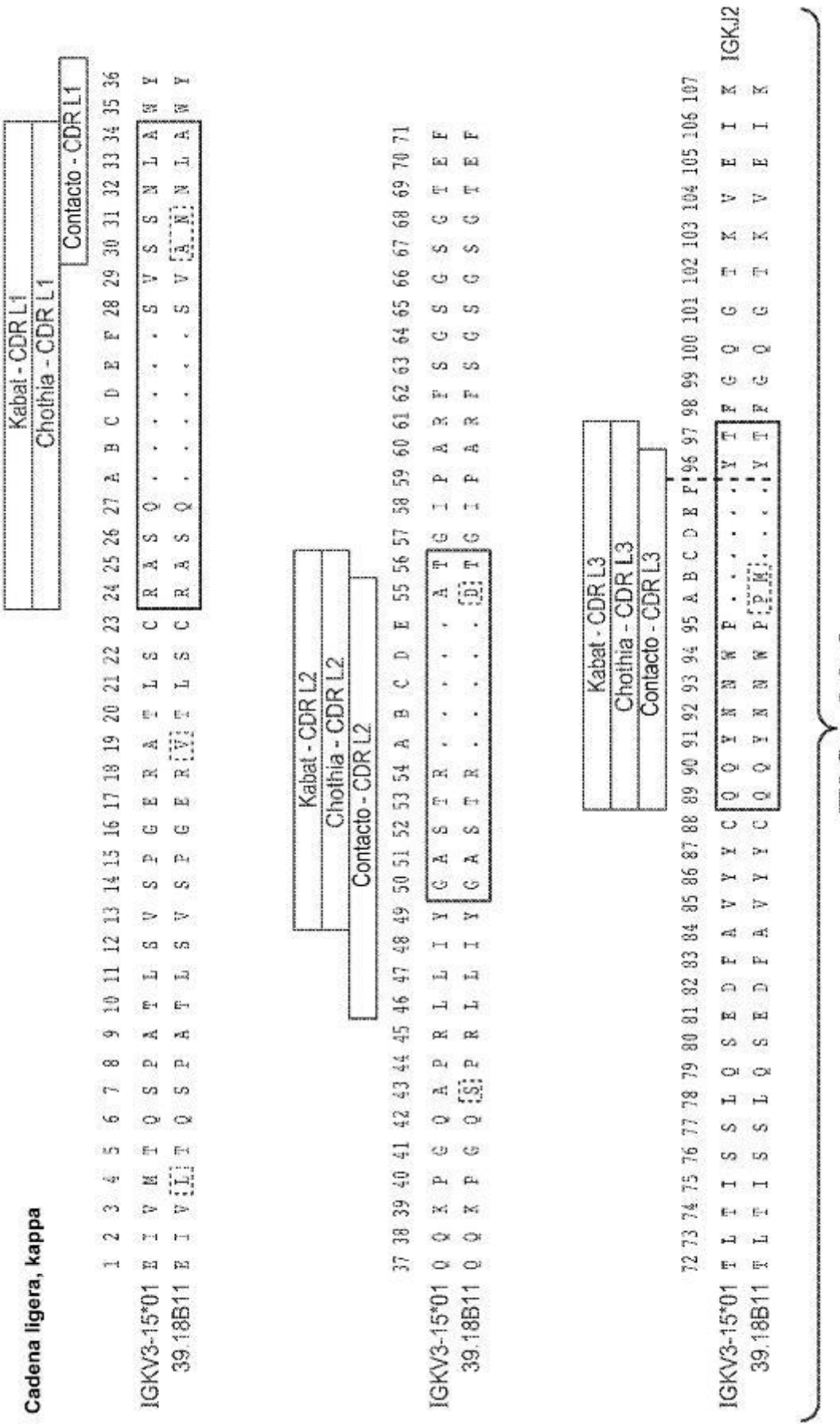
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
39.18B11
IGKJ2

FIG. 39A

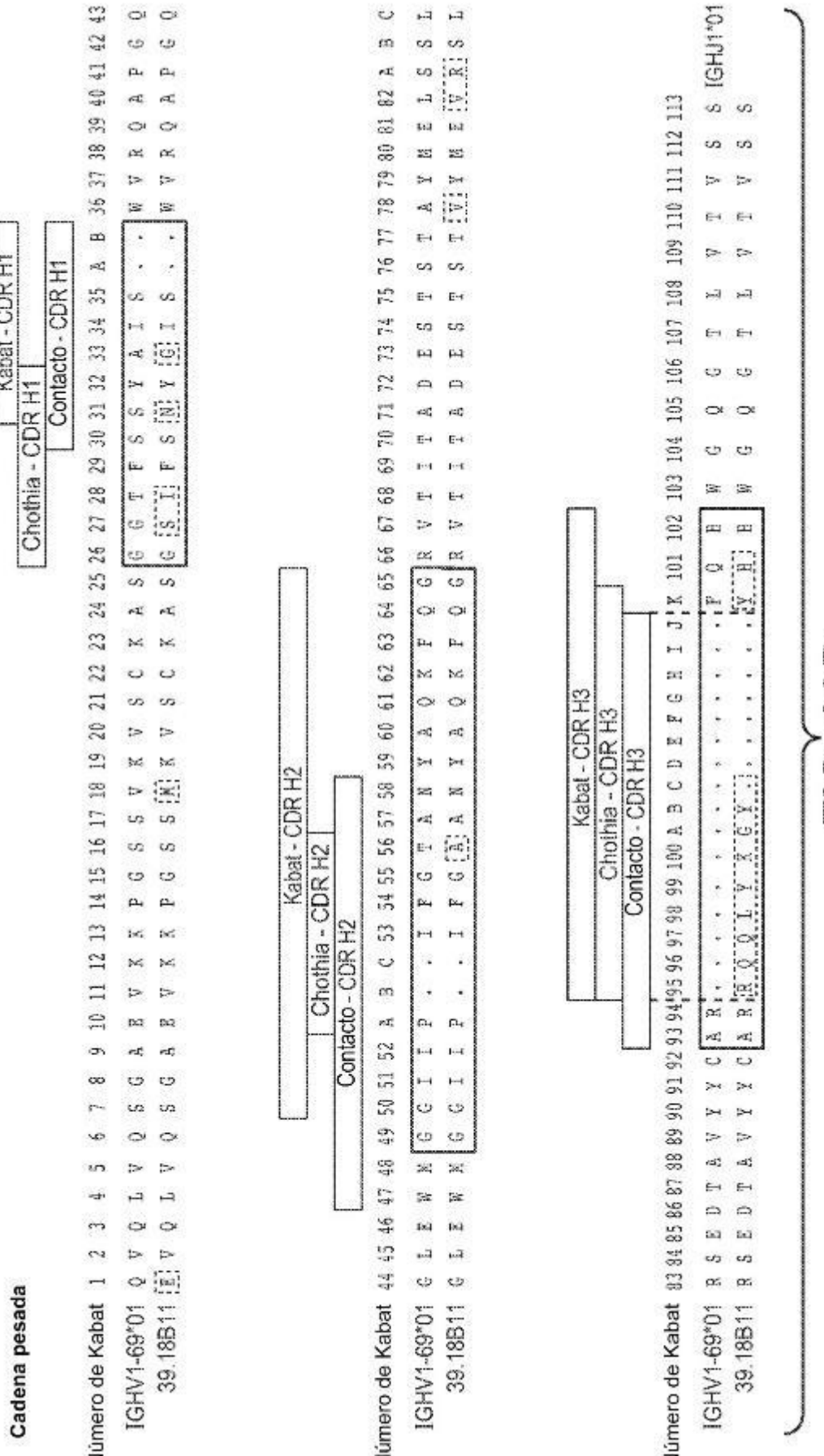
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV1-69*01
39.18B11
IGHJ1*01

FIG. 39B

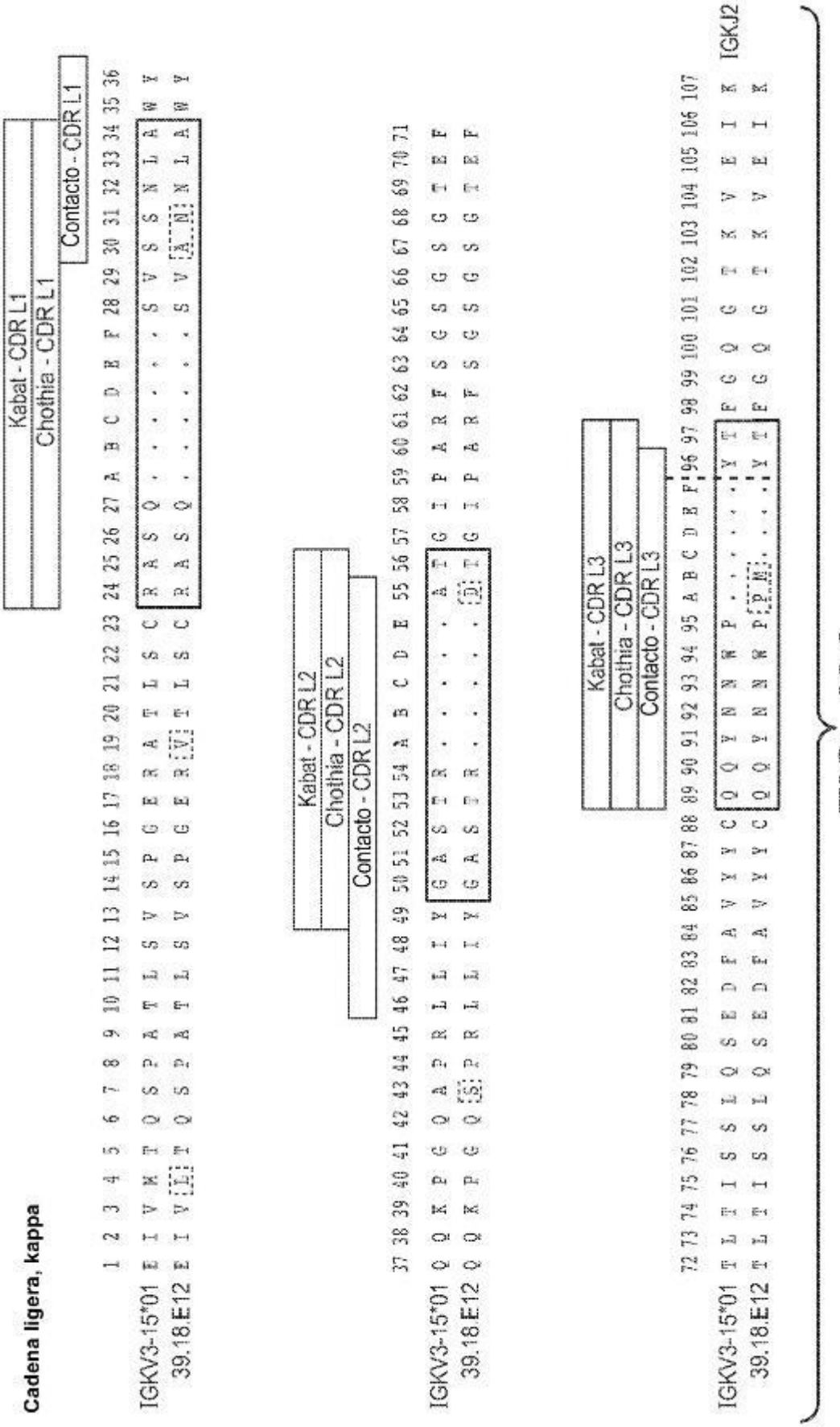
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV3-15*01
39.18.E12
IGKJ2

FIG. 40A

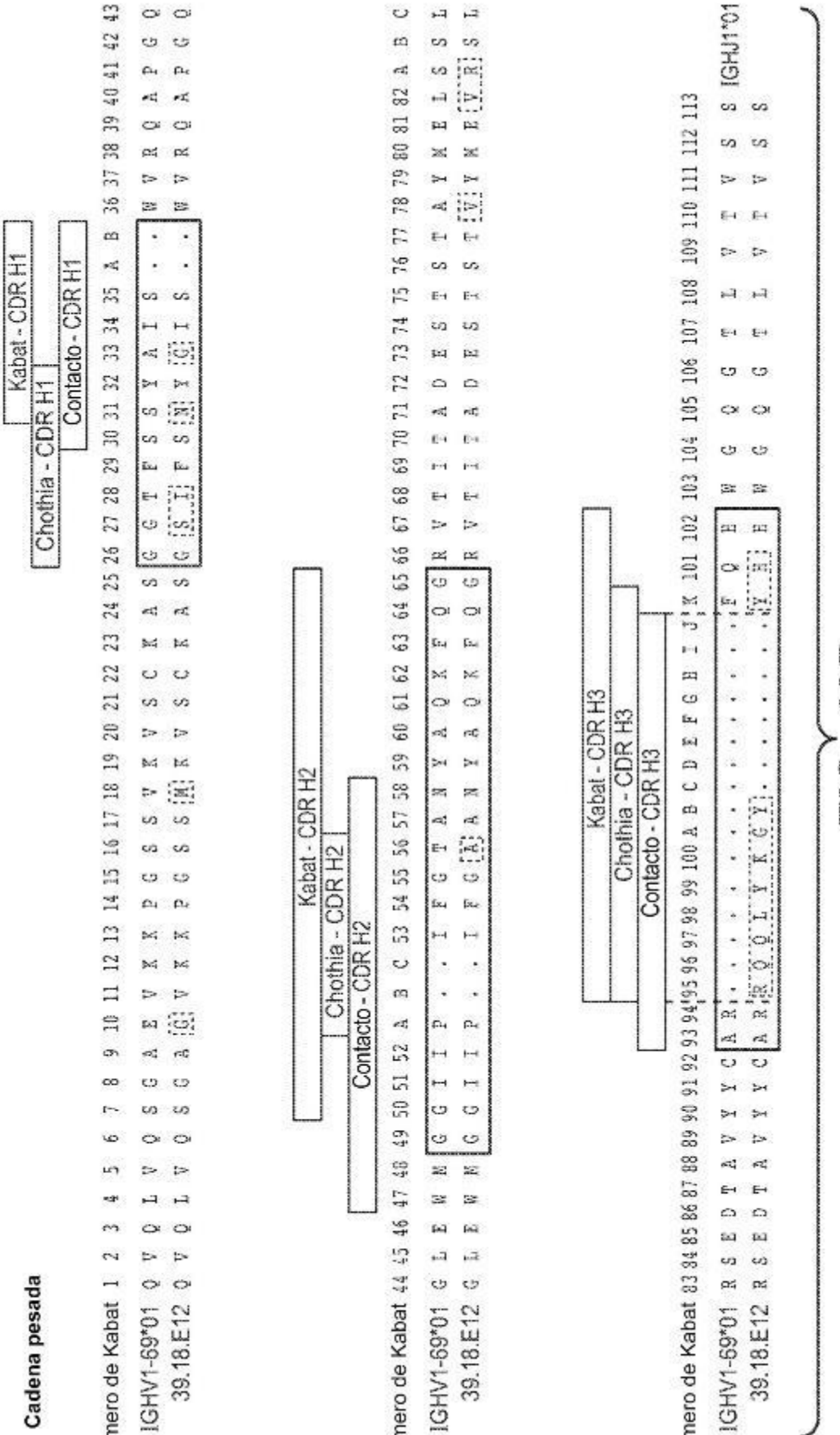
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV1-69*01
39.18.E12
IGHJ1*01

FIG. 40B

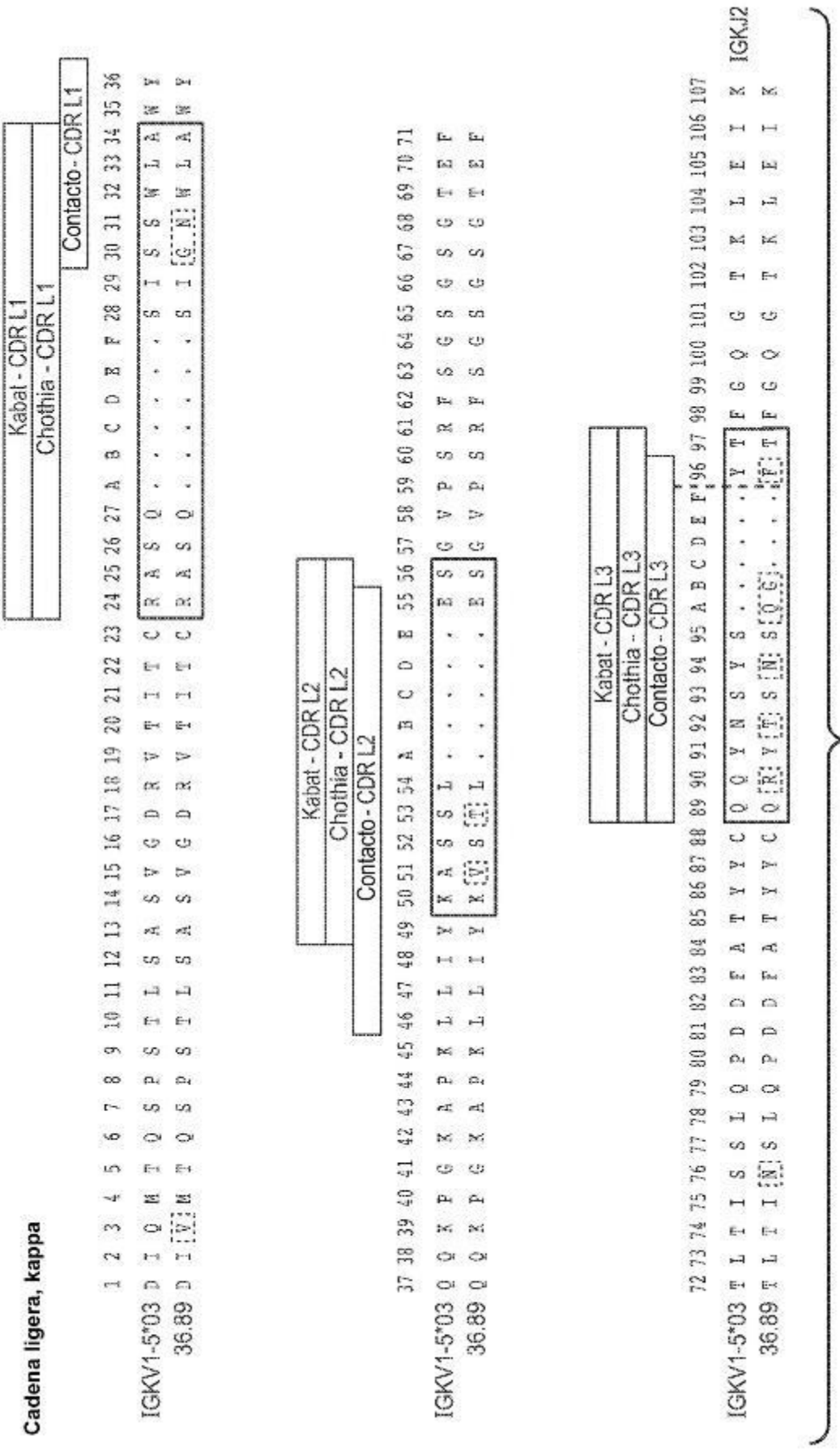
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKV1-5*03
36.89
IGKJ2

FIG. 41A

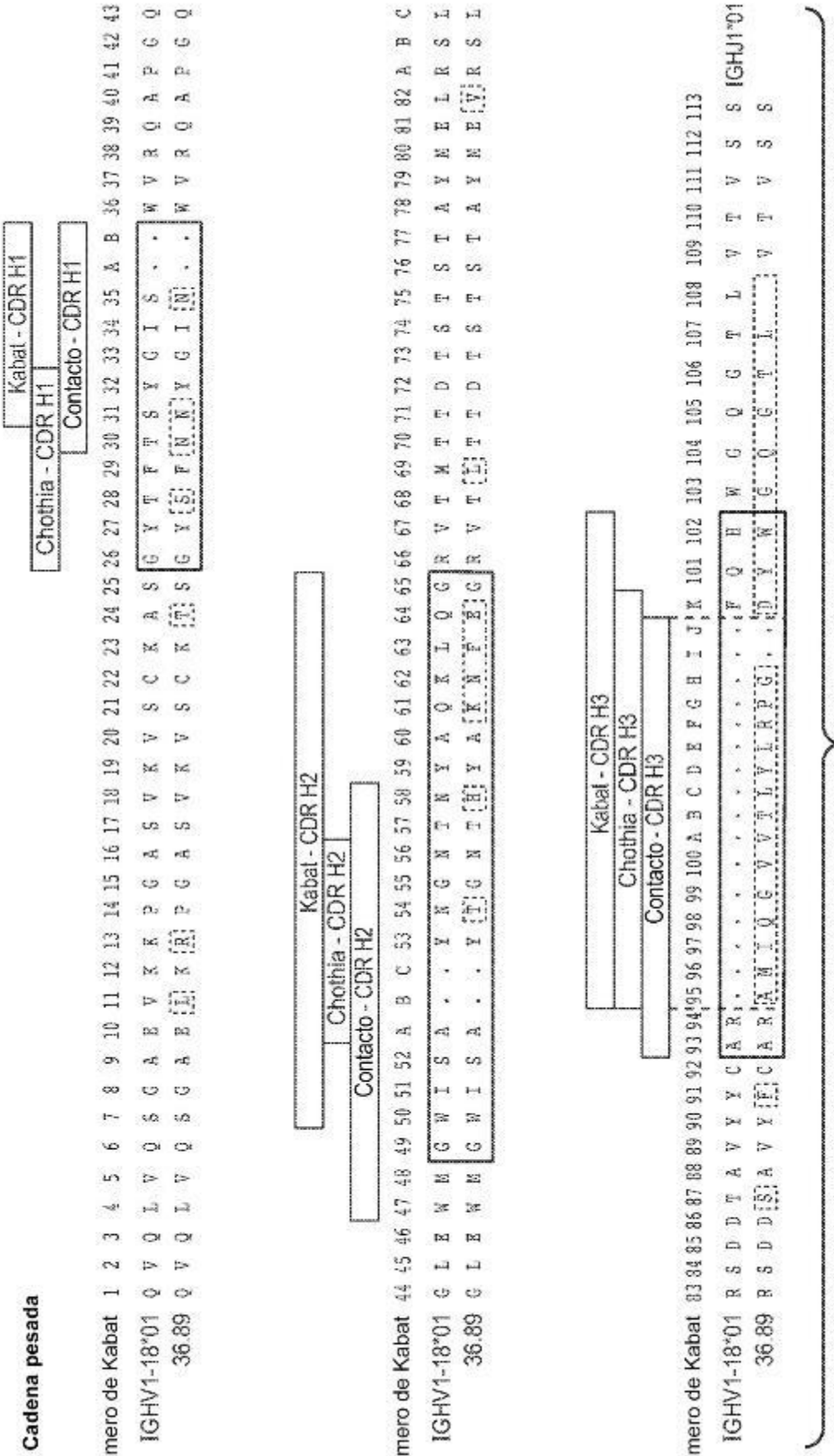
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV1-18*01
36.89
IGHJ1*01

FIG. 41B

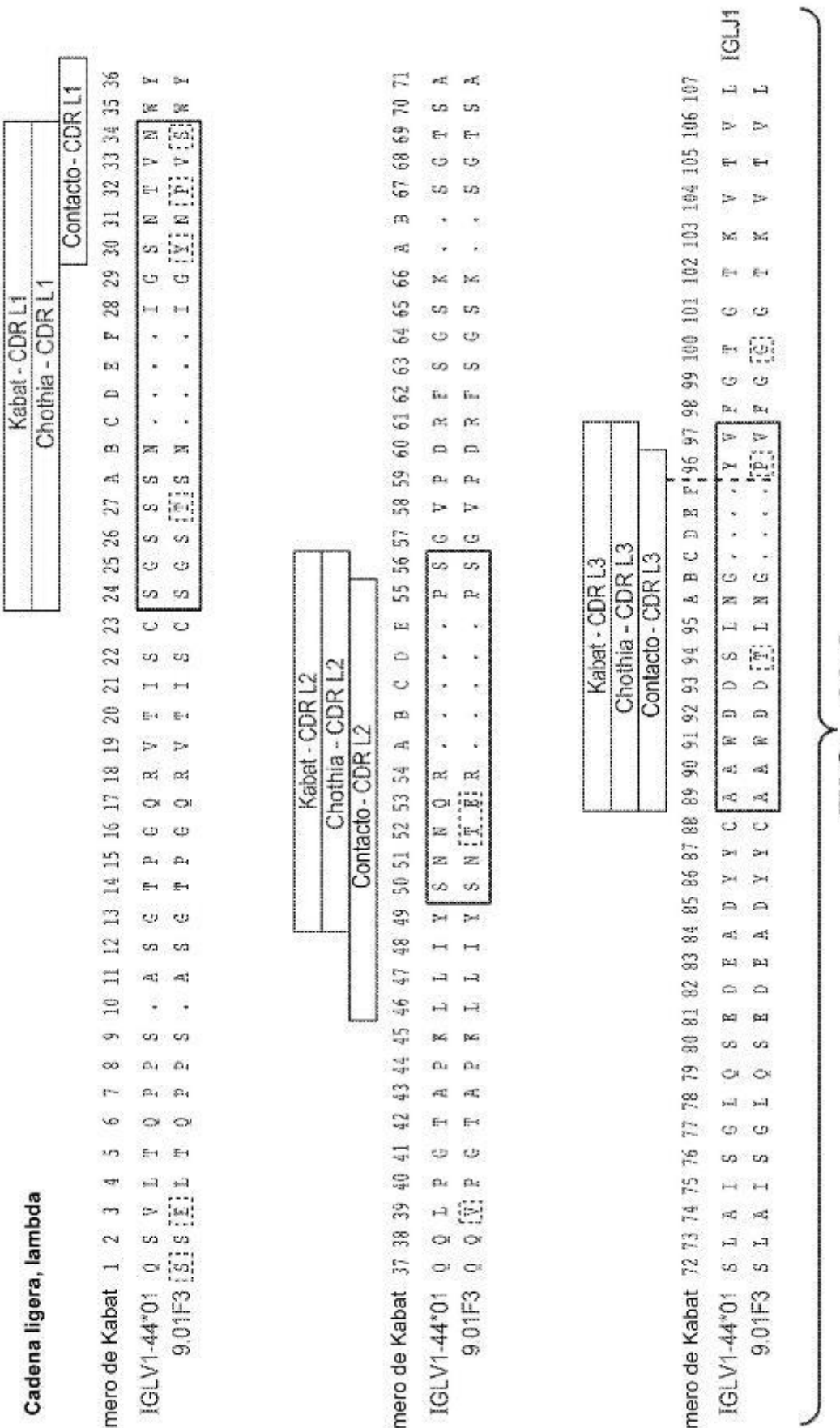
Cadena ligera, lambda
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
Número de Kabat
IGLV1-44*01
9.01F3
IGLJ1

FIG. 42A

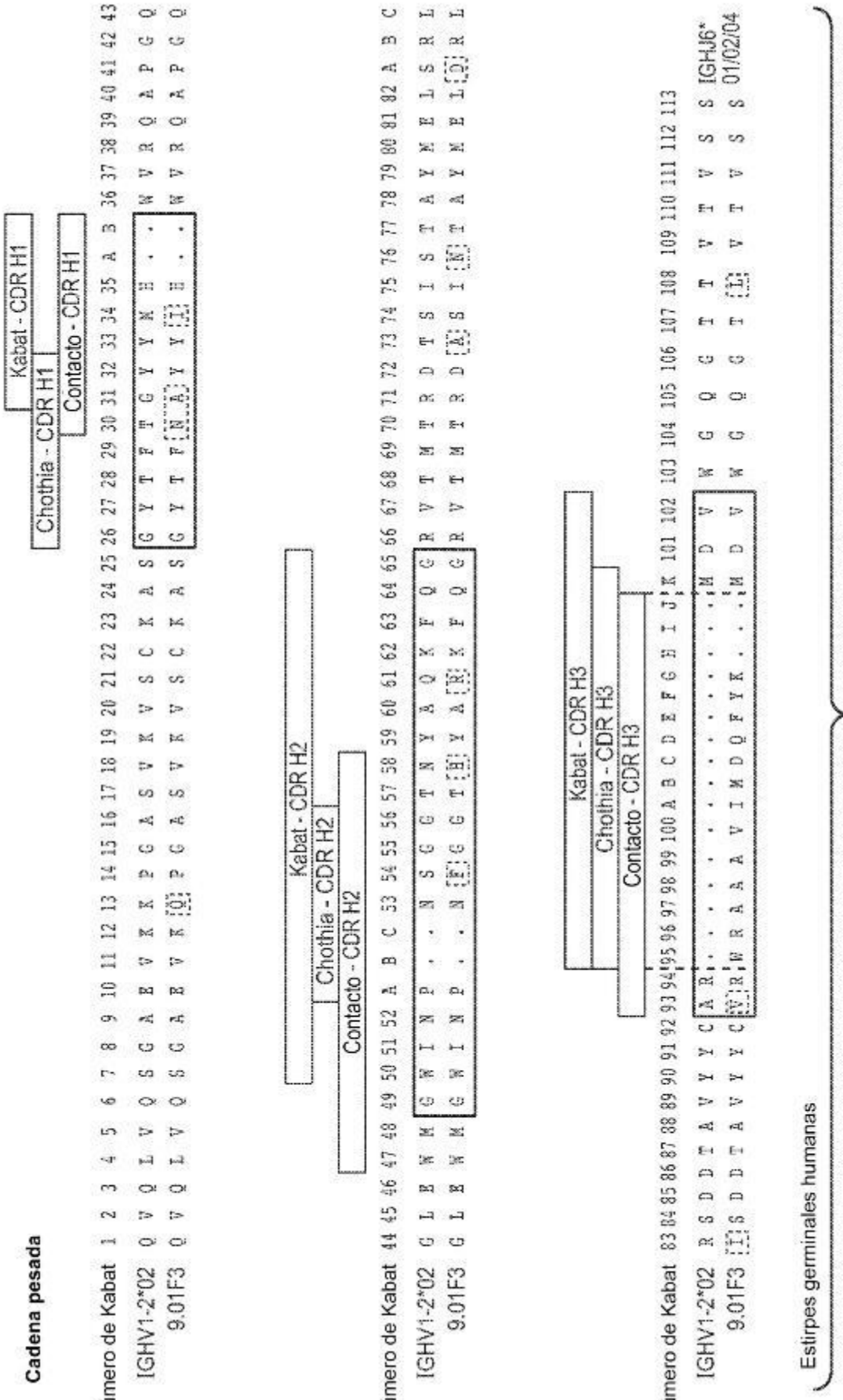
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat
IGHV1-2*02
9.01F3
IGHJ6*
01/02/04
Estirpes germinales humanas

FIG. 42B

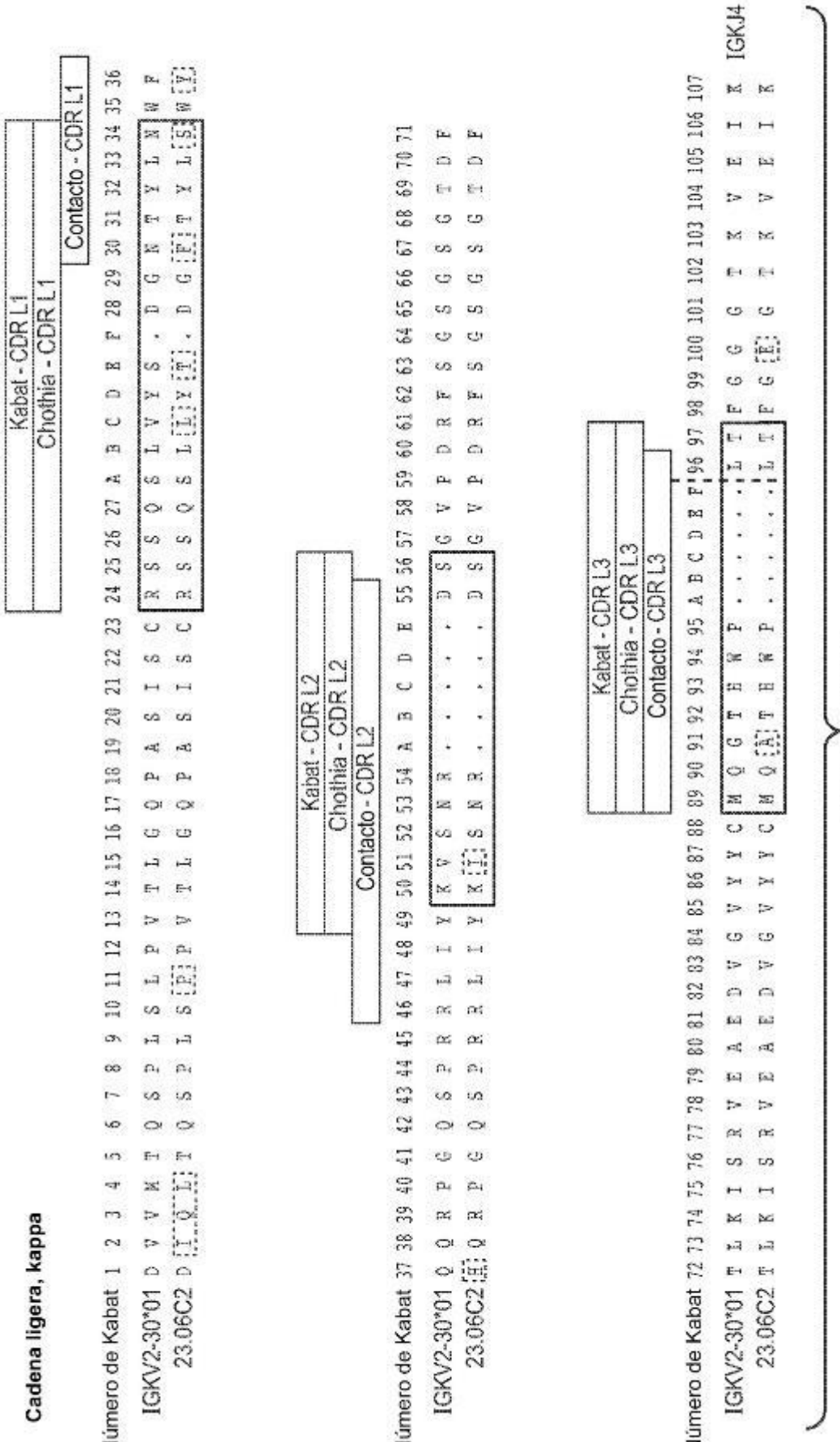
Cadena ligera, kappa
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
IGKJ4

FIG. 43A

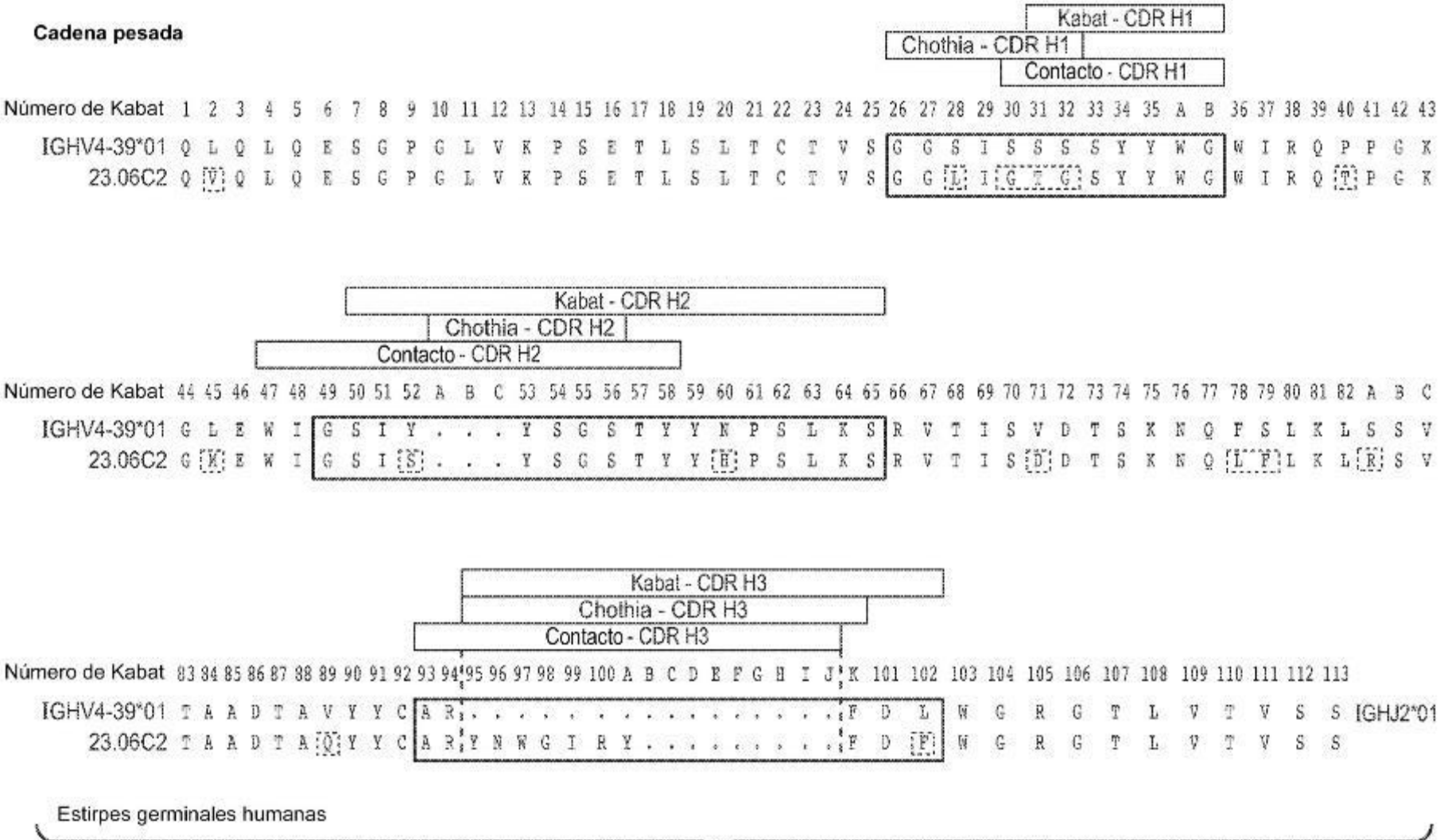
Cadena pesada
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Número de Kabat 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 A B 36 37 38 39 40 41 42 43
IGHV4-39*01 Q L Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S S S S Y Y W G W I R Q P P G K
23.06C2 Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G L I G K G S Y Y W G W I R Q T P G K
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Número de Kabat 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 A B C
IGHV4-39*01 G L E W I G S I Y . . . Y S G S T Y Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V
23.06C2 G K E W I G S I S . . . Y S G S T Y Y H P S L K S R V T I S D D T S K N Q L F L K L R S V
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
Número de Kabat 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H I J K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113
IGHV4-39*01 T A A D T A V Y Y C A R . . . . . F D L W G R G T L V T V S S IGHJ2*01
23.06C2 T A A D T A Q Y Y C A R Y N W G I R Y . . . . . F D F W G R G T L V T V S S
Estirpes germinales humanas

FIG. 43B