

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 711**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2011 PCT/CA2011/000817**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO12009790**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2011 E 11809104 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2596017**

54 Título: **Anticuerpo de protección cruzada contra la infección por el virus de la gripe**

30 Prioridad:

22.07.2010 US 366747 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.02.2020

73 Titular/es:

SCHRADER, JOHN W. (100.0%)
5305 Seaside Place
West Vancouver, British Columbia V7W 3E2, CA

72 Inventor/es:

SCHRADER, JOHN W.

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

Observaciones:

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

ES 2 739 711 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo de protección cruzada contra la infección por el virus de la gripe

Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas

5 Esta es una solicitud de tratado de cooperación en materia de patentes que reivindica el beneficio de 35 U.S.C. 119 en base a la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/366.747 presentada el 22 de julio de 2010.

Campo de la divulgación

10 La divulgación se refiere a composiciones inmunológicas novedosas y de protección cruzada y a vacunas para la protección contra patógenos, en particular, protección vírica tal como la protección contra el virus de la gripe. La divulgación también se refiere a procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria que proteja contra un amplio espectro de cepas y subtipos patógenos y procedimientos de vacunación contra los mismos.

Antecedentes de la invención

15 De la membrana de los virus de la gripe A sobresalen dos proteínas, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (N). Las hemaglutininas están sometidas a una variación extrema a través de mutación y selección por los anticuerpos del animal huésped. Las hemaglutininas de los virus de la gripe A que circulan entre diferentes animales pertenecen a una de las 16 familias evolutivamente relacionadas llamadas subtipos (llamados H1, H2...H16). Las hemaglutininas se dividen adicionalmente de acuerdo con la filogenia entre dos grupos relacionados, el Grupo 1 (H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 y H16) y el Grupo 2 (H3, H4, H7, H10, H14 y H15). La neuraminidasa también se divide en 9 familias. Los virus de la gripe A se clasifican por el subtipo de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (N) que presentan. Los virus de la gripe A que circulan actualmente entre los humanos (H1N1 y H3N2) son respectivamente 20 de los subtipos H1 y H3 de hemaglutinina y los subtipos N1 y N2 de neuraminidasa. La respuesta inmunitaria protectora contra los virus de la gripe estacional está dominada por anticuerpos neutralizantes específicos de aislados y específicos de subtipos que se unen fuertemente a la cabeza de la HA, bloqueando de este modo la función de las proteínas HA de unir el virus a los receptores de la célula huésped (Wiley et al. 1987). La "deriva antigénica" o "variaciones antigénicas menores", la selección de cepas de virus con mutaciones en la superficie de la cabeza de HA que disminuye la unión de anticuerpos neutralizantes de modo que no protejan contra la nueva cepa de virus mutada ("con deriva"), crea la necesidad regular de vacunas estacionales actualizadas contra la gripe. La cabeza de HA del novedoso virus de gripe A pandémica de 2009 (H1N1) de origen porcino (nH1N1) era 25 antigénicamente distinta ("desplazamiento antigénico" o "variaciones antigénicas mayores") de los virus de la gripe estacional H1N1 que habían estado circulando entre los humanos (Xu et al. 2010) y, por tanto, la mayoría los humanos carecían de anticuerpos protectores (Itoh et al. 2009).

30 La proteína hemaglutinina media en la infecciosidad del virus de la gripe, uniendo primero el virión a las células huésped y fusionando en segundo lugar la membrana del virus con la membrana de la célula huésped, lo que permite que el genoma vírico entre en las células (Wiley et al. 1987). La proteína hemaglutinina tiene una cabeza globular y un tallo: la cabeza de la hemaglutinina media en la unión del virus a las células huésped, mientras que el tallo de la hemaglutinina media en la fusión de la membrana del virus con la membrana de la célula huésped. Los anticuerpos contra la cabeza de la hemaglutinina que solo se unen a la hemaglutinina de una cepa o aislado del virus de la gripe (específicos de aislado/cepa) predominan en la respuesta inmunitaria humana habitual a la gripe 35 estacional. Si los anticuerpos contra la cabeza de la hemaglutinina tienen suficiente afinidad/avidez e inhiben estéricamente el sitio de unión al receptor, bloquean la infecciosidad de esa cepa/aislado de un subtipo de virus al inhibir la unión del virus a la célula huésped.

40 Los anticuerpos contra la cabeza de la hemaglutinina protegen contra la infección dos veces por la misma cepa del virus de la gripe, pero estos anticuerpos protectores son muy específicos de un determinado aislado/cepa de un subtipo de virus de la gripe y, por tanto, solo neutralizan y protegen contra aislados/cepas específicos de los virus de la gripe (Wiley et al. 1987). Dado que la replicación del genoma del virus de la gripe es muy propensa a errores, surgen fácilmente mutantes del virus. Los mutantes que escapan a la neutralización por los anticuerpos contra la cabeza de la hemaglutinina de la cepa original del virus tienden a seleccionarse para replicarse debido a que la nueva hemaglutinina mutante tiene una afinidad tan baja por los anticuerpos protectores contra el aislado/cepa original que los anticuerpos ya no pueden neutralizar el virus mutante. El virus mutante puede reinfectar a las 45 personas inmunes al virus de la gripe original, dando lugar a un nuevo aislado de la gripe estacional. Este proceso se denomina "deriva antigénica" o "variaciones antigénicas menores" y explica por qué se necesita recurrentemente una nueva vacuna contra la gripe estacional, constituida por las cepas mutantes más dominantes de las cepas circulantes del virus de la gripe para inducir anticuerpos neutralizantes contra el nuevo virus mutante. Muchas mutaciones en la cabeza de la hemaglutinina alrededor del sitio de unión al receptor que alteran la unión de los anticuerpos neutralizantes al aislado/cepa original del virus son bien toleradas por el virus porque no interfieren con la unión al receptor. 50

55 Existe otro cambio más drástico en la antigenicidad de la hemaglutinina denominado "desplazamiento antigénico" o "variaciones antigénicas mayores", que es característico de los virus que causan pandemias de gripe. Se estima que

la pandemia de gripe H1N1 española de 1918 mató a 50 millones de personas. Muchos subtipos de virus de la gripe circulan entre animales, principalmente aves acuáticas, y la infección de humanos por estos virus animales puede causar infecciones humanas graves, como la gripe aviar H5N1 altamente patógena que tiene una mortalidad de más del 50 % (Yen y Webster, 2009). El desplazamiento antigénico se puede producir cuando diferentes cepas de gripe, que circulan entre aves, cerdos y humanos, infectan el mismo huésped, lo que permite el reordenamiento de material genético, que está presente en 8 fragmentos de ARN. De forma alternativa, se puede producir cuando los virus que circulan entre otras especies distintas de los humanos, infectan a los humanos y se replican en humanos y se transmiten entre humanos. En el caso de la pandemia de gripe H1N1 "española" de 1918, el virus de la gripe pudo haber obtenido todos sus 8 segmentos genéticos de especies aviares (Yen y Webster, 2009). En el caso de la pandemia de gripe H2N2 de 1957 y de la pandemia de gripe H3N2 de 1963, hubo un reordenamiento entre las cepas de gripe humana y las cepas H2 o H3 de especies aviares (Yen y Webster, 2009). El virus H1N1 de gripe A pandémica de 2009 (pdmH1N1) se generó por reordenamiento entre dos virus de gripe porcina, cada uno con genes de virus de gripe aviar, porcina y humana (Ding et al. 2009; Garten et al. 2009). Por tanto, la HA de los virus de gripe pandémica H1N1 de 1918, H2N2 de 1957, H3N2 de 1968 y de 2009 se originaron finalmente a partir de la gripe aviar. La HA de pdmH1N1 está relacionada de manera distante con el virus de la gripe pandémica H1N1 de 1918 (Xu et al. 2010). El virus H1N1 de gripe A pandémica de 2009 (pdmH1N1) se generó por reordenamiento entre dos virus de gripe porcina, cada uno con genes de virus de gripe aviar, porcina y humana (Ding et al. 2009; Garten et al. 2009). La próxima pandemia puede tener contribuciones genéticas de la gripe aviar H5N1 altamente patógena (H5N1) (Yen y Webster, 2009). Además, si la gripe aviar H5N1 altamente patógena (H5N1) sufre cambios genéticos que la hacen fácilmente transmisible a humanos, se puede convertir en una pandemia.

Las diferencias entre las secuencias de aminoácidos del ectodominio de la hemaglutinina de los virus de gripe pandémica y los virus de gripe estacional circulantes actuales son sustanciales ("desplazamiento antigénico"). Por ejemplo, en la hemaglutinina de la gripe pandémica H1N1 de 2009, el 21 % de la secuencia de aminoácidos del ectodominio no era idéntica a la secuencia correspondiente en el virus H1N1 estacional y ~50 % en los epítomos clave en la cabeza de HA no eran idénticos (Xu et al. 2010). Además, las mutaciones en la hemaglutinina de los virus de la gripe H1N1 estacional humana (pero no en la HA del virus de la gripe H1N1 pandémica de 2009 que se derivó de un virus de la gripe H1N1 porcina) han introducido sitios de glicosilación en la cabeza, bloqueando el acceso de anticuerpos neutralizantes a la cabeza de hemaglutinina (Wei et al. 2010a). El virus H1N1 de 2009 se propagó tan rápidamente que se convirtió en una pandemia porque la población humana de ese momento, especialmente los jóvenes, no tenía anticuerpos protectores circulantes que la pudieran neutralizar (Itoh et al. 2009). Aunque pueden existir diferencias de aminoácidos de hasta un 20 % en las hemaglutininas dentro de los subtipos, pueden existir diferencias de un 30 a 70 % entre las secuencias de diferentes subtipos de hemaglutininas (Karlsson Hedestam et al. 2008). Por ejemplo, el ectodominio de la hemaglutinina de un aislado de gripe aviar H5N1 altamente patógena presenta ~36 % de aminoácidos no idénticos en la secuencia correspondiente del virus de la gripe estacional H1N1 o del virus de la gripe pandémica H1N1 de 2009.

En contraste con las mutaciones en la cabeza de la hemaglutinina, las mutaciones en la región del tallo de la hemaglutinina no son bien toleradas porque la mayoría de las mutaciones en el tallo alteran su función estructuralmente restringida de mediación en la fusión de la membrana vírica con la membrana de la célula huésped, que es esencial para la infecciosidad. Por tanto, diferentes aislados e incluso subtipos de virus de la gripe presentan escasa variación en las regiones del tallo de hemaglutinina que controlan la fusión (Sui et al. 2009). Los anticuerpos raros que se unen al tallo de la hemaglutinina pueden neutralizar la infecciosidad vírica de la gripe mediante la inhibición del cambio conformacional en el tallo y, por tanto, la fusión de la membrana vírica y la membrana de las células huésped (Throsby et al. 2008; Sui et al. 2009; Ekiert et al. 2009). Dado que el tallo se conserva en muchos subtipos del virus de la gripe, los anticuerpos "heterosubtípicos" que se dirigen a sitios conservados del tallo de hemaglutinina pueden neutralizar múltiples aislados y subtipos del virus de la gripe (Throsby et al. 2008; Sui et al. 2009; Ekiert et al. 2009).

Sin embargo, por motivos que no son entendidos por los expertos en la técnica, los anticuerpos contra el tallo de hemaglutinina que se pueden unir al tallo de hemaglutinina de muchos aislados/cepas y subtipos de virus de la gripe (anticuerpos "de protección cruzada o" heterosubtípicos) no son inducidos con alta frecuencia en infecciones por o vacunaciones normales contra la gripe estacional. Corti et al. (2010) informaron de que linfocitos B de memoria heterosubtípicos eran indetectables en humanos normales, pero que después de la vacunación contra la gripe estacional se podían detectar en algunos individuos, aunque la frecuencia después de la vacunación contra la gripe estacional era muy baja y variable. Generaron anticuerpos monoclonales a partir de estos linfocitos B de memoria heterosubtípicos raros y todos excepto uno se unieron al tallo de hemaglutinina. Sin embargo, la frecuencia de los linfocitos B de memoria heterosubtípicos después de la vacunación contra la gripe estacional fue de 26 a 200 veces menor que la de linfocitos B de memoria que producen anticuerpos específicos para la vacuna contra la gripe estacional. La pregunta de si estos linfocitos B de memoria heterosubtípicos dieron realmente lugar a plasmoblastos que secretaban anticuerpos en respuesta a la vacuna contra la gripe estacional no se abordó en Corti et al. (2010). Corti et al. (2010) informaron de que detectaron, usando un ensayo muy sensible, una pequeña cantidad de anticuerpo heterosubtípico en el suero que era insuficiente para neutralizar el virus de la gripe H5N1. Corti et al. (2010) reconocieron que la magnitud de la respuesta que vieron no era útil para la protección y terminaron su artículo con *"incluso en individuos con alta respuesta, los anticuerpos heterosubtípicos difícilmente alcanzan una concentración neutralizante eficaz en suero"*. Wrammert et al. (2011) informaron de que habían generado

anticuerpos monoclonales a partir de plasmoblastos sanguíneos recién generados poco después de la vacunación contra la gripe estacional y encontraron que ninguno de los anticuerpos monoclonales eran anticuerpos heterosubtípicos dirigidos al tallo de la hemaglutinina.

5 Los niveles extremadamente bajos de anticuerpos de protección cruzada que se unen con alta afinidad a la hemaglutinina de diferentes aislados/cepas y subtipos de virus (anticuerpos "con reacción cruzada" o "heterosubtípicos"), inducida por la infección por (Wiley et al. 1987) o vacunación contra (Corti et al. 2010) la gripe estacional, exponen por qué la infección por o la vacunación contra una determinada cepa del virus de la gripe estacional no protege contra otros aislados/cepas o subtipos del virus de la gripe. La falta de anticuerpos de protección cruzada y heterosubtípicos es sorprendente, dado que la mayoría de los humanos se han infectado o
10 vacunado múltiples veces contra diferentes aislados/subtipos, con al menos dos subtipos de gripe estacional (H1N1 y H3N2) y, en algunos individuos de mayor edad, también con el virus H2N2.

Se han generado anticuerpos genomanipulados artificialmente contra la región conservada del tallo de HA y han demostrado que neutralizan múltiples cepas y subtipos de gripe (Throsby et al. 2008; Sui et al. 2009). Se generaron mezclando aleatoriamente una colección de genes de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina humana expresados en bacteriófagos y seleccionando los fragmentos de anticuerpos resultantes que se unían a la hemaglutinina H5 de la gripe aviar (H5N1). Estos anticuerpos se unieron no solo a la hemaglutinina H5 sino también a las hemaglutininas de numerosos otros subtipos de gripe, con la notable excepción de las hemaglutininas H3 y H7 del Grupo 2. La mayoría de estos anticuerpos artificiales usaron un gen *IGHV1-69*, y dos estudios demostraron mediante cristalografía de rayos X que la CDR1 y la CDR2 codificadas por este gen de estirpe germinal hicieron los
20 contactos clave de estos anticuerpos con la región del tallo de la hemaglutinina H5 (Ekiert et al. 2009; Sui et al. 2009). La cadena ligera hizo mínimo o ningún contacto con la hemaglutinina. Este gen *IGHV1-69* es expresado por la mayoría de los humanos y, por lo tanto, la mayoría de los humanos producirían en grandes cantidades estos anticuerpos heterosubtípicos que usan *IGHV1-69*, dada la estimulación antigénica recurrente con infecciones por o vacunaciones contra gripe H1N1 estacional. Un grupo examinó al donante de la colección de genes de inmunoglobulina que proporcionó estos anticuerpos de reacción cruzada generados artificialmente, y encontró que el donante no tenía ningún anticuerpo de reacción cruzada circulante. Además, Sui et al. (2009) concluyeron que dichos anticuerpos no se encontraron entre un gran número de anticuerpos monoclonales contra la gripe clonados de donantes que habían sido vacunados contra la gripe estacional (Wrammert et al. 2008), y que algún mecanismo en el sistema inmunitario humano evitó estos anticuerpos de reacción cruzada contra el tallo de la hemaglutinina que se producen en humanos. Ha existido un considerable interés en diseñar vacunas basadas en estas observaciones (Chen et al. 2009). Corti et al. (2010) especularon que una nueva vacuna con un inmunógeno genomanipulado que exponga mejor la región del tallo de la HA para lograr una presentación óptima a los linfocitos B podría dar como resultado respuestas de anticuerpos heterosubtípicos y de protección cruzada. Estos intentos de producir una
35 vacuna de amplio espectro contra la gripe han implicado la construcción de versiones artificiales de la región del tallo de la hemaglutinina (Sagawa et al. 1996 y Steel et al. 2010) y se han basado en la tesis de que el tallo de la hemaglutinina estaba enmascarado por el voluminoso dominio de cabeza que, por tanto, era inmunodominante (Steel et al. 2010; Wang et al. 2010). Sin embargo, aunque existió cierta protección inducida por la inmunización con la HA "sin cabeza", estos investigadores no encontraron pruebas (Sagawa et al. 1996) o encontraron pruebas muy marginales (Steel et al. 2010) de que la protección se debió a anticuerpos neutralizantes heterosubtípicos que podrían ser transferidos por suero de ratones vacunados. Otro enfoque que se intentó recientemente fue alterar la presentación de la hemaglutinina mediante la vacunación con ADN seguida de un refuerzo de proteínas o vectores víricos (Wei et al. 2010b) que indujo anticuerpos contra el tallo de HA. Sin embargo, no se demostró mediante la transferencia de suero de animales vacunados que los anticuerpos proporcionaban protección. Estos experimentos solo se realizaron en animales no sometidos previamente a experimentación que no tenían experiencia previa de
45 vacunación contra la gripe o infección por gripe. Los autores reconocieron que podrían encontrar resultados diferentes con poblaciones humanas que previamente hubieran estado expuestas a la hemaglutinina de la gripe.

Karlsson Hedestam et al. (2008) y Kwong y Wilson (2009) establecieron un paralelismo entre el virus de la gripe y el VIH-1, con respecto a que ambos virus son extremadamente variables y ambos provocan anticuerpos neutralizantes específicos de aislados/cepas contra epítomos en bucles de péptidos, ya que ambos virus pueden mutar fácilmente y por tanto escapar de los anticuerpos neutralizantes inducidos por la cepa original. En ambas enfermedades se han generado anticuerpos monoclonales raros que pueden neutralizar una amplia gama de aislados y cepas de virus. Karlsson Hedestam et al. (2008) y Kwong y Wilson (2009) plantean el reto de inducir estos anticuerpos ampliamente neutralizantes mediante la vacunación y contemplan nuevos inmunógenos.

Los anticuerpos son proteínas que circulan por el torrente sanguíneo y tienen la capacidad de unirse a y neutralizar virus y toxinas y otros patógenos. Los anticuerpos vienen en miles de millones de configuraciones y, dada esta diversidad estructural, es probable que uno o más de los anticuerpos en un individuo se unan a cualquier sustancia extraña o virus. Las células de la sangre y el sistema inmunitario que producen anticuerpos se denominan "linfocitos B". Cada linfocito B produce solo uno de los miles de millones de diferentes tipos de anticuerpos y tiene muestras de ese anticuerpo en su superficie. Cuando las sustancias extrañas (denominadas "antígenos"), como el virus de la gripe, entran en el cuerpo, se unen a esos linfocitos B raros que producen un anticuerpo específico que se une a esa sustancia extraña y estimulan la multiplicación de esos linfocitos B. Los linfocitos B multiplicadores se someten a continuación a un proceso llamado "maduración de afinidad" en una estructura llamada centro germinal que se desarrolla en un ganglio linfático. En este proceso de maduración de afinidad, los genes que codifican los
60

anticuerpos en los linfocitos B acumulan mutaciones somáticas. En el centro germinal se seleccionan esos linfocitos B que producen un anticuerpo mutado que se une fuertemente al antígeno. Para someterse a este proceso de "maduración de afinidad", los linfocitos B necesitan la ayuda de una célula relacionada del sistema inmunitario llamada "linfocito T" y el proceso de selección de los linfocitos B que producen los anticuerpos de mayor afinidad está íntimamente relacionado con las interacciones mutuas entre linfocitos B y linfocitos T (Allen et al. 2007; Victora, et al. 2010; Schwickert et al. 2011). Esos linfocitos B que producen anticuerpos que se unen a la hemaglutinina de un virus de la gripe se pueden unir a la hemaglutinina o más probablemente al virión y, a continuación, internalizar la proteína o el virus (Russell et al. 1979). Los linfocitos B digieren la hemaglutinina o el virus y presentan pequeñas partes de las proteínas (péptidos) a los linfocitos T cooperadores. Los linfocitos B deben presentar el antígeno peptídico a los linfocitos T a fin de formar un conjugado fuerte que garantice que el linfocito T estimule al linfocito B para que prolifere y entre en el centro germinal (Schwickert et al. 2011) y, a continuación, prolifere y sobreviva en el centro germinal (Allen et al. 2007; Victora, et al. 2010).

El mecanismo de este proceso de "maduración de afinidad" implica dos etapas, primero la inducción de mutaciones en los genes de anticuerpos en linfocitos B y, en segundo lugar, la supervivencia de esos linfocitos B que producen un anticuerpo de unión más fuerte ("afinidad más alta"). La ventaja que tienen los linfocitos B que producen los anticuerpos de afinidad relativamente más alta con respecto a los linfocitos B que producen anticuerpos de menor afinidad es el resultado de que sean más capaces de presentar antígenos peptídicos a los linfocitos T cooperadores. Existe un número limitante de linfocitos T que tienen receptores específicos para la hemaglutinina o las proteínas en el virión de la gripe y forman conjugados preferentemente con los linfocitos B que producen anticuerpos de afinidad relativamente más alta. Estos linfocitos T específicos de antígeno se activan y permanecen en contacto con los linfocitos B mientras los inducen a proliferar y entrar en los centros germinales. Cuando los linfocitos B han entrado en el centro germinal, deben presentar antígenos peptídicos a los linfocitos T cooperadores para proliferar y sobrevivir. Recientemente se ha establecido mediante experimentos elegantes que la afinidad/avidez relativa del anticuerpo expresado por un linfocito B determina su capacidad relativa de competir con otros linfocitos B por la presentación de antígeno a los linfocitos T cooperadores (Victora et al. 2010; Schwickert et al. 2011). Por tanto, los linfocitos B con afinidad más alta por el antígeno monopolizarán la ayuda de los linfocitos T.

Los linfocitos B que producen los anticuerpos de mayor afinidad y que, por tanto, sobreviven al proceso de maduración de la afinidad, se convierten en dos tipos de células especializadas que abandonan el centro germinal y entran a la sangre, una especializada en secretar grandes cantidades de anticuerpos ("células secretoras de anticuerpos" o "células plasmáticas") y una especializada en circular por la sangre durante largos períodos de tiempo denominada "linfocito B de memoria". Si el linfocito B de memoria se vuelve a exponer a la misma sustancia extraña o antígeno que lo indujo, responde produciendo rápidamente anticuerpos específicos contra el antígeno, haciendo que el individuo sea "inmune" a ese antígeno.

Los linfocitos B de memoria pueden vivir durante décadas en el cuerpo. De hecho, los anticuerpos circulantes persistieron en los humanos de edad avanzada durante más de 90 años después de la pandemia de 1918. De forma similar, los anticuerpos monoclonales de alta afinidad neutralizantes se han clonado a partir de linfocitos B de memoria uniéndose a la cabeza de la hemaglutinina del virus de la gripe H1N1 pandémica de 1918 de humanos de edad avanzada, en personas que nacieron antes de la pandemia, lo que significa que los linfocitos B de memoria habían persistido durante más de 90 años (Yu et al. 2008). Esto ejemplifica la presión selectiva y de larga duración a la que se ven sometidos los virus de la gripe humana por parte de los anticuerpos neutralizantes de alta afinidad contra la cabeza de hemaglutinina. Además, indica que los linfocitos B de memoria contra la cabeza de hemaglutinina son un rasgo característico constante del sistema inmunitario humano y su presencia, especificidad y afinidad se deben tener en cuenta si se contempla llevar a cabo una vacunación contra la gripe. Si los linfocitos B de memoria se vuelven a exponer a su antígeno específico, pueden responder rápidamente de dos maneras. Si se unen fuertemente al antígeno (es decir, el anticuerpo que produce el linfocito B de memoria es de alta afinidad), se transforman en un plasmoblasto, una célula especializada en secretar grandes cantidades de su anticuerpo específico (Paus et al. 2006). Si se unen más débilmente a un antígeno, por ejemplo, una versión mutada del antígeno original como un mutante de escape de hemaglutinina de un virus de gripe "con deriva de antígeno", vuelven a entrar en el proceso de maduración de afinidad y se someten a una selección para unirse más fuertemente al nuevo antígeno (Paus et al. 2006). Los linfocitos B de memoria que producen anticuerpos que se unen de manera relativamente débil a la hemaglutinina de un virus de la gripe todavía se pueden unir a la hemaglutinina o al virión e ingerir la proteína o las proteínas víricas (Schwickert et al. 2011). Por tanto, los linfocitos B de memoria que producen anticuerpos que neutralizan un aislado original de la gripe estacional, pero que no neutralizan un aislado "con deriva" de la gripe estacional, todavía se pueden unir fácilmente a la hemaglutinina y presentar péptidos de la hemaglutinina o de un virión de gripe a los linfocitos T cooperadores. Existen muchos epítopos de linfocitos T compartidos entre diferentes aislados y subtipos de virus de la gripe (Doherty et al. 2008). Además, los epítopos de linfocitos T pueden provenir de todas las partes de la secuencia principal de la proteína, incluso de las partes internas de la proteína que no se muestran en la superficie. Además, si un linfocito B está produciendo un anticuerpo que se une a la hemaglutinina, ese linfocito B se puede unir a e internalizar un virión o un fragmento del mismo. Ese linfocito B se puede presentar a continuación a un linfocito T y obtener ayuda de muchos linfocitos T específicos para péptidos individuales de las proteínas internas conservadas del virión (Russell et al. 1979).

Schwarz et al. 2009 (Vaccine, 27(45):6284-6290) se refieren al uso de vacunas preandémicas y, en particular, a experimentos para evaluar diferentes pautas principales con la vacuna preandémica A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14). Corti et al. 2010 (J. Clin. Invest., 120(5):1663-1673) se refieren a experimentos que muestran la producción de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con HA H5 en individuos vacunados con la vacuna contra la gripe estacional que contienen subtipos de virus de gripe H1 y H3. Chen et al. 2009 (J. Infect. Dis., 199(1):49-58) se refieren a la generación de mAb de amplia protección cruzada contra el virus de la gripe H5N1 en ratones, tras la inmunización sucesiva de cepas antigénicamente distintas. Van Maurik et al. 2010 (Vaccine, 28(7):1778-1785) se refieren al hallazgo de que la inmunización parenteral de ratones con una vacuna trivalente contra la gripe estacional provocó anticuerpos reactivos contra el heterosubtipo H5 capaces de conferir protección parcial contra la infección por el virus de la gripe H5N1 debida a la cepa A/New Caledonia/20/99 del componente H1N1. Sabarth et al. 2010 (Vaccine, 28(3):650-656) se refieren al uso de un modelo de prueba en ratones para comparar la inmunogenicidad y la eficacia de vacunas contra el virus H5N1 completo, derivadas de células Vero e inactivadas en inmunización única y regímenes de estímulo primario homólogos u heterólogos. Ekiert et al. 2009 (Science, 324(5924):246-251) se refieren a la determinación de estructuras de cocrystal para el anticuerpo CR6261 Fab humano ampliamente neutralizante en complejos con HA de virus responsables de la gripe H181 pandémica de 1918 y de la gripe aviar H5N1. Le Roux-Roels et al. 2010 (Vaccine, 28(3):849-857) se refieren a un estudio que evalúa el papel de AS03(A) (un sistema adyuvante basado en emulsión de aceite en agua que contiene tocoferol) en la vacunación de estímulo primario usando H5N1 como un modelo de antígeno de gripe con variaciones antigénicas mayores. Ikeno et al. 2009 (Vaccine, 27(23):3121-3125) se refieren a un estudio que evalúa el efecto facilitador de una vacuna contra la gripe pandémica H5N1 en un modelo de ratón para la investigación de estrategias para la vacunación contra la gripe pandémica. Steel et al. 2010 (MBio., 1(1), pii: e00018-10) se refieren a anticuerpos que se unen al dominio de la cabeza globular de HA y, en particular, a la construcción de un inmunógeno que comprende el dominio de tallo de HA conservado de gripe y carente de la cabeza globular. El documento WO 2009/068992 A1 se refiere a una pauta de inmunización de estímulo primario en la que un sujeto recibe una dosis facilitadora de un primer clado del virus de la gripe A H5 y una dosis estimuladora de un segundo clado del virus de la gripe A H5, y una composición inmunogénica que comprende antígenos de hemaglutinina de más de un clado del virus de la gripe A H5. El documento WO 2010/036948 A2 se refiere a una combinación de una composición facilitadora y una composición estimuladora para facilitar y estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto en el que la composición facilitadora comprende un plásmido de ADN que codifica un virus de gripe HA o un dominio portador de epítipo del mismo, y la composición estimuladora comprende una vacuna contra la gripe, y los procedimientos de uso de la misma. El documento WO 2010/130636 A1 se refiere a moléculas de unión, tales como anticuerpos monoclonales humanos, que se unen al virus de la gripe que comprende HA del subtipo H3, tal como H3N2, y tienen una amplia actividad neutralizadora contra dichos virus de la gripe. El documento WO 2010/130636 A1 es una solicitud de patente que se publicó después de la fecha de prioridad de la presente solicitud pero tiene una fecha de presentación efectiva previa a esa fecha.

Sumario de la divulgación

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y se refiere a anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y a su uso en el tratamiento o prevención de una infección por el virus de la gripe. Los modos de realización de la presente invención se presentan en los párrafos numerados a continuación:

(1). Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende las secuencias CDR de la cadena ligera de SEQ ID NO:17, 18 y 19 y las secuencias CDR de la cadena pesada de SEQ ID NO:20, 21 y 22, o que comprende la región variable de cadena ligera como se muestra en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:23 y la región variable de cadena pesada como se muestra en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:24.

(2). El anticuerpo o fragmento de anticuerpo del párrafo 1 para su uso en el tratamiento o prevención de una infección por el virus de la gripe.

El autor de la presente invención ha proporcionado pruebas de que la inmunización en serie de humanos previamente expuestos a infecciones por gripe o vacunaciones contra la gripe con composiciones que comprenden moléculas de hemaglutinina antigénicamente distintas y únicas, que abarcan todo o parte del ectodominio, proporciona la dominancia de un subconjunto menor de linfocitos B que producen anticuerpos heterosubtípicos o de reacción cruzada que se unen a regiones de la HA que se conservan o comparten entre diferentes aislados/cepas y subtipos del virus de la gripe A. El hecho de que el sujeto que se va a vacunar no se haya expuesto previamente a la naturaleza antigénica única y distinta de estas dos (o más) hemaglutininas específicas es crítico, ya que evita la activación de linfocitos B de memoria dominantes inducida por vacunas contra o infecciones por gripes estacionales previas. El hecho de que exista una frecuencia muy baja de linfocitos B de memoria para la hemaglutinina única en la población que se va a vacunar (por ejemplo, indetectable o inferior a 1 por millón, o al menos inferior al 0,01 % de los linfocitos B de memoria que expresan IgG que circulan por la sangre haciendo que los anticuerpos reaccionen fuertemente al antígeno único) se puede determinar fácilmente usando los procedimientos de Wen et al. 1987 o Corti et al. 2010. Por tanto, la divulgación proporciona un medio para evitar la activación de los linfocitos B de memoria que, en una vacunación o una infección normales por gripe estacional, competirían por la ayuda de los linfocitos T con más éxito que un subconjunto menor de linfocitos B que producen anticuerpos de reacción cruzada y de protección cruzada que se unen a regiones conservadas de la HA. Dado que los linfocitos T reconocen los epítopos de linfocitos T compartidos entre los subtipos víricos (Doherty et al. 2008), el uso de hemaglutininas únicas o virus

inactivados o virus de gripe atenuados garantiza que exista una amplia ayuda de linfocitos T a los linfocitos B que producen anticuerpos heterosubtípicos y de protección cruzada, en contraste con el uso de inmunógenos de diseño que comprenden el tallo de hemaglutinina (Sagawa et al. 1996; Steel et al. 2010).

5 En consecuencia, en el presente documento se divulga un procedimiento para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto contra un patógeno que comprende:

(a) administrar un primer antígeno patógeno único al sujeto;

(b) administrar un segundo antígeno patógeno único 3 a 52 semanas después de a);

en el que el segundo antígeno patógeno único y el primer antígeno patógeno único son inmunológicamente distintos pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

10 En otra opción, la divulgación proporciona un uso de un segundo antígeno patógeno único para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a un primer antígeno patógeno único 3 a 52 semanas antes, en el que el segundo antígeno patógeno único y el primer antígeno patógeno único son inmunológicamente distintos pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

15 En el presente documento también se proporciona un segundo antígeno patógeno único para su uso en la inducción de una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a un primer antígeno patógeno único 3 a 52 semanas antes, en el que el segundo antígeno patógeno único y el primer antígeno patógeno único son inmunológicamente distintos pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

20 Además, en el presente documento se proporciona un segundo antígeno patógeno único para preparar una vacuna de refuerzo para vacunar a un sujeto que ha sido vacunado con una primovacuna que comprende un primer antígeno patógeno único 3 a 52 semanas antes, en el que el segundo antígeno patógeno único y el primer antígeno patógeno único son inmunológicamente distintos pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

25 En una opción, el antígeno patógeno es una proteína hemaglutinina (HA) de la gripe o un fragmento de la misma. También divulgado en el presente documento, el patógeno es una proteína gB del citomegalovirus humano (HCMV) o una proteína gp140 o gp160 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o un fragmento del mismo.

También divulgado en el presente documento, el procedimiento comprende además c) administrar un tercer antígeno patógeno único 3 a 52 semanas después de b), en el que el tercer antígeno patógeno único y el primer y segundo antígeno patógeno único son inmunológicamente distintos pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

30 En una opción, uno o más antígenos patógenos únicos adicionales se usan como una mezcla o simultáneamente con el primer y/o segundo antígeno patógeno único.

35 En el presente documento también se divulga un procedimiento para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto contra el virus de la gripe que comprende:

(a) administrar una primera proteína hemaglutinina (HA) única al sujeto; y

(b) administrar una segunda proteína HA única 3-52 semanas después de a), en el que la segunda proteína HA única y la primera proteína HA única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

40 En otra opción, la divulgación proporciona un uso de una segunda proteína HA única para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a una primera proteína HA única 3 a 52 semanas antes, en el que la segunda proteína HA única y la primera proteína HA única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos. La divulgación también proporciona una segunda proteína HA única para su uso en la inducción de una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a una primera proteína HA única 3 a 52 semanas antes, en el que la segunda proteína HA única y la primera proteína HA única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos. Aún en otro modo de realización, la divulgación proporciona un uso de una segunda proteína HA única para preparar una vacuna de refuerzo para vacunar a un sujeto que ha sido vacunado con una primovacuna que comprende una primera proteína HA única 3 a 52 semanas antes, en el que la segunda proteína HA única y la primera proteína HA única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

45
50

En una opción, la segunda proteína HA única comprende una cabeza que está sustancialmente no relacionada desde el punto de vista antigénico con la primera proteína HA única pero que comprende sitios antigénicos conservados en el tallo o en la cabeza que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

5 En una opción, la primera y/o la segunda proteína HA única son parte de un virus atenuado o un virus inactivado. En otra opción, la primera o la segunda proteína HA única son de un virus pandémico o un virus que normalmente infecta a una especie de huésped diferente. En una opción, el virus que infecta a un huésped diferente es un virus que infecta a una especie aviar o un virus que infecta a los cerdos. En aún otra opción, la primera y/o la segunda proteína HA única son una proteína HA artificial que tiene mutaciones en la cabeza que la hacen antigénicamente no relacionada con la HA a la que ha estado expuesta la población que se va a vacunar o una proteína HA química que comprende un tallo conservado acoplado a una cabeza única.

10 En una opción, el primer antígeno HA único se deriva de un aislado de un virus de gripe A H5N1 y el segundo antígeno HA único se deriva de otro virus de gripe aviar con una hemaglutinina del Grupo 1, tal como H1, H2, H5 (con la distinción de que debe ser una H5 de una antigenicidad sustancialmente diferente), H6, H8, H9, H11, H12, H13 o H16 opcionalmente de un subtipo de virus de la gripe A H2N9, H2N2, H6N1, H6N2, H8N4 y H9N2.

15 En el presente documento también se divulga un procedimiento para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto contra el virus de la gripe que comprende:

a) administrar una primera proteína hemaglutinina (HA) única que se deriva de un aislado de un virus de gripe A H5N1; y

20 b) administrar una segunda proteína HA única al sujeto 3 a 52 semanas después de a), en el que la segunda proteína HA única se deriva de otro virus de la gripe aviar con una hemaglutinina del Grupo 1, tal como H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 o H16 opcionalmente de un subtipo de virus de gripe A H2N9, H2N2, H6N1, H6N2, H8N4 y H9N2.

En aún otra opción, la primera proteína HA única se deriva de una cepa o un aislado del virus de la gripe A H5N1 y la segunda proteína HA única se deriva de otro virus de la gripe de mamíferos con una hemaglutinina del Grupo 1.

25 En el presente documento también se divulga un procedimiento para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto contra el virus de la gripe que comprende:

(a) administrar una primera proteína hemaglutinina (HA) única al sujeto, en el que la primera proteína HA única es de una cepa o un aislado del virus de la gripe A H5N1; y

30 (b) administrar una segunda proteína HA única al sujeto 3 a 52 semanas después de a), en el que la segunda proteína HA única es de otro virus de gripe de mamíferos con una hemaglutinina del Grupo 1. En una opción, el virus de la gripe con una hemaglutinina del Grupo 1 comprende un subtipo de virus de la gripe A que circula entre cerdos o caballos.

En otra opción, la primera proteína HA única se deriva de una cepa o un aislado del virus de la gripe A H1N1 de 2009 y la segunda proteína HA única se deriva de un aislado de un virus de gripe A H5N1. En el presente documento también se divulga un procedimiento para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto contra el virus de la gripe que comprende:

35 (a) administrar una primera proteína hemaglutinina (HA) única al sujeto, en el que la primera proteína HA única es de una cepa o un aislado del virus de la gripe A gripe A H1N1 de 2009; y

40 (b) administrar una segunda proteína HA única al sujeto 3-52 semanas después de a), en el que la segunda proteína HA única es de un aislado de un virus de gripe A H5N1.

En el presente documento también se divulga un procedimiento para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada contra la gripe en un sujeto que ha sido vacunado contra o infectado por un virus de gripe que contiene una primera hemaglutinina única (HA), que comprende administrar al sujeto una segunda proteína HA única 3 a 52 semanas después de la vacunación o infección, en el que la segunda HA única comprende una cabeza que está sustancialmente no relacionada desde el punto de vista antigénico con la primera HA única, pero que presenta sitios antigénicos conservados en el tallo o sitios conservados en la cabeza que normalmente no son inmunogénicos. Además se proporciona el uso de una segunda proteína HA única para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada contra la gripe en un sujeto que ha sido vacunado contra o infectado por un virus de gripe que contiene una primera hemaglutinina única 3 a 52 semanas antes, en el que la segunda HA única comprende una cabeza que está sustancialmente no relacionada desde el punto de vista antigénico con la primera HA única, pero que presenta sitios antigénicos conservados en el tallo o sitios conservados en la cabeza que normalmente no son inmunogénicos. Aún más, se proporciona una segunda proteína HA única para su uso en la inducción de una respuesta de anticuerpos de protección cruzada contra la gripe en un sujeto que ha sido vacunado contra o infectado por un virus de gripe que contiene una primera hemaglutinina única 3 a 52 semanas antes, en el que la segunda HA única comprende una cabeza que está sustancialmente no relacionada desde el punto de vista

antigénico con la primera HA única, pero que presenta sitios antigénicos conservados en el tallo o sitios conservados en la cabeza que normalmente no son inmunogénicos. Además, se proporciona el uso de una segunda proteína HA única en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada contra la gripe en un sujeto que ha sido vacunado contra o infectado por un virus de gripe que contiene una primera hemaglutinina única 3 a 52 semanas antes, en el que la segunda HA única comprende una cabeza que está sustancialmente no relacionada desde el punto de vista antigénico con la primera HA única, pero que presenta sitios antigénicos conservados en el tallo o sitios conservados en la cabeza que normalmente no son inmunogénicos.

En una opción, la primera proteína HA única se deriva del virus de la gripe A H1N1 de 2009 y la segunda proteína HA única se deriva de un aislado de un virus de gripe A H5N1. En el presente documento también se divulga un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria de protección cruzada en un sujeto contra la gripe que ha sido vacunado contra o infectado por el virus de la gripe A H1N1 de 2009 administrando al sujeto, 3 a 52 semanas después de la vacunación o infección, una hemaglutinina (HA) que se deriva de un aislado de un virus de gripe A H5N1.

En otra opción, la primera proteína hemaglutinina única es una proteína HA del Grupo 1 y la segunda hemaglutinina única es una proteína HA del Grupo 2 o la primera proteína hemaglutinina única es una proteína HA del Grupo 2 y la segunda hemaglutinina única es una proteína HA del Grupo 1.

En una opción, una o más proteínas HA únicas adicionales se usan como una mezcla o simultáneamente con la primera y/o la segunda proteína HA única.

Aún en otra opción, la primera y/o la segunda hemaglutinina única se acoplan, tal como por fusión, químicamente o físicamente, a un epítipo peptídico de linfocitos T contra el cual se ha inmunizado previamente al sujeto. Dichos epítopos peptídicos de linfocitos T son bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, el epítipo del toxoide tetánico.

En el presente documento también se proporciona un kit que comprende una primera proteína hemaglutinina (HA) única como se divulga en el presente documento y una segunda proteína hemaglutinina (HA) única como se divulga en el presente documento, en el que la primera proteína HA única y la segunda proteína HA única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

También divulgado en el presente documento, la presente divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto contra un citomegalovirus humano (HCMV) que comprende:

(a) administrar una glicoproteína gB o un fragmento de la misma que comprende el ectodominio gB al sujeto; y

(b) administrar una glicoproteína gB modificada 3 a 52 semanas después de a);

en el que la glicoproteína gB modificada carece del epítipo AD-1.

En otra opción divulgada en el presente documento, la divulgación proporciona un uso de una glicoproteína gB modificada para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a inmunización con una glicoproteína gB o su ectodominio 3 a 52 semanas antes, en el que la glicoproteína gB modificada carece del epítipo AD-1.

La divulgación también proporciona una glicoproteína gB modificada para su uso en la inducción de una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a una primera inmunización con glicoproteína gB o su ectodominio 3 a 52 semanas antes, en el que la glicoproteína gB modificada carece del epítipo AD-1.

También divulgado en el presente documento, la divulgación proporciona un uso de una glicoproteína gB modificada para preparar una vacuna de refuerzo para vacunar a un sujeto que se ha vacunado con una primovacuna que comprende una glicoproteína gB o su ectodominio 3 a 52 semanas antes, en el que la glicoproteína gB modificada carece del epítipo AD-1.

Aún en otra opción divulgada en el presente documento, la presente divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes de protección cruzada en un sujeto contra el VIH-1 que comprende:

(a) administrar una primera glicoproteína gp140 o gp160 única al sujeto; y

(b) administrar una segunda proteína gp140 o gp160 única 3 a 52 semanas después de a);

en el que la segunda glicoproteína gp140 o gp160 única y la primera glicoproteína gp140 o gp160 única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

También divulgado en el presente documento, la divulgación proporciona un uso de una segunda glucoproteína gp140 o gp160 única para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a inmunización con una primera glicoproteína gp140 o gp160 única 3 a 52 semanas antes; en el que la segunda glicoproteína gp140 o gp160 única y la primera glicoproteína gp140 o gp160 única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

La divulgación también proporciona la segunda glucoproteína gp140 o gp160 única para su uso en la inducción de una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a inmunización con una primera glicoproteína gp140 o gp160 única 3 a 52 semanas antes; en el que la segunda glicoproteína gp140 o gp160 única y la primera glicoproteína gp140 o gp160 única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

También divulgado en el presente documento, la divulgación proporciona un uso de una segunda glicoproteína gp140 o gp160 única para preparar una vacuna de refuerzo para la vacunación de un sujeto que se ha vacunado con una primovacuna que comprende una primera glicoproteína gp140 o gp160 única 3 a 52 semanas antes, en el que la segunda glicoproteína gp140 o gp160 única y la primera glicoproteína gp140 o gp160 única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

Además, en el presente documento se proporciona un ensayo para detectar anticuerpos de protección cruzada en suero o plasma contra un virus de la gripe que comprende:

(a) incubar células con el virus de la gripe y someter a prueba la muestra de suero durante 1 a 5 días; en el que las células expresan una proteasa que escinde la hemaglutinina de la gripe; y

(b) detectar la infecciosidad vírica en comparación con un control sin muestra;

en el que una disminución de la infecciosidad vírica a los 1-5 días indica la presencia de anticuerpos de protección cruzada.

En una opción, las células son de una línea celular de mamífero derivada del pulmón, las vías respiratorias o las células epiteliales del intestino.

En el presente documento también se proporcionan novedosas regiones determinantes de complementariedad aisladas, regiones variables de cadena ligera, regiones variables de cadena pesada y anticuerpos y fragmentos de los mismos y procedimientos y usos de los mismos para la protección cruzada contra la infección por el virus de la gripe o para tratar la infección por el virus de la gripe.

Otras características y ventajas de la presente divulgación se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, se debe entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos que indican las opciones preferentes de la divulgación se ofrecen solo a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la divulgación se harán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La divulgación se describirá ahora en relación con los dibujos en los que:

La Figura 1 muestra el análisis Biacore de un anticuerpo monoclonal (mAb) humano que se une al ectodominio recombinante de la HA del virus de la gripe pandémica H1N1 de 2009 (HA snH1). La FC anti-Ig humana se acopló covalentemente a un Biacore Sensor Chip CM5 a través de grupos amina primaria. Los mAb purificados 14-128 (A) y I4-1G8 (B) se diluyeron en HBS-P (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, surfactante P-20 al 0,01 %) a 5 µg/ml y 750-800 RU de cada uno capturado El ectodominio recombinante purificado del HA de nH1N1 (HA snH1) se diluyó en HBSP a 10 µg/ml y posteriormente se inyectó. La respuesta del sensograma (RU) muestra la interacción de la HA nH1 recombinante con los anticuerpos capturados. La HA snH1 se inyectó simultáneamente sobre una superficie de referencia que contenía FC anti-IgG humana y se restó el valor de referencia para dar el sensograma resultante.

La Figura 2 muestra diversos anticuerpos anti-HA heterosubtípicos/de reacción cruzada que se inducen por infección por o vacunación contra nH1N1 y reaccionan con vacunas convencionales en la cabeza o el tallo de HA y con HA del virus de la gripe aviar H5N1 altamente patogénico. **A**, Reactividad con vacuna contra nH1N1 o gripe estacional y con un ectodominio recombinante purificado de HA H5 (A/Vietnam/1203/2004, clado 1). Valoraciones ELISA de mAb seleccionados en placas recubiertas con la vacuna contra nH1N1 o la vacuna contra la gripe estacional de 2009/2010 o con HA H5 recombinante purificada (A/Vietnam/1203/2004, clado 1). **B**, Uso del gen *IGHV* en los 48 mAb anti-HA snH1. Los intervalos de confianza del 95 % del uso de *IGHV1-69* fueron del 38-66 %. * 8 de 9 mAb que usan *IGHV4-39* fueron de un solo sujeto, V2. **C**, Algunos anticuerpos de reacción cruzada/heterosubtípicos se unen al tallo de HA y otros a la cabeza de HA. Panel anterior: ELISA de competencia de mAb seleccionados en la vacuna contra nH1N1 que muestra la inhibición de la unión de C179, que reconoce un epítipo en el tallo de HA. Círculos:

15-24 (abiertos); 14-128 (reellenos). Triángulos: 18-1B6 (verticales, abiertos), 15-52 (invertidos, reellenos). Cuadrados: V4-17 (reellenos); mAb de control, KE5 contra HCMV (abiertos). Panel inferior: el tratamiento de las placas ELISA recubiertas con nH1N1 a pH 5 durante 1 h antes de la incubación de mAb provoca la inhibición de la unión por mAb codificados por *IGHV1-69*. **D**, Los mAb V3-2G6, 15-24, V3-1G10 e 18-1B6 que usan el gen *IGHV1-69* no inhiben la hemaglutinación con nH1N1, pero el mAb V2-36 que usa el gen *IGHV4-39* sí lo hace y el mAb V4-12 también. Los mAb indicados (40 µg/ml) se valoraron y un valor de cero significa que la hemaglutinación no se inhibió a un título de < 2 o 20 µg/ml. **E, F** Reactividad cruzada de mAb seleccionados con la HA de gripe A/Hong Kong/156/197 (H5N1). Se usó inmunofluorescencia indirecta para evaluar la unión de mAb a HA H5 expresada por infección por adenovirus en la línea celular epitelial humana A549 usando un instrumento Cellomics. **E**, Muestra la imagen del instrumento de las células teñidas con anticuerpos secundarios solos o con 5 µg/ml de mAb 14-128. **F**, Muestra el porcentaje de células teñidas con concentraciones variables de los mAb o títulos de plasma indicados de un sujeto vacunado contra nH1N1 (V2) o un sujeto infectado por nH1N1 (114). Se muestra el promedio de mediciones duplicadas de un experimento representativo de tres.

La Figura 3 muestra la neutralización de múltiples subtipos de virus de gripe A por mAb. **A**, Neutralización de nH1N1 por los mAb purificados indicados que estuvieron presentes durante todo el ensayo. Las valoraciones comenzaron a una concentración de 5 µg/ml de cada mAb. * indica título > 256. **B**, Neutralización de la infecciosidad del virus de gripe aviar A/Goose/Ger/R1400/07 (H5N1) altamente patogénico por los mAb indicados y por valoraciones de plasma de sujetos infectados por (114) o vacunados contra (V2) nH1N1. También se muestra a continuación una gráfica de la neutralización de las valoraciones de mAb seleccionados contra el virus de gripe aviar A/Goose/Ger/R1400/07 (H5N1) altamente patogénico y una fotografía de las placas con y sin un mAb contra el tallo de HA 18-1B6 (1 µg/ml). **C**, mAb contra el tallo de HA codificados por *IGHV1-69* inhiben la fusión mediada por HA H5. Tener en cuenta la disminución de la formación de sincitios en los pocillos tratados con el mAb contra el tallo de HA, C179 y el mAb que usa *IGHV1-69*, en comparación con el control sin anticuerpo añadido (sin Ab) y un mAb que se une a la cabeza de HA, V2 -36, donde hay muchos sincitios.

La Figura 4 muestra que los anticuerpos monoclonales codificados por *IGHV1-69* no neutralizan la formación de placa por los virus de la gripe A/Ck/Ger/R28/03 (H7N7) a 4 µg/ml.

La Figura 5 muestra pruebas de que algunos de los mAb de reacción cruzada/heterosubtípicos se originaron a partir de linfocitos B de memoria que fueron activados por nH1N1. **A**, Números de mutaciones somáticas en los genes *IGHV* de mAb generados a partir de plasmoblastos y linfocitos B de memoria. La prueba del orden de Mann-Whitney del número de mutaciones somáticas en los genes *IGHV* de mAb generados a partir de linfocitos B de memoria (N = 22) versus plasmoblastos (N = 22) demuestra una diferencia significativa (P = 0,001). Los márgenes muestran el percentil 5/95. **B**, Títulos preexistentes de anticuerpos que se unen a células que expresan la HA de gripe A/Hong Kong/156/197 (H5N1), cuantificados como en la Fig. 1D y 1E, incremento en el plasma de un sujeto 7 días después de la vacunación contra nH1N1.

La Figura 6 muestra los resultados del tratamiento de ratones CD-1 infectados por vía intranasal con una dosis letal (2×10^5 unidades formadoras de placa) del virus de la gripe A H1N1 novedoso (nH1N1) de 2009 con las dosis indicadas del anticuerpo monoclonal humano V2-36 expresado como IgG1. A los ratones se les inyectó una vez por vía intraperitoneal el mAb 24 horas después de la infección por vía intranasal con el virus pandémico nH1N1. A los ratones de control se les inyectó diluyente solo (solución salina tamponada con fosfato, PBS). Los ratones se pesaron diariamente.

La Figura 7 muestra los resultados del tratamiento de grupos de 5 ratones CD-1 infectados por vía intranasal con una dosis letal (2×10^5 unidades formadoras de placa) del virus de la gripe A H1N1 novedoso de 2009 con los anticuerpos monoclonales humanos indicados expresados como moléculas de IgG1. Con la excepción de V2-36 (etiquetado en la Figura 7 como BC002-36, posteriormente denominado V2-36 ya que se generó a partir de un sujeto vacunado con la vacuna contra H1N1 pandémico), que se administró como una dosis de 200 µg por vía intraperitoneal 48 horas después de la infección, todos los mAb se administraron a una dosis de 300 µg por vía intraperitoneal 24 horas después de la infección. Los mAb marcados en la Figura 7 como BC003-2G6 y BC003-1G10 se denominaron posteriormente V3-2G6 y V3-1G10, ya que se generaron a partir de un sujeto vacunado con la vacuna contra H1N1 pandémico, y los mAb 8-1B6, 4-128 y 5-24 se denominaron posteriormente 18-1B6, 14-128 y 15-24, ya que todos se generaron a partir de sujetos infectados con el virus de la gripe pandémica H1N1. La mezcla de 100 µg de V2-36 y 150 µg de 15-24 se administró 24 horas después de la infección. A los controles se les inyectó solo el vehículo (PBS). Los resultados se muestran por grupo tratado de 5 como tasa de supervivencia o en términos de peso promedio. Se muestra el resultado de un experimento, dividido en dos paneles para mayor claridad.

La Figura 8 muestra la eficacia terapéutica de un anticuerpo heterosubtípico monoclonal humano generado a partir de un humano vacunado con la vacuna contra H1N1 pandémico en una infección letal de ratones BALB/c con virus de gripe A H5N1 heterólogo. **A**. Grupos de 5 ratones se infectaron por vía intranasal con 2×10^5 UFP de virus de gripe A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) en el esqueleto del virus PR8/34, y se trataron después de 24 horas con 150 o 300 µg de V3-2G6 o después de 48 horas con 300 µg o 600 µg de V3-2G6. Los controles se trataron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se monitorizaron la supervivencia y la pérdida de peso. **B**. Reducción adicional de la dosis terapéutica de V3-2G6 para permitir que los ratones sobrevivan a una infección letal por H5N1. **A**. Grupos de 5 ratones se infectaron por vía intranasal con 3×10^5 UFP de virus de gripe A/Hong Kong/213/2003

(H5N1) en el esqueleto del virus PR8/34, y se trataron después de 24 horas con 150 µg, 75 µg o 37,5 µg de V3-2G6. Tener en cuenta que todos los ratones tratados sobrevivieron, pero hubo una pérdida de peso prolongada en el grupo tratado con la menor dosis.

5 La Figura 9 muestra la protección cruzada contra la infección letal heteróloga en ratones por el virus de la gripe H5N1 conferida por un anticuerpo monoclonal heterosubtípico generado a partir de un humano vacunado con la vacuna contra nH1N1 pandémico. Veinticuatro horas antes de la infección intranasal con 2×10^5 UFP de virus de gripe A/Hong Kong/213/2003 (H5N1), a 3 grupos de 5 ratones BALB/c se les inyectó intraperitonealmente PBS como control, o 15 µg o 5 µg de V3-2G6 generado a partir de un sujeto vacunado con la vacuna contra pdmH1N1. Los datos muestran las tasas de supervivencia y el peso promedio a más de 14 días.

10 La Figura 10 muestra la protección cruzada contra la infección letal heteróloga en ratones por el virus de la gripe H5N1 conferida por el plasma de un humano recolectado dos semanas y un año después de la vacunación con la vacuna contra nH1N1 pandémico. Veinticuatro horas antes de la infección intranasal con 2×10^5 UFP del virus de gripe A/Hong Kong/213/2003 (H5N1), se trataron grupos de ratones BALB/c con una inyección intraperitoneal de 400 µl de PBS como control o plasma recogido del sujeto V3 14 días después de la vacunación contra pdmH1N1 o 1 año después de la vacunación contra pdmH1N1 y como control se usó plasma de un individuo joven recogido antes de 2009 y, por tanto, no vacunado contra y no infectado por el virus de la gripe pandémica H1N1. Otro grupo de ratones se pretrató 72, 48 y 24 horas antes de la infección con 400 µl de plasma de V3 recogido 1 año después de la vacunación con la vacuna contra H1N1 pandémico.

Descripción detallada de la divulgación

PROCEDIMIENTOS Y USOS PARA PROTEGER CONTRA LA INFECCIÓN DEL PATÓGENO

El autor de la presente invención ha demostrado que se puede inducir una respuesta de anticuerpos protectores contra un sitio funcional conservado y deseado en un patógeno o antígeno patógeno, en la que ese sitio normalmente no es inmunogénico o es mínimamente inmunogénico debido a la competencia en la respuesta inmunitaria por la ayuda de linfocitos T con linfocitos B que producen anticuerpos contra otros sitios en el antígeno patógeno. Por ejemplo, la respuesta de anticuerpos protectores humanos contra la gripe es normalmente muy aislada/específica de la cepa porque la respuesta inmunitaria humana normalmente no produce una respuesta de anticuerpos protectores vigorosa contra los sitios del virus que se conservan entre las cepas. El autor de la presente invención ha demostrado que esto se debe a que, en la respuesta de los anticuerpos, muchos linfocitos B de memoria específicos para otros sitios en el antígeno compiten por la ayuda de los linfocitos T. Los procedimientos divulgados en el presente documento evitan la reestimulación de los linfocitos B de memoria para que produzcan anticuerpos contra partes del inmunógeno fácilmente inmunogénicas y, por tanto, evitan la competencia entre linfocitos B que normalmente impide el desarrollo de una respuesta de anticuerpos al sitio conservado, proporcionando protección cruzada contra diferentes cepas y subtipos de virus de gripe.

En contraste con el enfoque inmunitario que practica en animales no sometidos previamente a experimentación con inmunizaciones secuenciales con cuatro hemaglutininas del mismo subtipo H3, en el que se demostró que un pequeño porcentaje de 120 anticuerpos monoclonales protegen contra múltiples virus H3N2 que circulan entre humanos (Wang et al. 2010), la presente divulgación proporciona procedimientos y usos diseñados para provocar niveles protectores de anticuerpos heterosubtípicos de protección cruzada en individuos que ya tienen inmunidad frente a un virus de la gripe. Los presentes procedimientos/usos de secuencias de hemaglutininas únicas evitan la estimulación de linfocitos B de memoria contra sitios que el virus puede variar fácilmente y permiten que anticuerpos heterosubtípicos alcancen niveles protectores.

Con el propósito de vacunar a un ser humano o animal no sometido a tratamiento previo contra un patógeno variable para inducir anticuerpos ampliamente protectores, después de la primera inmunización (que será por definición con un antígeno único, ya que el animal no se ha sometido previamente a experimentación), la segunda y subsiguientes inmunizaciones deben ser todas con otros antígenos únicos distintos, de modo que el sujeto que se va a vacunar tenga niveles indetectables o muy bajos de linfocitos B de memoria que producen anticuerpos que se unen firmemente a estos antígenos únicos adicionales.

En particular, la presente divulgación se basa en la presente demostración de que los anticuerpos que se unen a un sitio particular de un antígeno, por ejemplo un epítipo en una proteína, pueden ser difíciles de generar debido a la competencia con el número relativamente mayor de linfocitos B de memoria que producen anticuerpos específicos para otros sitios del antígeno. Esto se debe a que los linfocitos B que producen los anticuerpos contra el sitio deseado del antígeno son menos numerosos que el número total de linfocitos B que producen anticuerpos contra otros sitios del antígeno. Estos linfocitos B más numerosos específicos para otros epítipos del antígeno serán más competitivos que los linfocitos B específicos para el epítipo deseado por los recursos en el ganglio linfático y el centro germinal, en particular los linfocitos T cooperadores específicos para epítipos transportados por el antígeno o proteínas asociadas con él (Allen et al. 2007; Vitoria et al. 2010; Schwickert et al. 2011). Por ejemplo, en humanos, debido a la repetida exposición a la gripe estacional, existe un gran número y frecuencia de linfocitos B que producen anticuerpos contra la cabeza de la molécula de hemaglutinina de la gripe estacional (Corti et al., 2010 y Wrarmert et al. 2008, 2011.) que superan competitivamente a los menos numerosos linfocitos B que producen

anticuerpos contra el tallo de la hemaglutinina que, a diferencia de la mayoría de los dirigidos contra la cabeza, reaccionan de forma cruzada con y neutralizan muchas cepas de gripe. Las afinidades extremadamente bajas son suficientes para activar los linfocitos B de memoria y prepararlos para entrar en el centro germinal (Schwickert et al. 2011). En una infección por o vacunación contra un virus de gripe estacional que ha sufrido "deriva antigénica" existirá muchos linfocitos B de memoria inducidos por la cabeza de HA del virus original que aún tendrían baja afinidad y serían activados por la HA del virus "con deriva". Esto significa que los linfocitos B de memoria contra la cabeza de HA original entrarían en los centros germinales y se someterían a otra ronda de maduración de afinidad y adquirirían mutaciones somáticas que aumentarían la afinidad por la HA "con deriva" estimuladora. Esos linfocitos B de memoria activados por las interacciones de baja afinidad con la HA con deriva serían competitivamente superiores por la ayuda de los linfocitos T que los linfocitos B de memoria poco comunes contra el tallo de HA. En contraste con la baja afinidad requerida por los linfocitos B para adquirir antígeno y presentar antígeno a los linfocitos T, la afinidad/avidez de los anticuerpos contra la cabeza de HA necesaria para bloquear la unión vírica a la célula huésped y, por tanto, neutralizar la infecciosidad es relativamente alta (Knossow et al. 2002). Esto significa que, aunque los virus con o las vacunas contra HA con deriva aún pueden activar los linfocitos B de memoria y entrar en los centros germinales (Wrammert et al. 2008), no son neutralizados por los anticuerpos inducidos por el virus original.

Además, los linfocitos B de memoria tienen ventajas con respecto a los linfocitos B indiferenciados al competir por la ayuda de los linfocitos T. Por tanto, los linfocitos B de memoria se activan más fácilmente por el antígeno, ya que realizan la señalización más eficazmente que los linfocitos B indiferenciados. También expresan más proteínas que coestimulan los linfocitos T que los linfocitos B indiferenciados y también tienen diferentes patrones de migración. Por estas razones, los linfocitos B de memoria, incluso aquellos que reaccionan de forma cruzada débilmente con un antígeno en un patógeno que ha mutado para evitar la neutralización por los anticuerpos existentes, aún pueden tener una ventaja competitiva con respecto a los linfocitos B indiferenciados que producen un anticuerpo específico para la mutación.

En consecuencia, en el presente documento se divulga un procedimiento para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto contra un patógeno que comprende:

(a) administrar un primer antígeno patógeno único al sujeto; y

(b) administrar un segundo antígeno patógeno único 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, después de a), en el que el segundo antígeno patógeno único y el primer antígeno patógeno único son inmunológicamente distintos pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

En otra opción, la divulgación proporciona un uso de un segundo antígeno patógeno único para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a un primer antígeno patógeno único 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, antes, en el que el segundo antígeno patógeno único y el primer antígeno patógeno único son inmunológicamente distintos pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

En el presente documento también se proporciona un segundo antígeno patógeno único para su uso en la inducción de una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a un primer antígeno patógeno único 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, antes, en el que el segundo antígeno patógeno único y el primer antígeno patógeno único son inmunológicamente distintos pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

Además, en el presente documento se proporciona un segundo antígeno patógeno único para preparar una vacuna de refuerzo para vacunar a un sujeto que ha sido vacunado con una primovacuna que comprende un primer antígeno patógeno único 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, antes, en el que el segundo antígeno patógeno único y el primer antígeno patógeno único son inmunológicamente distintos pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

El término "patógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo que causa una enfermedad, incluyendo, sin limitación, un virus, bacteria, hongo o parásito.

En una opción, el antígeno patógeno es una proteína hemaglutinina (HA) del virus de la gripe o un fragmento de la misma. En otra opción divulgada en el presente documento, el antígeno patógeno es una proteína de HCMV, por ejemplo, la glicoproteína gB, o un fragmento de la misma. También divulgado en el presente documento, el antígeno patógeno es una proteína del VIH, por ejemplo, el ectodominio gp140 de la glicoproteína gp160. Los procedimientos y usos relacionados con estos antígenos patógenos se describen adicionalmente en el presente documento.

En otra opción, donde existe inmunidad contra los sitios conservados del patógeno, la administración de (a) el primer antígeno único es innecesaria y solo se usa una administración única, como en (b). En una opción se proporciona un uso de un antígeno patógeno único para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que tiene inmunidad existente contra los sitios conservados del patógeno. También se proporciona un antígeno patógeno único para su uso en la inducción de una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que tiene inmunidad existente contra los sitios conservados del patógeno. Además, se proporciona un uso de un

antígeno patógeno único en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que tiene inmunidad existente contra los sitios conservados del patógeno.

También divulgado en el presente documento, el procedimiento comprende además: (c) administrar un tercer antígeno patógeno único 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, después de b), en el que el tercer antígeno patógeno único y el primer y el segundo antígeno patógeno único son inmunológicamente distintos pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos. En el presente documento también se proporciona un uso de un tercer antígeno patógeno único para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a un segundo antígeno patógeno único 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, antes y se ha sometido previamente a un primer patógeno único 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, antes que al segundo antígeno patógeno único, en el que el tercer antígeno patógeno único y el primer y el segundo antígeno patógeno único son inmunológicamente distintos pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos. Además, se proporciona un tercer antígeno patógeno único para su uso en la inducción de una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a un segundo antígeno patógeno único 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, antes y se ha sometido previamente a un primer patógeno único 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, antes que al segundo antígeno patógeno único, en el que el tercer antígeno patógeno único y el primer y el segundo antígeno patógeno único son inmunológicamente distintos pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos. Además, en el presente documento se proporciona un uso de un tercer antígeno patógeno único para preparar una vacuna de refuerzo para vacunar a un sujeto que ha sido vacunado con una primovacuna que comprende un segundo antígeno patógeno único 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, antes y se ha sometido previamente a un primer patógeno único 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, antes que al segundo antígeno patógeno único, en el que el tercer antígeno patógeno único y el primer y el segundo antígeno patógeno único son inmunológicamente distintos pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

La frase "en la que el primer y el segundo antígeno patógeno único son inmunológicamente distintos pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos", como se usa en el presente documento, significa que el primer antígeno patógeno único provoca anticuerpos que en general no se unen fuertemente al segundo antígeno patógeno único a excepción de los sitios conservados que se comparten entre los antígenos que normalmente no son inmunogénicos o son mínimamente inmunogénicos debido a la competencia por la ayuda de los linfocitos T con los más numerosos linfocitos B estimulados por los sitios que normalmente son inmunogénicos. De manera similar, si se usa un tercer antígeno patógeno único, es inmunológicamente distinto del primer y el segundo antígeno patógeno único, pero comparte sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

El término "antígeno patógeno único" o "proteína única", como se usa en el presente documento, se refiere a un antígeno patógeno o fragmento del mismo que es único o desconocido para el sujeto que se desea vacunar, de modo que no existan o existan pocos linfocitos B de memoria activados por contacto con el "antígeno patógeno único" y no existan o existan niveles bajos de anticuerpos que circulan por el sujeto que se unan al antígeno patógeno único. En el "antígeno patógeno único", los epítomos que típicamente provocan una fuerte respuesta de anticuerpos en el sujeto son diferentes, por ejemplo, debido a la mutación o delección de aminoácidos o a diferente glicosilación, de los epítomos de antígenos patógenos relacionados encontrados previamente por el sujeto, ya sea por infección natural o por vacunación. Sin embargo, el "antígeno patógeno único" comparte epítomos comunes de linfocitos B que son la diana de los anticuerpos protectores en el sujeto, pero que normalmente no son inmunogénicos debido a la competencia por la ayuda de los linfocitos T con los más numerosos linfocitos B estimulados por partes inmunógenas del patógeno antígeno. La baja frecuencia de linfocitos B de memoria en la población que se va a vacunar inducidos por la hemaglutinina única que produce anticuerpos que se unen fuertemente al supuesto antígeno único se puede determinar fácilmente usando los procedimientos de Wen et al. 1987 o Corti et al. 2010. En la población que se va a vacunar, la frecuencia de linfocitos B de memoria que producen anticuerpos que reaccionan fuertemente al antígeno único es indetectable o inferior a 1 por millón, o al menos inferior al 0,01 % de los linfocitos B de memoria que expresan IgG que circulan por la sangre, como se verifica usando los procedimientos de Wen et al. 1987 o Corti et al. 2010.

El término "antígeno patógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a un patógeno o componente del mismo que provoca una respuesta inmunitaria en el sujeto e incluye, sin limitación, proteínas o azúcares o lípidos o fragmentos de los mismos o combinaciones de los mismos, expresados por el patógeno.

La frase "sitios que normalmente no son inmunogénicos", como se usa en el presente documento, se refiere a sitios que no provocan una fuerte respuesta de anticuerpos debido a la competencia por la ayuda de linfocitos T con los más numerosos linfocitos B que son activadas por otros sitios del patógeno o antígeno patógeno e incluye sitios que son mínimamente inmunogénicos en sujetos que han estado expuestos repetidamente a cepas del patógeno y representan menos del 5 % de la respuesta de anticuerpos contra ese antígeno patógeno.

El término "induce una respuesta de anticuerpos de protección cruzada", como se usa en el presente documento, significa que la administración de una dosis eficaz del primer antígeno patógeno único, seguida por el segundo antígeno patógeno único como se describe en el presente documento, da como resultado la producción de

anticuerpos que inhiben o reducen la gravedad de la infección por múltiples cepas o subtipos de patógenos diferentes, por ejemplo, evitando la activación de una población inmunodominante de linfocitos B de memoria que producen anticuerpos contra otro sitio del patógeno que no protegen de forma cruzada.

5 Para minimizar la competencia con los linfocitos B de memoria activados por sitios inmunogénicos del primer antígeno patógeno que todavía persisten en los ganglios linfáticos desde la primera administración en el momento de la segunda administración, el segundo antígeno patógeno se administra o usa opcionalmente en un sitio diferente.

10 La administración en un sitio diferente también es útil para estimular respuestas de anticuerpos de reacción cruzada y de protección cruzada a varias cepas de un patógeno y, al mismo tiempo, para incrementar los niveles de anticuerpos específicos de cepa para una cepa particular de un patógeno. Por ejemplo, en las personas de edad avanzada, la respuesta a la vacuna contra la gripe estacional está disminuida. En este caso, los procedimientos actuales son útiles para incrementar los niveles de anticuerpos de protección cruzada, heterosubtípicos y de reacción cruzada contra la gripe mediante la explotación de los linfocitos B de memoria heterosubtípicos de reacción cruzada acumulados por años de contacto con la gripe. Sin embargo, también puede ser ventajoso estimular al mismo tiempo la respuesta de anticuerpos específicos de cepa para una cepa o subtipo particular de un virus de la gripe, por ejemplo, el virus de la gripe H3N2 actualmente en circulación. En este caso, el antígeno patógeno particular que inducirá anticuerpos específicos de cepa se debe administrar en un sitio diferente del antígeno específico, desconocido o único diseñado para inducir anticuerpos de protección cruzada, por ejemplo, la primera administración en un hombro y la segunda administración en el hombro opuesto

20 En consecuencia, en otra opción, la administración en b) es en un sitio anatómico diferente de la administración en a).

25 La administración de un antígeno patógeno incluye, sin limitación, la administración de un fragmento del antígeno patógeno, o la administración del antígeno patógeno como un componente de un virus, opcionalmente inactivado por procedimientos conocidos por los expertos en el estado de la técnica, tales como una vacuna "fraccionada" más o menos un adyuvante adecuado conocido por los expertos en el estado de la técnica, o un virus que comprende el antígeno patógeno único que se ha atenuado mediante procedimientos conocidos por los expertos en el estado de la técnica o una partícula de tipo vírico que comprende el antígeno patógeno único generado por procedimientos conocidos por los expertos en el estado de la técnica o un vector de ADN o ARN que codifica el antígeno patógeno único usando procedimientos conocidos por los expertos en el estado de la técnica.

30 Aún en otra opción, uno o más antígenos patógenos únicos adicionales se usan como una mezcla o simultáneamente con el primer y/o segundo antígeno patógeno único. Por ejemplo, el primer antígeno patógeno único se podría mezclar con un antígeno patógeno único adicional o el primer antígeno patógeno único se podría administrar en un sitio anatómico y el antígeno patógeno único adicional se podría administrar en un segundo sitio anatómico simultáneamente (es decir, al mismo tiempo o muy próximos, por ejemplo, dentro de las 24 horas siguientes). El segundo antígeno patógeno único se administraría a continuación 3 a 52 semanas después de la primera administración y también se podría mezclar con uno o más antígenos patógenos únicos adicionales o administrar simultáneamente con uno o más antígenos patógenos únicos adicionales.

Virus de la gripe

40 El autor de la presente invención ha demostrado que la respuesta inmunitaria a la proteína HA en humanos infectados por o vacunados contra nH1N1, a diferencia de la respuesta a la gripe estacional, estaba dominada por anticuerpos que reaccionaban de forma cruzada con la HA de otras cepas o subtipos de virus de la gripe ("de reacción cruzada" o "heterosubtípico"), incluyendo la gripe aviar H5N1 altamente patógena y podría neutralizar su infecciosidad. Además, los anticuerpos que se unían exclusivamente a la HA de nH1N1 eran raros y solo uno de los 48 mAb que se unían a la HA de nH1N1 no reaccionaba con la vacuna contra la gripe estacional (Tabla 1).

45 Aproximadamente la mitad (52 %) de los anticuerpos de reacción cruzada o heterosubtípicos usaron el gen *IGHV1-69* (Figura 2), que codifica los rasgos característicos principales de un sitio de unión para una región en el tallo de HA que se conserva en muchos subtipos de virus de gripe (Ekiert et al. 2009; Sui et al. 2009). Además, hubo un 6 % más de anticuerpos heterosubtípicos contra el tallo de HA que no usaron *IGHV1-69*. El gran número de mutaciones somáticas en muchos de estos anticuerpos (Tabla 1, Figura 5) indicó que su origen estaba en los linfocitos B de memoria, presumiblemente inducidas por la gripe estacional. Mientras que la mayoría de los anticuerpos de reacción cruzada o heterosubtípicos generados contra la HA única del virus nH1N1 estaban unidos al tallo de HA, la mayoría de los anticuerpos de un individuo vacunado en particular (V2) se dirigieron contra la cabeza del HA como lo muestra el hecho de que inhibieron la hemaglutinación (por ejemplo, V2-36, Figura 2). La ausencia de linfocitos B de memoria que puedan ser activados por la cabeza de HA antigénicamente única de nH1N1 permitió que los linfocitos B de memoria relativamente raros contra sitios conservados de la HA de nH1N1 compitieran eficazmente por la ayuda de los linfocitos T contra los linfocitos B indiferenciados y dominaran la respuesta. La demostración de que la gripe nH1N1 induce la producción de anticuerpos de protección cruzada establece la viabilidad de las estrategias de vacunación para la protección de amplio espectro contra la gripe.

En consecuencia, en el presente documento se divulga un procedimiento para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto contra la gripe que comprende:

(a) administrar una primera proteína hemaglutinina (HA) única al sujeto; y

5 (b) administrar una segunda proteína HA única 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, después de a), en el que la primera y la segunda proteína HA única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

10 En otra opción, la divulgación proporciona un uso de una segunda proteína HA única para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a una primera proteína HA única 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, antes, en el que la primera y la segunda proteína HA única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos. La divulgación también proporciona una segunda proteína HA única para su uso en la inducción de una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a una primera proteína HA única 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, antes, en el que la primera y la segunda proteína HA única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos. Aún en otra opción, la divulgación proporciona el uso de una segunda proteína HA única para preparar una vacuna de refuerzo para vacunar a un sujeto que ha sido vacunado con una primovacuna que comprende una primera proteína HA única 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, antes, en el que la primera y la segunda proteína HA única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

20 El término "proteína hemaglutinina" o "proteína HA", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que se encuentra en la superficie de los virus de la gripe que ayuda a los virus a unirse a los receptores. Una proteína hemaglutinina tiene una región de la cabeza y una región del tallo. El término "proteína hemaglutinina" también se refiere a fragmentos o componentes de la proteína HA que son capaces de provocar la respuesta de anticuerpo deseada, tal como el ectodominio de HA, e incluye, sin limitación, componentes tanto de proteína como de azúcar que pueden provocar o modificar una respuesta de anticuerpos.

30 El término "proteína HA única", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína HA que es desconocida o es exclusiva para el sujeto al que se desea vacunar o en el que se desea inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada, de modo que no existan o existan pocos linfocitos B de memoria activados por contacto con la "proteína HA única" y no existen o existen niveles bajos de anticuerpos circulando por el sujeto que se unen a la proteína HA única. En la "proteína HA única", los epítomos que típicamente provocan una fuerte respuesta de anticuerpos en el sujeto son diferentes, por ejemplo, debido a la mutación o delección de aminoácidos o a diferente glicosilación, de los epítomos de proteínas HA relacionadas encontradas previamente por el sujeto, ya sea por infección natural o por vacunación. Sin embargo, la "proteína HA única" comparte epítomos comunes de linfocitos B que son la diana de los anticuerpos protectores, pero que normalmente no son inmunogénicos debido a la competencia por la ayuda de los linfocitos T con los más numerosos linfocitos B estimulados por partes inmunogénicas de la proteína HA.

40 Las hemaglutininas únicas incluyen, sin limitación, las hemaglutininas de las cepas del virus de la gripe que normalmente no infectan a la especie del sujeto, por ejemplo, la del virus de la gripe aviar H5N1 para sujetos humanos o, por ejemplo, en humanos, hemaglutininas que son antigénicamente diferentes y tienen poca reactividad con los anticuerpos contra las cepas de los virus de la gripe estacional H1N1 y H3N2 que han estado circulando por los humanos. Un ejemplo de una HA única en la mayoría de la población humana es la HA de la cepa H1N1 de la gripe pandémica de 2009, ya que muchos humanos no tenían anticuerpos circulantes que pudieran unirse a ella y neutralizar su infecciosidad (Itoh et al. 2009) y, por tanto, carecían de linfocitos B de memoria que pudieran ser activados por la cabeza de hemaglutinina o producir anticuerpos de baja afinidad por la cabeza de la hemaglutinina del nH1N1, de modo que no podían competir contra los linfocitos B de memoria raros que producen anticuerpos de protección cruzada contra un sitio conservado en el tallo de hemaglutinina.

50 La literatura publicada indica que los anticuerpos de reactividad cruzada contra la región del tallo de HA H5 no reaccionan de forma cruzada con las hemaglutininas H3 o H7 (Sui et al. 2009). Sin embargo, existen pruebas de que se pueden inducir anticuerpos en ratones, que reaccionan de forma cruzada con una variedad de virus de gripe H3 (Wang et al. 2010). Por lo tanto, los procedimientos y usos divulgados en el presente documento se pueden practicar para inducir anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con una variedad de virus de gripe H3, garantizando que a los sujetos se les administre una HA H3 que sea novedosa para esa población. La HA H3 única incluye, sin limitación, un virus de la gripe H3 que circulaba hace muchos años y cuyos sueros obtenidos de la población no muestran reactividad, un virus de la gripe H3 que circulaba en otra especie independiente del contacto humano y una HA mutada o quimérica que presentaba el tallo de HA H3 pero que carecía de epítomos en la cabeza con los que reaccionaran los sueros de la población que se iba a vacunar.

Además, la literatura indica que existen epítomos conservados en la cabeza de hemaglutinina que pueden neutralizar los virus de la gripe A de diferentes subtipos y en los subtipos de hemaglutinina del Grupo 1 y del Grupo 2 (Yoshida

et al. 2009). Por lo tanto, al inmunizar secuencialmente con hemaglutininas únicas del Grupo 1 y/o del Grupo 2 de hemaglutininas, se inducirán anticuerpos de amplia protección cruzada.

5 En todos los casos, estas hemaglutininas son "únicas" en el sentido de que carecen de epítomos de linfocitos B que sean fuertemente inmunogénicos en el sujeto que se va a vacunar y no se unen o se unen solo a niveles bajos con baja afinidad a los anticuerpos que circulan por los sujetos que se van a vacunar. No obstante, presentan epítomos conservados que son críticos para la función, por ejemplo, en el tallo de HA que soportan la fusión. Opcionalmente, estas hemaglutininas únicas conservan la estructura trimérica.

10 El término "respuesta de anticuerpos de protección cruzada", como se usa en el presente documento, se refiere a provocar una respuesta de anticuerpos a múltiples cepas de patógenos, tales como la gripe, cepas y/o subtipos.

El término "sitios antigénicos", como se usa en el presente documento, se refiere a sitios en la proteína HA capaces de provocar una respuesta inmunitaria. Por tanto, "sitios antigénicos conservados" se refiere a los sitios presentes tanto en la primera como en la segunda proteína HA única.

15 La administración de una hemaglutinina (HA) incluye, sin limitación, la administración de al menos el ectodominio de la hemaglutinina o la administración de la hemaglutinina como un componente de un virus, opcionalmente inactivado por procedimientos conocidos por los expertos en el estado de la técnica, tales como una vacuna "fraccionada" más o menos un adyuvante adecuado conocido por los expertos en el estado de la técnica, o un virus que comprende la HA única que se ha atenuado mediante procedimientos conocidos por los expertos en el estado de la técnica o una partícula de tipo vírico que comprende la HA única generada por procedimientos conocidos por los expertos en el estado de la técnica o un vector de ADN o ARN que codifica la HA única usando procedimientos conocidos por los expertos en el estado de la técnica.

En consecuencia, en una opción, la primera y/o la segunda proteína HA única son de un virus pandémico o un virus que normalmente infecta a una especie de huésped diferente. En un modo de realización, el virus que infecta una especie de huésped diferente es un virus que infecta a una especie aviar o un virus que infecta a los cerdos.

25 En otra opción, la primera y/o la segunda proteína HA única son parte de una cepa del virus de la gripe atenuada o inactivada.

El término "cepa inactivada del virus de la gripe", como se usa en el presente documento, se refiere a una cepa del virus de la gripe que no es infecciosa. Por ejemplo, un virus de la gripe se puede inactivar con formaldehído diluido o beta-propiolactona seguido de un tratamiento con detergente llamado "fraccionamiento" (Bardiya y Bae, 2005).

30 El término "cepa del virus de la gripe atenuada", como se usa en el presente documento, se refiere a un virus que está vivo pero que tiene una virulencia reducida. Los procedimientos para hacer que un virus vivo sea menos virulento son conocidos en la técnica e implican la adaptación al frío u otros procedimientos (Bardiya y Bae, 2005). Una ventaja de los virus vivos es que se pueden administrar por medio de insuflación nasal y/o a concentraciones más bajas de virus, lo que hace que las inoculaciones a gran escala sean menos costosas. El virus vivo, por ejemplo, provoca respuestas inmunitarias diversas y/o aumentadas en el receptor de la proteína HA, incluyendo, por ejemplo, respuestas inmunitarias sistémicas, locales, humorales y mediadas por células.

40 De forma alternativa, la primera y/o la segunda proteína HA única es una proteína HA artificial, opcionalmente en una forma que conserva el ectodominio trimérico de HA. Las proteínas HA artificiales están diseñadas para incluir mutaciones en la superficie de la cabeza de HA que hacen que sea antigénicamente no relacionada con la HA a la que se ha expuesto la población que se va a vacunar. Dichas proteínas se pueden expresar por un vector que comprende secuencias de ADN que codifican la proteína HA.

Un procedimiento para generar artificialmente una hemaglutinina única es mutar los residuos expuestos de la superficie en la cabeza de la hemaglutinina de una cepa del virus de la gripe estacional para alterar los epítomos de los linfocitos B existentes, mientras se mantienen los sitios antigénicos en el tallo.

45 Aún en otra opción, la primera y/o la segunda proteína HA única es una proteína quimérica que comprende un tallo conservado acoplado a una cabeza de una proteína HA única.

50 En una opción, las proteínas HA artificiales o quiméricas comprenden epítomos de linfocitos T, opcionalmente unidos por fusión, química o físicamente, a la proteína HA contra la cual se ha inmunizado el sujeto, por ejemplo, un péptido del toxoide tetánico. En otro modo de realización, donde se administra el virus completo, inactivado o atenuado, la ayuda de los linfocitos T se proporciona por los epítomos en otras proteínas del virión.

55 Aún en una opción más, la segunda proteína HA única comprende una cabeza que está sustancialmente no relacionada desde el punto de vista antigénico con la primera proteína HA única pero que comprende sitios antigénicos conservados en el tallo o la cabeza que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos. El término "sustancialmente no relacionada desde el punto de vista antigénico", como se usa en el presente documento, significa que los sitios o epítomos en la primera y la segunda proteína HA única que normalmente

provocan una fuerte respuesta de anticuerpos en el sujeto son diferentes, por ejemplo, de un subtipo de HA diferente del primer antígeno único de modo que los sujetos que se van a vacunar o los sujetos vacunados con la etapa a) tienen sueros que no neutralizan *in vitro* la infecciosidad de un virus de la gripe que presenta la hemaglutinina única según el ensayo estándar de la OMS, o que tienen un título en el ensayo de inhibición de la hemaglutinación contra un virus de la gripe que presenta la hemaglutinina única de menos de 40. Los antígenos están diseñados de modo que el segundo antígeno único no active muchos linfocitos B de memoria contra la cabeza inducidos por el primer antígeno único. La baja frecuencia de linfocitos B de memoria inducidos por la primera hemaglutinina única que produce anticuerpos que se unen fuertemente al segundo supuesto antígeno único se puede determinar fácilmente usando los procedimientos de Wen et al. 1987 o Corti et al. 2010.

En otra opción, la primera proteína hemaglutinina única es un miembro de los subtipos de proteína HA del Grupo 1 y la segunda hemaglutinina única es un miembro de los subtipos de proteína HA del Grupo 2 HA o la primera proteína hemaglutinina única es la proteína HA del Grupo 2 y la segunda hemaglutinina única es una proteína HA del Grupo 1. El término "HA del Grupo 1", como se usa en el presente documento, se refiere a las hemaglutininas de los subtipos H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 y H16. El término "HA del Grupo 2", como se usa en el presente documento, se refiere a las hemaglutininas de los subtipos H3, H4, H7, H10, H14 y H15.

Aún en otra opción, una o más proteínas HA únicas adicionales se usan como una mezcla o simultáneamente con la primera y/o la segunda proteína HA única. Por ejemplo, la primera proteína hemaglutinina única podría ser una proteína HA del Grupo 1 y se podría mezclar con una proteína HA del Grupo 2 o la proteína HA del Grupo 1 se podría administrar en un sitio anatómico y la proteína HA del Grupo 2 en un segundo sitio anatómico simultáneamente (es decir, al mismo tiempo o muy próximos, por ejemplo, dentro de las 24 horas siguientes). La segunda proteína hemaglutinina única se administraría a continuación 3 a 52 semanas después de la primera administración y también se podría mezclar con una o más proteínas HA únicas adicionales o administrar simultáneamente con una o más proteínas HA únicas adicionales.

En el presente documento también se proporciona un kit que comprende una primera proteína hemaglutinina (HA) única como se divulga en el presente documento y una segunda proteína hemaglutinina (HA) como se divulga en el presente documento, en el que la primera proteína HA y la segunda proteína HA son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos. En una opción, la primera proteína HA comprende una cabeza que es diferente de la de la segunda proteína HA y la primera proteína HA y la segunda proteína HA comprenden un tallo que tiene sitios antigénicos conservados que normalmente no son inmunogénicos.

En una opción, el kit se usa para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto.

En una opción, el kit comprende además un instrumento para administrar las proteínas HA y/o instrucciones para su uso y/o un recipiente.

Citomegalovirus humanos (HCMV)

También existe una gran necesidad de una vacuna que proteja contra el HCMV. Los anticuerpos contra un epítipo lineal en la glicoproteína gB denominado epítipo AD-2 pueden neutralizar la infecciosidad de múltiples cepas de HCMV. Sin embargo, los anticuerpos contra AD-2 se generan solo en una minoría de humanos vacunados con vacunas previas y muchos humanos infectados ni siquiera los generan. El autor de la presente invención ha mostrado que los anticuerpos humanos contra AD-2 tienen que tener una estructura muy específica y normalmente se derivan de un solo par de genes V de inmunoglobulina (McLean et al. 2005; McLean et al. 2006; Thomson et al. 2008); estas restricciones estructurales significan que los linfocitos B específicos para AD-2 son relativamente infrecuentes en comparación con los linfocitos B que son específicos para otro epítipo en el ectodominio de la proteína gB, AD-1. Los procedimientos descritos en el presente documento permiten una disminución de la competencia de los linfocitos B específicos de AD-1.

En consecuencia, en una opción divulgada en el presente documento, la presente divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta de anticuerpos de producción cruzada en un sujeto contra el citomegalovirus humano (HCMV), que comprende:

(a) administrar una glicoproteína gB o un fragmento de la misma que comprende el ectodominio gB al sujeto; y

(b) administrar una glicoproteína gB modificada 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, después de a), en el que la glicoproteína gB modificada carece del epítipo AD-1.

En otra opción divulgada en el presente documento, la divulgación proporciona un uso de una glicoproteína gB modificada para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a una glicoproteína gB o su ectodominio 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, antes, en el que la glicoproteína gB modificada carece del epítipo AD-1. La divulgación también proporciona una glicoproteína gB modificada para su uso en la inducción de una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a una glicoproteína gB o su ectodominio 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, antes, en el que la glicoproteína gB modificada carece del epítipo AD-1. También divulgado en el

presente documento, la divulgación proporciona un uso de una glicoproteína gB modificada para preparar una vacuna de refuerzo para vacunar a un sujeto que se ha vacunado con una primovacuna que comprende una glicoproteína gB o su ectodominio 3 a 52 semanas, opcionalmente 4 a 16 semanas, antes, en el que la glicoproteína gB modificada carece del epítipo AD-1.

5 La frase "carece del epítipo AD-1", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína o virus que contiene la proteína gB en la que el epítipo AD-1 está mutado o ausente. Esto permite la expansión de los niveles de linfocitos B de memoria relativamente raros o linfocitos B indiferenciados que producen anticuerpos de alta afinidad contra el epítipo AD-2. En una opción divulgada en el presente documento se usa un fragmento de gB que carece del epítipo AD-1 pero conserva AD-2. Dicho fragmento puede estar constituido por los ~70-100 aminoácidos
10 N terminales de la proteína gB. Este fragmento no incluye los aminoácidos que comprenden el epítipo AD-1 (Wagner et al. 1992). Se ha demostrado que los anticuerpos neutralizantes que se unen al epítipo AD-2 se unen más fuertemente a este fragmento N terminal de gB que los que se unen al péptido lineal AD-2, lo que indica que en este fragmento el péptido AD-2 adopta la misma configuración que en el gB natural (Thomson et al. 2008).

15 En el presente documento también se divulga un kit que comprende una proteína gB como se divulga en el presente documento y una proteína gB modificada como se divulga en el presente documento, en el que la glicoproteína gB modificada carece del epítipo AD-1.

En una opción divulgada en el presente documento, el kit se usa para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto.

20 También divulgado en el presente documento, el kit comprende además un instrumento para administrar las proteínas gB y/o instrucciones para su uso y/o un recipiente.

Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

Será evidente para los expertos en la técnica que la metodología actualmente divulgada también es útil para provocar anticuerpos ampliamente neutralizantes contra la proteína de la envoltura de VIH-1 gp160 o el ectodominio gp140 (Karlsson Hehestam et al. 2008 y Kwong y Wilson, 2009).

25 En consecuencia, aún en otra opción divulgada en el presente documento, la presente divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes de protección cruzada en un sujeto contra el VIH-1 que comprende:

(a) administrar una primera glicoproteína gp140 o gp160 única al sujeto; y

(b) administrar una segunda proteína gp140 o gp160 única 3 a 52 semanas después de a);

30 en el que la segunda glicoproteína gp140 o gp160 única y la primera glicoproteína gp140 o gp160 única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

35 También divulgado en el presente documento, la divulgación proporciona un uso de una segunda glucoproteína gp140 o gp160 única para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a inmunización con una primera glicoproteína gp140 o gp160 única 3 a 52 semanas antes; en el que la segunda glicoproteína gp140 o gp160 única y la primera glicoproteína gp140 o gp160 única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

40 La divulgación también proporciona la segunda glucoproteína gp140 o gp160 única para su uso en la inducción de una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto que se ha sometido previamente a inmunización con una primera glicoproteína gp140 o gp160 única 3 a 52 semanas antes; en el que la segunda glicoproteína gp140 o gp160 única y la primera glicoproteína gp140 o gp160 única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

45 Aún en otra opción divulgada en el presente documento, la divulgación proporciona un uso de una segunda glicoproteína gp140 o gp160 única para preparar una vacuna de refuerzo para la vacunación de un sujeto que se ha vacunado con una primovacuna que comprende una primera glicoproteína gp140 o gp160 única 3 a 52 semanas antes, en el que la segunda glicoproteína gp140 o gp160 única y la primera glicoproteína gp140 o gp160 única son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.

50 El término "glicoproteína gp140 o gp160 única", como se usa en el presente documento, se refiere a una glicoproteína gp140 o gp160 o un fragmento de la misma que es única o desconocida para el sujeto que se desea vacunar, de modo que no existan o existan pocos linfocitos B de memoria activados por contacto con la "única glicoproteína gp140 o gp160" y no existan o existan niveles bajos de anticuerpos que circulan por el sujeto que se unan a la única glicoproteína gp140 o gp160. En la "glicoproteína gp140 o gp160 única", los epítopos que

- típicamente provocan una fuerte respuesta de anticuerpos en el sujeto son diferentes, por ejemplo, debido a la mutación o delección de aminoácidos o a diferente glicosilación, de los epítomos de glicoproteínas gp140 o gp160 relacionadas encontradas previamente por el sujeto, ya sea por infección natural o por vacunación. Sin embargo, la "glicoproteína gp140 o gp160 única" comparte epítomos comunes de linfocitos B que son la diana de los anticuerpos protectores en el sujeto, pero que normalmente no son inmunogénicos debido a la competencia por la ayuda de los linfocitos T con los más numerosos linfocitos B estimulados por partes inmunógenas del patógeno antígeno. La baja frecuencia de linfocitos B de memoria en la población que se va a vacunar inducidos por la glicoproteína única que produce anticuerpos que se unen fuertemente a la supuesta proteína única se puede determinar fácilmente usando los procedimientos de Wen et al. 1987 o Corti et al. 2010.
- 5 En el presente documento también se proporciona un kit que comprende una primera glicoproteína gp140 o gp160 única como se divulga en el presente documento y una segunda glicoproteína gp140 o gp160 como se divulga en el presente documento, en el que la primera glicoproteína gp140 o gp160 y la segunda glicoproteína gp140 o gp160 son inmunológicamente distintas pero comparten sitios conservados que normalmente no son inmunogénicos para anticuerpos.
- 10 En una opción divulgada en el presente documento, el kit se usa para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada en un sujeto.
- 15 También divulgado en el presente documento, el kit comprende además un instrumento para administrar las glicoproteínas gp140 o gp160 y/o instrucciones para su uso y/o un recipiente.
- 20 El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro del reino animal, opcionalmente a los humanos. Por ejemplo, un sujeto que es susceptible a la infección por gripe, incluye, sin limitación, aves, cerdos, caballos y humanos.
- En una opción, los procedimientos y/o usos descritos en el presente documento comprenden además la administración de un adyuvante con el primer y/o el segundo antígeno patógeno y/o tercer antígeno patógeno o proteínas únicas divulgadas en el presente documento. El término "adyuvante", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que puede potenciar los efectos inmunoestimulantes de los antígenos patógenos descritos en el presente documento pero que no tiene ningún efecto antigénico específico por sí mismo. Los adyuvantes típicos incluyen, sin limitación, adyuvante de Freund, sales de aluminio, escualeno, poli I:C, GM-CSF, SB-AS2, sistema de adyuvante de Ribí, adyuvante de Gerbu, CpG y monofosforil lípido A y adyuvantes patentados aprobados tales como sistema de adyuvante AS03, una emulsión compuesta por DL-a-tocoferol, escualeno y polisorbato 8 desarrollada por GlaxoSmithKline (GSK).
- 25 Como entenderá un experto en la técnica, la cantidad inmunológicamente eficaz variará con la formulación, la ruta de administración, el huésped al que se está tratando y similares pero, no obstante, puede ser determinado de forma rutinaria por un experto en la técnica.
- 30 Los antígenos patógenos o proteínas divulgados en el presente documento en una opción se formulan adecuadamente como una formulación líquida, una formulación sólida o una formulación en pulverizador.
- 35 En una opción, los antígenos patógenos o proteínas divulgados en el presente documento se formulan adecuadamente para administración oral, por ejemplo por medio de agua potable y/o combinados con alimentos; intranasal, por ejemplo por medio de pulverizador; gotas para los ojos; intramuscular, intradérmica, subcutánea; intravenosa y/o intraperitoneal.
- 40 En una opción, el primer y/o segundo antígeno patógeno o proteína divulgados en el presente documento se administran por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intranasal. En una opción, el procedimiento de administración es el mismo para el primer y el segundo antígeno patógeno o proteína divulgados en el presente documento. En una opción alternativa, el procedimiento de administración es diferente para el primer y el segundo antígeno patógeno o proteína divulgados en el presente documento.
- 45 Los vehículos adecuados y/o vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, agua, incluyendo agua estéril, solución salina, etanol, etilenglicol, glicerol, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, saponinas y vehículos basados en alumbre, etc. y se pueden añadir coformulantes. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, vehículos que sean adecuados para administración en animales, por ejemplo, que se han filtrado para esterilidad. Los vehículos adecuados se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., EE. UU., 2000).
- 50

ENSAYOS PARA DETECTAR ANTICUERPOS DE PROTECCIÓN CRUZADA

- 55 Con el fin de detectar anticuerpos heterosubtípicos que neutralizan la infecciosidad y, por tanto, pueden ser protectores, con el propósito de evaluar los regímenes de vacunación o cribar anticuerpos monoclonales terapéuticos o profilácticos, un ensayo debe ser sensible a todos los anticuerpos inhibidores, ya sea porque se neutralicen al bloquear la unión del virus a las células huésped o porque se bloqueen en una etapa posterior al

bloquear el cambio conformacional en el tallo de HA que es necesario para la fusión de las membranas del virus y el endosoma y, por tanto, la entrada del genoma vírico en el citosol.

5 El ensayo estándar de microneutralización de la OMS solo permite que la mezcla de los anticuerpos sometidos a prueba y el virus de desafío estén en contacto con las células huésped durante solo unas pocas horas, después de lo cual los anticuerpos y los virus se eliminan y las células se incuban durante 1 a 5 días para permitir que la infección se desarrolle. Por tanto, los anticuerpos tienen que actuar en las primeras horas de la infección. Para los anticuerpos neutralizantes convencionales que se unen a la cabeza de HA y bloquean la unión de la HA del virus a su receptor en la célula huésped, esto no importa. Sin embargo, para los anticuerpos que bloquean la infecciosidad al unirse al tallo de HA e inhibir la fusión del virus con la membrana endosomal, es posible que tengan que estar presentes en concentraciones más altas durante períodos de tiempo más largos para bloquear la infecciosidad. Los ensayos en los que los anticuerpos están presentes durante todo el ensayo de 1 a 5 días permiten que los anticuerpos se unan al tallo de HA y se neutralicen, mientras que no lo hacen en el ensayo estándar.

En consecuencia, en el presente documento también se proporciona un ensayo para detectar anticuerpos de protección cruzada contra un virus de la gripe, que comprende:

15 (a) incubar células con el virus de la gripe y someter a prueba la muestra de suero durante 1 a 5 días; en el que las células expresan una proteasa que escinde la hemaglutinina de la gripe; y

(b) detectar la infecciosidad vírica en comparación con un control sin muestra;

en el que una disminución de la infecciosidad vírica a los 1-5 días indica la presencia de anticuerpos de protección cruzada.

20 El término "infecciosidad vírica", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad del virus para infectar las células huésped y se puede evaluar por la cantidad de proteínas víricas presentes o por la cantidad de supervivencia celular. Por tanto, detectar la infecciosidad vírica incluye, sin limitación, detectar la cantidad de proteínas víricas y/o detectar la supervivencia celular.

25 En una opción, detectar la infecciosidad vírica comprende detectar la supervivencia celular y una disminución de la infecciosidad vírica comprende un incremento de la supervivencia celular.

El término "control", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra de un sujeto o un grupo de sujetos que no han sido infectados por o vacunados contra un virus de la gripe novedoso o único. El término también incluye un estándar predeterminado.

30 La escisión de la hemaglutinina es necesaria para que la hemaglutinina experimente el cambio conformacional que es necesario para la fusión de la membrana vírica con la de la célula huésped. Algunos virus de la gripe aviar, por ejemplo, se escinden fácilmente por las enzimas que prevalecen en muchas células. Sin embargo, para los virus de gripe humana y de mamíferos, las enzimas que escinden la hemaglutinina solo están presentes en un conjunto restringido de células que incluyen, sin limitación, las células que recubren los pulmones. Por lo tanto, durante muchos años, el ensayo que se usó para detectar anticuerpos neutralizantes que probablemente sean protectores usaba células de mamíferos (normalmente células MDCK caninas) y se basaba en la inclusión en el medio de una enzima proteolítica tal como la TCPK-tripsina. Por este motivo, en el ensayo de microneutralización estándar de la OMS, la mezcla de suero y virus se incubaba con las células MDCK durante 2 a 3 horas y a continuación se elimina para que no inhiba la TCPK-tripsina.

40 En consecuencia, en una opción, la línea celular es una línea celular de mamífero derivada del pulmón, las vías respiratorias o las células epiteliales del intestino. Por ejemplo, una línea celular humana que se origina en las vías respiratorias humanas es A549, que expresa enzimas proteolíticas que normalmente escinden la hemaglutinina de la gripe, tal como TMPRSS2 y HAT.

45 En otra opción, la hemaglutinina del virus de la gripe contra la cual se desea detectar anticuerpos neutralizantes contra el tallo puede mutar en el sitio de escisión, lo que hace que sea fácilmente escindible intracelularmente, como la hemaglutinina de los virus de la gripe aviar.

PROCEDIMIENTO DE GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CON PROTECCIÓN CRUZADA CONTRA LA GRIPE

50 La presente demostración de que los anticuerpos de reacción cruzada que se producen son dominantes en la respuesta a una hemaglutinina desconocida permite la generación de anticuerpos monoclonales que reaccionan de forma cruzada con múltiples cepas y/o subtipos de gripe. En consecuencia, en el presente documento también se proporciona un procedimiento para generar anticuerpos monoclonales, opcionalmente humanos, de protección cruzada contra la gripe, que comprende:

(a) aislar células de una muestra de sangre u otro tejido que contenga células del sistema inmunitario de un sujeto que se ha infectado con o vacunado contra una cepa de gripe que presenta una hemaglutinina única;

(b) preparar anticuerpos monoclonales usando las células de (a); y

(c) seleccionar anticuerpos monoclonales que reaccionan de forma cruzada con diferentes cepas y subtipos de virus o que se unen al tallo de la hemaglutinina.

5 En una opción, el sujeto se ha vacunado usando uno de los procedimientos o usos descritos en el presente documento para inducir una respuesta de anticuerpos de protección cruzada a la gripe.

10 El procedimiento para derivar células inmunitarias que contienen células que producen anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con y neutralizan muchos tipos de virus de la gripe será útil para la generación de anticuerpos monoclonales producidos por una variedad de procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo técnicas de colecciones basadas en presentación, técnicas de inmortalización o hibridoma o procedimientos que se basan en la clonación o secuenciación de ADNc o ARN que codifican inmunoglobulinas de células individuales seleccionadas que producen los anticuerpos deseados. Las mezclas de anticuerpos monoclonales de reacción cruzada contra múltiples cepas generadas por este procedimiento se pueden combinar para minimizar la aparición de cepas mutantes que escapan a la neutralización por estos anticuerpos.

15 Para producir anticuerpos monoclonales humanos, se pueden recoger células productoras de anticuerpos (linfocitos) de un humano infectado por gripe y se pueden fusionar con células de mieloma mediante procedimientos estándar de fusión de células somáticas, inmortalizando por tanto estas células y proporcionando células de hibridoma. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica (por ejemplo, la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (Nature 256:495-497 (1975)), así como otras técnicas tal como la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor et al. Immunol. Today 4:72 (1983)), la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al. Methods Enzymol, 121:140-67 (1986)) o inmortalización EBV de linfocitos B activados (Pinna et al. 2009) y el cribado de colecciones de anticuerpos combinatorios (Huse et al. Science 246:1275 (1989)). Los anticuerpos monoclonales se pueden cribar inmunológicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con hemaglutinina y se pueden aislar los anticuerpos monoclonales. Los procedimientos opcionales se describen en la solicitud de patente PCT/CA 2006/001074 (n.º de publicación WO2007003041 A1).

ANTICUERPOS MONOCLONALES DE PROTECCIÓN CRUZADA Y/O NOVEDOSOS CONTRA LA GRIPE

30 El autor de la presente invención ha obtenido y secuenciado diez anticuerpos monoclonales humanos de protección cruzada y/o novedosos contra la gripe usando los procedimientos descritos en la solicitud de patente PCT/CA2006/001074 (publicación n.º WO2007003041 A1). Los anticuerpos monoclonales humanos se desarrollaron a partir de la exposición del sistema inmunitario humano a una hemaglutinina única que era inmunológicamente distinta de la HA de otros virus de la gripe a los que los humanos en general habían estado expuestos. En el presente caso, la HA del virus de la gripe pandémica de 2009 (H1N1) de origen porcino no está relacionada antigénicamente con la hemaglutinina de ninguna cepa del virus de la gripe a la que la mayoría de los humanos habían estado previamente expuestos a través de infecciones o vacunaciones, de modo que pocos humanos tenían anticuerpos neutralizantes contra ellas (Itoh et al. 2009). La exposición a la HA única significaba que había muy pocos linfocitos B de memoria que producían anticuerpos que presentaban reacción cruzada con la cabeza de la HA de nH1N1 y que, por tanto, se podían activar por la misma. Esta circunstancia permitió que los linfocitos B de memoria relativamente raros que reconocían regiones de la HA que estaban conservadas con respecto a los virus de la gripe estacional a los que los humanos habían estado expuestos se activaran por la HA del nH1N1 y tuvieran acceso a la ayuda de los linfocitos T y se sometieran a una maduración de afinidad. Estos linfocitos B de memoria incluyen aquellos que producen anticuerpos contra la región conservada del tallo y también producen algunos anticuerpos contra las regiones conservadas de la cabeza de la HA.

45 El autor de la invención ha obtenido diez anticuerpos monoclonales, V2-36, V2-7, V3-2G6, I8-1B6, V3-3D2, V3-1G10, 15-24, 14-128, V4-17 y V3-2C3, y ha determinado la secuencia de las regiones variables de cadena ligera y pesada y las regiones determinantes de complementariedad 1, 2 y 3 de los anticuerpos (Tabla 2).

Dada la divulgación de la secuencia de la región variable de cadena pesada y cadena ligera que determinan las características de unión de un anticuerpo dado, un experto en la técnica podría fácilmente determinar secuencias de nucleótidos que especifican la síntesis del anticuerpo que se divulga.

50 El autor de la invención ha obtenido las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de V2-36. En consecuencia, la divulgación proporciona una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos YSNIGTGFD (SEQ ID NO:1); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos GNN (SEQ ID NO:2); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos QSFDSLSGSNV (SEQ ID NO:3); la CDR1 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos GGSISGGSY (SEQ ID NO:4); la CDR2 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos IYYSGST (SEQ ID NO:5); y la CDR3 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos AKHESDSSSWHTGWNWFD (SEQ ID NO:6).

- 5 La divulgación también incluye secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos YSNIGTGFD (SEQ ID NO:1); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos GNN (SEQ ID NO:2); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QSFSSLSGNSV (SEQ ID NO:3); la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GGSISGGSHY (SEQ ID NO:4); la CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos IYYSGST (SEQ ID NO:5); y la CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos AKHESDSSSWHTGWNWFDP (SEQ ID NO:6).
- 10 También se proporcionan regiones variables de cadena ligera aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:1, 2 y/o 3), y regiones variables de cadena pesada aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:4, 5 y/o 6). En una opción, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:7. En otra opción, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:8.
- 15 La divulgación también incluye una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:7, y una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:8.
- 20 La divulgación proporciona además un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende al menos una región determinante de complementariedad de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO:1-3 y/o al menos una región determinante de complementariedad de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO:4-6.
- 25 En una opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de CDR de cadena ligera de SEQ ID NO:1, 2 y 3 y/o las secuencias de CDR de cadena pesada de SEQ ID NO:4, 5 y 6. En otra opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende el aminoácido de SEQ ID NO:7 (región variable de cadena ligera) y/o el aminoácido de SEQ ID NO:8 (región variable de cadena pesada).
- 30 El autor de la invención ha obtenido las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo V2-7. En consecuencia, la divulgación proporciona una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos STNIGAGLA (SEQ ID NO:9); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos GNT (SEQ ID NO:10); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos QSFDGSLGNSV (SEQ ID NO:11); la CDR1 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos GGSIRGGTNY (SEQ ID NO:12); la CDR2 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos VYYSGST (SEQ ID NO:13); y la CDR3 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos ARHESDSSSWHTGWNWFDP (SEQ ID NO:14).
- 35 La divulgación también incluye secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos STNIGAGLA (SEQ ID NO:9); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos GNT (SEQ ID NO:10); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QSFDGSLGNSV (SEQ ID NO:11); la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GGSIRGGTNY (SEQ ID NO:12); la CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos VYYSGST (SEQ ID NO:13); y la CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ARHESDSSSWHTGWNWFDP (SEQ ID NO:14).
- 40 También se proporcionan regiones variables de cadena ligera aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:9, 10 y/o 11), y regiones variables de cadena pesada aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:12, 13 y/o 14). En una opción, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:15. En otra opción, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:16.
- 45 La divulgación también incluye una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:15, y una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:16.
- 50 La divulgación proporciona además un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende al menos una región determinante de complementariedad de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO:9-11 y/o al menos una región determinante de complementariedad de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO:12-14.
- 55 En una opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de CDR de cadena ligera de SEQ ID NO:9, 10 y 11 y/o las secuencias de CDR de cadena pesada de SEQ ID NO:12, 13 y 14. En otra opción, el

anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende el aminoácido de SEQ ID NO:15 (región variable de cadena ligera) y/o el aminoácido de SEQ ID NO:16 (región variable de cadena pesada).

El autor de la invención ha obtenido las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de V3-2G6. En consecuencia, la divulgación proporciona una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos QIVSSSQ (SEQ ID NO:17); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO:18); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos QQYGTSHA (SEQ ID NO:19); la CDR1 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos GGTFSSFA (SEQ ID NO:20); la CDR2 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos IIGMFGTT (SEQ ID NO:21); y la CDR3 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos ARGKKYYHDTLDY (SEQ ID NO:22).

La divulgación también incluye secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QIVSSSQ (SEQ ID NO:17); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO:18); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QQYGTSHA (SEQ ID NO:19); la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GGTFSSFA (SEQ ID NO:20); la CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos IIGMFGTT (SEQ ID NO:21); y la CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ARGKKYYHDTLDY (SEQ ID NO:22).

También se proporcionan regiones variables de cadena ligera aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:17, 18 y/o 19), y regiones variables de cadena pesada aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:20, 21 y/o 22). En una opción, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:23. En otra opción, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:24.

La divulgación también incluye una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:23, y una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:24.

La divulgación proporciona además un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende al menos una región determinante de complementariedad de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO:17-19 y/o al menos una región determinante de complementariedad de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO:20-22.

En una opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de CDR de cadena ligera de SEQ ID NO:17, 18 y 19 y/o las secuencias de CDR de cadena pesada de SEQ ID NO:20, 21 y 22. En otra opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende el aminoácido de SEQ ID NO:23 (región variable de cadena ligera) y/o el aminoácido de SEQ ID NO:24 (región variable de cadena pesada).

El autor de la invención ha obtenido las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de 18-1B6. En consecuencia, la divulgación proporciona una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos NSDVGTYNY (SEQ ID NO:25); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos DVS (SEQ ID NO:26); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos SSYTTSNTRV (SEQ ID NO:27); la CDR1 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos GGIFSNFA (SEQ ID NO:28); la CDR2 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos ILSIFRRT (SEQ ID NO:29); y la CDR3 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos ARSITNLYYYYMDV (SEQ ID NO:30).

La divulgación también incluye secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos NSDVGTYNY (SEQ ID NO:25); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos DVS (SEQ ID NO:26); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SSYTTSNTRV (SEQ ID NO:27); la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GGIFSNFA (SEQ ID NO:28); la CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ILSIFRRT (SEQ ID NO:29); y la CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ARSITNLYYYYMDV (SEQ ID NO:30).

También se proporcionan regiones variables de cadena ligera aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:25, 26 y/o 27), y regiones variables de cadena pesada aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:28, 29 y/o 30). En una opción, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de

aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:31. En otra opción, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:32.

5 La divulgación también incluye una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:31, y una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:32.

La divulgación proporciona además un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende al menos una región determinante de complementariedad de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO:25-27 y/o al menos una región determinante de complementariedad de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO:28-30.

10 En una opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de CDR de cadena ligera de SEQ ID NO:25, 26 y 27 y/o las secuencias de CDR de cadena pesada de SEQ ID NO:28, 29 y 30. En otra opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende el aminoácido de SEQ ID NO:31 (región variable de cadena ligera) y/o el aminoácido de SEQ ID NO:32 (región variable de cadena pesada).

15 El autor de la invención ha obtenido las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de V3-3D2. En consecuencia, la divulgación proporciona una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos QDISNY (SEQ ID NO:33); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos ATS (SEQ ID NO:34); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos QQYSRYPT (SEQ ID NO:35); la CDR1 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos GVIFNAYA (SEQ ID NO:36); la CDR2 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos ITGVFHTA (SEQ ID NO:37); y la CDR3 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos ARGPKYYHSYMDV (SEQ ID NO:38).

25 La divulgación también incluye secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QDISNY (SEQ ID NO:33); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos ATS (SEQ ID NO:34); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QQYSRYPT (SEQ ID NO:35); la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GVIFNAYA (SEQ ID NO:36); la CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ITGVFHTA (SEQ ID NO:37); y la CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ARGPKYYHSYMDV (SEQ ID NO:38).

30 También se proporcionan regiones variables de cadena ligera aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:33, 34 y/o 35), y regiones variables de cadena pesada aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:36, 37 y/o 38). En una opción, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:39. En otra opción, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:40.

35 La divulgación también incluye una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:39, y una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:40.

La divulgación proporciona además un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende al menos una región determinante de complementariedad de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO:33-35 y/o al menos una región determinante de complementariedad de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO:36-38.

45 En una opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de CDR de cadena ligera de SEQ ID NO:33, 34 y 35 y/o las secuencias de CDR de cadena pesada de SEQ ID NO:36, 37 y 38. En otra opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende el aminoácido de SEQ ID NO:39 (región variable de cadena ligera) y/o el aminoácido de SEQ ID NO:40 (región variable de cadena pesada).

50 El autor de la invención ha obtenido las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de V3-1G10. En consecuencia, la divulgación proporciona una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos QSVGNT (SEQ ID NO:41); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos GAS (SEQ ID NO:42); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos QHYNNWPPYT (SEQ ID NO:43); la CDR1 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos GVTFNHYT (SEQ ID NO:44); la CDR2 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos IIPFLGTA (SEQ ID NO:45); y la CDR3 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos ARSGTTKTRYNWFD (SEQ ID NO:46).

55

- La divulgación también incluye secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QSVGNT (SEQ ID NO:41); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos GAS (SEQ ID NO:42); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QHYNNWPPYT (SEQ ID NO:43); la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GVTFNHYT (SEQ ID NO:44); la CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos IIPFLGTA (SEQ ID NO:45); y la CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ARSGTTKTRYNWFDP (SEQ ID NO:46).
- También se proporcionan regiones variables de cadena ligera aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:41, 42 y/o 43), y regiones variables de cadena pesada aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:44, 45 y/o 46). En una opción, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:47. En otra opción, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:48.
- La divulgación también incluye una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:47, y una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:48.
- La divulgación proporciona además un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende al menos una región determinante de complementariedad de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO:41-43 y/o al menos una región determinante de complementariedad de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO:44-46.
- En una opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de CDR de cadena ligera de SEQ ID NO:41, 42 y 43 y/o las secuencias de CDR de cadena pesada de SEQ ID NO:44, 45 y 46. En otra opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende el aminoácido de SEQ ID NO:47 (región variable de cadena ligera) y/o el aminoácido de SEQ ID NO:48 (región variable de cadena pesada).
- El autor de la invención ha obtenido las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de 15-24. En consecuencia, la divulgación proporciona una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos QSLSSGH (SEQ ID NO:49); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos GAS (SEQ ID NO:50); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos QQYAVFLYT (SEQ ID NO:51); la CDR1 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos GGTFSTRYT (SEQ ID NO:52); la CDR2 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos FIPLLGMT (SEQ ID NO:53); y la CDR3 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos ARHDSSGYHPLDY (SEQ ID NO:54).
- La divulgación también incluye secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QSLSSGH (SEQ ID NO:49); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos GAS (SEQ ID NO:50); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QQYAVFLYT (SEQ ID NO:51); la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GGTFSTRYT (SEQ ID NO:52); la CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos FIPLLGMT (SEQ ID NO:53); y la CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ARHDSSGYHPLDY (SEQ ID NO:54).
- También se proporcionan regiones variables de cadena ligera aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:49, 50 y/o 51), y regiones variables de cadena pesada aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:52, 53 y/o 54). En una opción, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:55. En otra opción, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:56.
- La divulgación también incluye una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:55, y una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:56.
- La divulgación proporciona además un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende al menos una región determinante de complementariedad de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO:49-51 y/o al menos una región determinante de complementariedad de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO:52-54.
- En una opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de CDR de cadena ligera de SEQ ID NO:49, 50 y 51 y/o las secuencias de CDR de cadena pesada de SEQ ID NO:52, 53 y 54. En otra opción, el

anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende el aminoácido de SEQ ID NO:55 (región variable de cadena ligera) y/o el aminoácido de SEQ ID NO:56 (región variable de cadena pesada).

El autor de la invención ha obtenido las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de 14-128. En consecuencia, la divulgación proporciona una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos QTISTY (SEQ ID NO:57); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos MAS (SEQ ID NO:58); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos QHYNTYSST (SEQ ID NO:59); la CDR1 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos GGTFSTYG (SEQ ID NO:60); la CDR2 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos IPIFGTA (SEQ ID NO:61); y la CDR3 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos ARPNTYGYLPVY (SEQ ID NO:62).

La divulgación también incluye secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QTISTY (SEQ ID NO:57); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos MAS (SEQ ID NO:58); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QHYNTYSST (SEQ ID NO:59); la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GGTFSTYG (SEQ ID NO:60); la CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos IPIFGTA (SEQ ID NO:61); y la CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ARPNTYGYLPVY (SEQ ID NO:62).

También se proporcionan regiones variables de cadena ligera aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:57, 58 y/o 59), y regiones variables de cadena pesada aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:60, 61 y/o 62). En un modo de realización, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:63. En otra opción, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:64.

La divulgación también incluye una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:63, y una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:64.

La divulgación proporciona además un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende al menos una región determinante de complementariedad de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO:57-59 y/o al menos una región determinante de complementariedad de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO:60-62.

En una opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de CDR de cadena ligera de SEQ ID NO:57, 58 y 59 y/o las secuencias de CDR de cadena pesada de SEQ ID NO:60, 61 y 62. En otra opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende el aminoácido de SEQ ID NO:63 (región variable de cadena ligera) y/o el aminoácido de SEQ ID NO:64 (región variable de cadena pesada).

El autor de la invención ha obtenido las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de V4-17. En consecuencia, la divulgación proporciona una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos SSNIGTY (SEQ ID NO:65); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos DNN (SEQ ID NO:66); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos AAWDDSLGW (SEQ ID NO:67); la CDR1 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos GGSITRNSYF (SEQ ID NO:68); la CDR2 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos MYYDGTT (SEQ ID NO:69); y la CDR3 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos ARHHVTELRVLEWLPKSDY (SEQ ID NO:70).

La divulgación también incluye secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SSNIGTY (SEQ ID NO:65); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos DNN (SEQ ID NO:66); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos AAWDDSLGW (SEQ ID NO:67); la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GGSITRNSYF (SEQ ID NO:68); la CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos MYYDGTT (SEQ ID NO:69); y la CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ARHHVTELRVLEWLPKSDY (SEQ ID NO:70).

También se proporcionan regiones variables de cadena ligera aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:65, 66 y/o 67), y regiones variables de cadena pesada aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:68, 69 y/o 70). En una opción, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de

aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:71. En otra opción, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:72.

5 La divulgación también incluye una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:71, y una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:72.

La divulgación proporciona además un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende al menos una región determinante de complementariedad de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO:65-67 y/o al menos una región determinante de complementariedad de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO:68-70.

10 En una opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de CDR de cadena ligera de SEQ ID NO:65, 66 y 67 y/o las secuencias de CDR de cadena pesada de SEQ ID NO:68, 69 y 70. En otra opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende el aminoácido de SEQ ID NO:71 (región variable de cadena ligera) y/o el aminoácido de SEQ ID NO:72 (región variable de cadena pesada).

15 El autor de la invención ha obtenido las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de V3-2C3. En consecuencia, la divulgación proporciona una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos QSISW (SEQ ID NO:73); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos KAS (SEQ ID NO:74); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos QHYNSYSQT (SEQ ID NO:75); la CDR1 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos GGTFNNYA (SEQ ID NO:76); la CDR2 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos IPIFGTA (SEQ ID NO:77); y la CDR3 de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos ARVCSFYGSGSYNVFCY (SEQ ID NO:78).

20 La divulgación también incluye secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QSISW (SEQ ID NO:73); la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos KAS (SEQ ID NO:74); la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QHYNSYSQT (SEQ ID NO:75); la CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GGTFNNYA (SEQ ID NO:76); la CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos IPIFGTA (SEQ ID NO:77); y la CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos ARVCSFYGSGSYNVFCY (SEQ ID NO:78).

25 También se proporcionan regiones variables de cadena ligera aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:73, 74 y/o 75), y regiones variables de cadena pesada aisladas que comprenden CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada divulgadas en el presente documento (SEQ ID NO:76, 77 y/o 78). En una opción, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:79. En otra opción, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:80.

30 La divulgación también incluye una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:79, y una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:80.

La divulgación proporciona además un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende al menos una región determinante de complementariedad de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO:73-75 y/o al menos una región determinante de complementariedad de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO:76-78.

35 En una opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de CDR de cadena ligera de SEQ ID NO:73, 74 y 75 y/o las secuencias de CDR de cadena pesada de SEQ ID NO:76, 77 y 78. En otra opción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende el aminoácido de SEQ ID NO:79 (región variable de cadena ligera) y/o el aminoácido de SEQ ID NO:80 (región variable de cadena pesada).

40 La divulgación también proporciona variantes de las secuencias de CDR, secuencias variables de cadena ligera y cadena pesada y anticuerpos que comprenden dichas secuencias variantes. Dichas variantes incluyen proteínas que realizan sustancialmente la misma función que las proteínas o fragmentos específicos divulgados en el presente documento sustancialmente de la misma manera. Por ejemplo, una variante funcional de una CDR o región variable de cadena ligera o cadena pesada o anticuerpo se podrá unir a un antígeno o epítipo reconocido por la CDR o región variable de cadena ligera o cadena pesada o anticuerpo naturales.

45 En una opción, las secuencias de aminoácidos variantes de la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, y la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada tienen al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de CDR divulgadas en el presente documento.

En otra opción, las secuencias de aminoácidos variantes de la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada tienen al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada divulgadas en el presente documento.

5 El término "identidad de secuencia", como se usa en el presente documento, se refiere al porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias polipeptídicas o dos secuencias de ácido nucleico. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean con propósitos de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). A continuación, se comparan los residuos de aminoácido o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones superpuestas idénticas / número total de posiciones x 100 %). En una opción, las dos secuencias son de la misma longitud. La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias también se puede lograr usando un algoritmo matemático. Un ejemplo opcional no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al. 1990, J. Mol. Biol. 215:403. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el conjunto de parámetros del programa de nucleótidos NBLAST, por ejemplo, para puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el conjunto de parámetros del programa XBLAST, por ejemplo, para puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la presente divulgación. Para obtener alineaciones con huecos con propósitos de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al. 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. De forma alternativa, se puede usar PSI-BLAST para realizar una búsqueda iterada, que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-BLAST se pueden usar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, de XBLAST y NBLAST) (véase, por ejemplo, el sitio web de NCBI). Otro ejemplo opcional no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, 1988, CABIOS 4: 1-17. Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que forma parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de huecos de 12 y una penalización de huecos de 4. El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar usando técnicas similares a las descritas anteriormente, permitiendo o no los huecos. En el cálculo del porcentaje de identidad, típicamente solo se contabilizan las coincidencias exactas.

La divulgación también proporciona secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican variantes de las secuencias de CDR y secuencias de región variable discutidas anteriormente.

El término "secuencia de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de monómeros de nucleósido o nucleótido que consiste en bases naturales, azúcares y enlaces entre azúcares (cadena principal). El término también incluye secuencias modificadas o sustituidas que comprenden monómeros no naturales o porciones de los mismos. Las secuencias de ácido nucleico de la presente divulgación pueden ser secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o secuencias de ácido ribonucleico (ARN) y pueden incluir bases naturales que incluyen adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. Las secuencias también pueden contener bases modificadas. Ejemplos de dichas bases modificadas incluyen aza y desaza adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo; y xantina e hipoxantina.

El término "secuencias de ácido nucleico aisladas", como se usa en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico sustancialmente libre de material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Un ácido nucleico aislado también está sustancialmente libre de secuencias que naturalmente flanquean el ácido nucleico (es decir, las secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) del que se deriva el ácido nucleico. El término "ácido nucleico" pretende incluir ADN y ARN y puede ser bicatenario o monocatenario, y representa la cadena sentido o antisentido. Además, el término "ácido nucleico" incluye las secuencias de ácido nucleico complementarias.

El término "aminoácido" incluye todos los aminoácidos naturales, así como los aminoácidos modificados.

El término "polipéptidos aislados" se refiere a un polipéptido sustancialmente libre de material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente.

Las secuencias de ácido nucleico variantes incluyen secuencias de ácido nucleico que hibridan con las secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento en condiciones de hibridación al menos moderadamente rigurosas, o que tienen al menos un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 % o un 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento.

El término "variante", como se usa en el presente documento, incluye modificaciones o equivalentes químicos de las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos divulgadas en el presente documento que realizan sustancialmente la misma función que los polipéptidos o moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento sustancialmente de la misma manera. Por ejemplo, las variantes de polipéptidos divulgados en el presente documento incluyen, sin limitación, sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las variantes de polipéptidos también incluyen adiciones a y deleciones de las secuencias de polipéptidos divulgadas en el presente documento. Además, las secuencias variantes incluyen análogos y derivados de las mismas.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos quiméricos. El anticuerpo puede ser de fuentes recombinantes y/o producido en animales transgénicos. El término "fragmento de anticuerpo", como se usa en el presente documento, pretende incluir, sin limitación, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos y multímeros de los mismos, fragmentos de anticuerpos multiespecíficos y dominios de anticuerpos. Los anticuerpos se pueden fragmentar usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ se pueden generar tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede dar lugar a la formación de fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y otros fragmentos también se pueden sintetizar mediante técnicas recombinantes.

El anticuerpo o fragmentos de anticuerpo descritos en el presente documento también incluyen variantes funcionales de las secuencias, de modo que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a la proteína HA.

En determinadas opciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende toda o una porción de una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM o IgD. En una opción, la región constante de cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de IgG1. Además, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender toda o una porción de una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda. En una opción, la región constante de cadena ligera es una región constante de cadena ligera kappa.

Como se describe en el presente documento, para producir anticuerpos monoclonales humanos, las células productoras de anticuerpos (linfocitos) se pueden recoger de un humano infectado por gripe y a continuación se pueden usar para producir anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, se pueden fusionar con células de mieloma mediante procedimientos estándar de fusión de células somáticas, inmortalizando por tanto estas células y proporcionando células de hibridoma. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica (por ejemplo, la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (Nature 256:495-497 (1975)), así como otras técnicas tal como la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor et al. Immunol. Today 4:72 (1983)), la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al. Methods Enzymol, 121:140-67 (1986)) y el cribado de colecciones de anticuerpos combinatorios (Huse et al. Science 246:1275 (1989)). De forma alternativa, se pueden usar procedimientos que copian los genes que codifican los anticuerpos producidos por linfocitos B individuales, por ejemplo, el procedimiento de anticuerpos de linfocitos seleccionados (Babcook et al. 1996). Estos procedimientos se pueden usar para cribar anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con la hemaglutinina.

Los anticuerpos específicos, o fragmentos de anticuerpos, reactivos contra el antígeno de hemaglutinina o la región del tallo de la misma también se pueden generar cribando colecciones de expresión que codifican genes de inmunoglobulina, o porciones de los mismos, expresados en bacterias con componentes de la superficie celular. Por ejemplo, los fragmentos Fab completos, las regiones VH y las regiones FV se pueden expresar en bacterias usando colecciones de expresión de fagos (véase, por ejemplo, Ward et al. Nature 341:544-546 (1989); Huse et al. Science 246:1275- 1281 (1989) y McCafferty et al. Nature 348:552-554 (1990)).

El término "región determinante de complementariedad de cadena ligera", como se usa en el presente documento, se refiere a regiones de hipervariabilidad dentro de la región variable de cadena ligera de una molécula de anticuerpo. Las regiones variables de cadena ligera tienen tres regiones determinantes de complementariedad denominadas región determinante de complementariedad 1 de cadena ligera, región determinante de complementariedad 2 de cadena ligera y región determinante de complementariedad 3 de cadena ligera desde el extremo amino hasta el extremo carboxílico.

El término "región variable de cadena ligera", como se usa en el presente documento, se refiere a la región variable de una cadena ligera.

El término "región determinante de complementariedad de cadena pesada", como se usa en el presente documento, se refiere a regiones de hipervariabilidad dentro de la región variable de cadena pesada de una molécula de anticuerpo. La región variable de cadena pesada tiene tres regiones determinantes de complementariedad denominadas región determinante de complementariedad 1 de cadena pesada, región determinante de complementariedad 2 de cadena pesada y región determinante de complementariedad 3 de cadena pesada desde el extremo amino hasta el extremo carboxílico.

El término "región variable de cadena pesada", como se usa en el presente documento, se refiere a la región variable de una cadena pesada.

La divulgación también proporciona composiciones que comprenden las CDR en un marco apropiado, regiones variables y/o anticuerpos divulgados en el presente documento con un excipiente, vehículo, tampón o estabilizador farmacéuticamente aceptables.

Además, en el presente documento se proporcionan procedimientos y usos de las CDR en un marco apropiado, regiones variables y/o anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de los mismos divulgados en el presente documento para proteger contra la infección por el virus de la gripe o tratar una infección por el virus de la gripe en un sujeto. En una opción, la divulgación proporciona un procedimiento para proteger contra la infección por el virus de la gripe o tratar una infección por el virus de la gripe en un sujeto que comprende la administración a un sujeto de las CDR en un marco apropiado, regiones variables y/o anticuerpos o fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento. También se proporciona el uso de las CDR en un marco apropiado, regiones variables y/o anticuerpos o fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento para proteger contra la infección por el virus de la gripe o tratar una infección por el virus de la gripe en un sujeto. Además, se proporciona el uso de las CDR en un marco apropiado, regiones variables y/o anticuerpos o fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento para preparar un medicamento para proteger contra la infección por el virus de la gripe o tratar una infección por el virus de la gripe en un sujeto. Aún más, se proporcionan las CDR en un marco apropiado, regiones variables y/o anticuerpos o fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento para uso en la protección contra la infección por el virus de la gripe o el tratamiento de una infección por el virus de la gripe en un sujeto.

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente divulgación:

Ejemplos

Se usaron tres enfoques para generar anticuerpos monoclonales humanos (mAb) que reaccionaran con HA del ectodominio soluble del virus de la gripe nH1N1 (HA snH1) (Figura 1). En primer lugar, los anticuerpos se clonaron al azar a partir de plasmoblastos (PB) recién generados que circulaban por la sangre de pacientes recientemente infectados. Este enfoque se basó en observaciones de que, ~7 días después de la vacunación, aparecen en la sangre los PB que secretan anticuerpos específicos para la vacuna (Barrington et al. 1990; Heilmann et al. 1987) y forman una fracción significativa de los PB totales (Odendahl et al. 2005; Wrammert et al. 2008), y en técnicas que el autor de la presente invención había usado previamente para obtener anticuerpos monoclonales de PB sanguíneos mediante RT-PCR y clonación y expresión del ADN que codifica el sitio de unión al antígeno (Babcock et al. 1996). En ausencia de datos sobre la cinética de entrada de PB específicos de infección en la sangre durante las infecciones, se recogió sangre de los sujetos con infecciones por nH1N1 confirmadas en laboratorio ~7 días después de la aparición de los síntomas, y se usó la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para purificar los PB individuales. A partir de estos, se clonaron 8 mAb y se expresaron como moléculas de IgG1 (Babcock et al. 1996; McLean et al. 2005), encontrando que 4 se unían a una forma soluble recombinante del ectodominio trimérico del HA de nH1N1 (HA snH1), (Tabla 1a, y el ejemplo de mAb 14-128 en la Figura 2). Sorprendentemente, dada la naturaleza antigénica novedosa o única de la HA nH1, estos 4 anticuerpos también se unieron todos a la vacuna contra la gripe estacional actual (Tabla 1a y ejemplo de mAb 14-128 en la Figura 2A). En el segundo enfoque, usando muestras de sangre similares, los anticuerpos que expresan PB individuales se purificaron por FACS usando HA snH1 marcadas con fluorocromos aprovechando el hecho de que los PB recién generados expresan su inmunoglobulina en su superficie (Odendahl et al. 2005; Nossal et al. 1972). Se generaron 5 mAb que se unieron a HA snH1 y 3 de ellos también se unieron a la vacuna contra la gripe estacional. Por tanto, se generaron un total de 9 mAb contra HA snH1 a partir de PB sanguíneos de 3 pacientes (Tabla 1a), lo que demuestra que, durante una infección, al menos algunos de los PB recién generados entran en la sangre y no todos permanecen en los tejidos linfoides cerca del sitio de la infección. También se generaron 16 mAb adicionales a partir de PB de unión a HA snH1 de sujetos vacunados con la vacuna contra nH1N1. Sorprendentemente, del total de 25 mAb generados a partir de PB de sujetos infectados o vacunados, todos menos uno, V4-17, presentaron reacción cruzada con la vacuna contra la gripe estacional y la HA H5 recombinante purificada y, por tanto, también presentaron reacción cruzada o fueron heterosubtípicos (Tabla 1a; Fig. 2A). En un tercer enfoque, las muestras de sangre se recogieron 2 a 8 semanas después de la recuperación de la infección o la vacunación contra la gripe pandémica de 2009 (H1N1) y se usó FACS para purificar los linfocitos B de memoria de clase cambiada de unión a HA snH1 individuales que se expandieron y diferenciaron a clones de PB como anteriormente (McLean et al. 2005). De los 23 mAb contra HA snH1 generados a partir de los linfocitos B de memoria de esta manera, todos presentaron reacción cruzada con la vacuna contra la gripe estacional y la HA H5 recombinante purificada y, por tanto, fueron heterosubtípicos (Tabla 1B; mAb representativos en la Figura 2A y 2E, F).

- En total, de 5 sujetos infectados y 3 vacunados, se generaron 48 mAb recombinantes que se unieron a HA snH1, y todos menos uno presentaron reacción cruzada con la vacuna contra la gripe estacional actual y la HA H5 recombinante purificada (Tabla 1). La alta frecuencia de mAb heterosubtípicos no se debió al hecho de que se usó HA snH1 recombinante para clasificar los PB o los linfocitos B de memoria, ya que los 4 mAb de unión a HA snH1 generados a partir de los PB seleccionados aleatoriamente también se unieron a la vacuna contra la gripe estacional y la HA H5 recombinante purificada (Tabla 1A). Además, los epítomos unidos por los mAb estaban presentes en el virus nH1N1 inactivado y descompuesto por detergente, ya que los 48 mAb también se unieron a la vacuna contra nH1N1 y 47 también se unieron a la vacuna contra la gripe estacional de 2009/2010 y la HA H5 recombinante purificada (Tabla 1; ejemplos en la Figura 2A y 2E, F).
- Sorprendentemente, el 52 % de los mAb anti-HA snH1, derivados de sujetos infectados (44 %) o vacunados (57 %), o PB (40 %) o linfocitos B de memoria (65 %), usaron un gen V, *IGHV1-69* (Tabla 1; Fig. 2B). *IGHV1-69* se expresa normalmente en de un 3,6 % a menos de un 5 % de los linfocitos B (de Wildt et al. 1999; Sasso et al. 1996). Cuando se obtuvieron múltiples mAb del mismo sujeto, la respuesta a la infección por o vacunación contra nH1N1 fue clonalmente diversa, aunque V4 tuvo dos mAb contra el tallo de HA que se derivaron del mismo clonotipo de linfocitos B. La sorprendente excepción fue un sujeto V2 (Tabla 1) que no produjo un anticuerpo monoclonal usando *IGHV1-69*, como se analiza a continuación. En el sujeto V3, 12 de los 14 mAb derivados de linfocitos B de memoria usaron *IGHV1-69*, pero todos fueron diferentes con diferentes genes *IGHD* e *IGHJ* y usaron una variedad de genes V de cadena L. *IGHV1-69* se usó preferentemente en fragmentos variables monocatenarios recombinantes (scFv) seleccionados de colecciones de presentaciones de fagos de genes de inmunoglobulina humana usando la HA de gripe aviar H5N1 (Ekiert et al. 2009; Sui et al. 2009; Throsby et al. 2008; Kashyap et al. 2008). *IGHV1-69* codifica los rasgos característicos principales de un sitio de unión para un sitio en el tallo de HA que está altamente conservado en una variedad de subtipos de gripe (Ekiert et al. 2009; Sui et al. 2009). Esta conservación refleja las limitaciones estructurales del tallo de HA, que se somete a cambios conformacionales irreversibles inducidos por pH cuando se endocitosa el virus y se encuentra con el bajo pH en el endosoma (pH ~5) (Wiley et al. 1987). Esta conformación del tallo de HA media en la fusión de las membranas vírica y endosomal, permitiendo que el genoma vírico entre en el citosol. La unión de estos scFv previno este cambio conformacional en el tallo de HA y da como resultado la neutralización de la infecciosidad de múltiples subtipos de gripe (Ekiert et al. 2009; Sui et al. 2009). Esto planteó la posibilidad de que se pudieran inducir anticuerpos similares con una vacuna que protegería contra múltiples subtipos de gripe.
- Los datos actuales muestran que los anticuerpos que se unen a la HA de múltiples cepas o subtipos de virus de la gripe, incluidos los que usan *IGHV1-69*, pueden ser producidos fácilmente por los humanos en respuesta a una infección por o vacunación contra la gripe nH1N1, que es una hemaglutinina única para la mayoría de los humanos, y puede dominar la respuesta de anticuerpos. En el trabajo en curso en otro sujeto que fue vacunado con la vacuna contra nH1N1 no adyuvada, se generó el primer mAb de un PB de unión a HA snH1 y presentaba reacción cruzada o era heterosubtípico y usaba *IGHV1-69*.
- La mayoría de los mAb heterosubtípicos se unieron al tallo de HA, pero otros se unieron a la cabeza de HA. Para someter a prueba si el epítomo estaba en el tallo de HA o en la cabeza, se usaron 3 enfoques. Para someter a prueba si el epítomo unido por un mAb estaba en el tallo de HA, se usaron dos ensayos. Uno fue la inhibición de la unión a HA de C179, un anticuerpo que se sabía que se unía a un epítomo conservado en el tallo de HA (Okuno et al. 1993). El segundo ensayo fue si el epítomo seleccionado por el mAb se vio afectado por el tratamiento a pH 5 bajo, que induce un cambio conformacional irreversible en el tallo (Wiley et al. 1987). Para someter a prueba si el epítomo estaba en la cabeza de HA, cerca del sitio de unión al receptor, se sometió a prueba si los mAb podían inhibir la hemaglutinación por nH1N1. Los mAb que usaban *IGHV1-69* unido a un epítomo en el tallo de HA se confirmaron mostrando que inhibían completamente la unión de C179 a la vacuna contra nH1N1 (Figura 2C, gráfico superior). Otro mAb heterosubtípico 15-52, que usaba *IGHV1-18*, también inhibió la unión a C179 y, por tanto, se unió al tallo de HA (Figura 2C). Adicionalmente, el tratamiento a pH bajo disminuyó la unión de los mAb que usan *IGHV1-69* selectivamente en comparación con otro mAb heterosubtípico V2-36 que usaba *IGHV4-39* (Figura 2C, gráfico inferior). Los mAb que usaban *IGHV1-69* no inhibieron la hemaglutinación por el virus nH1N1 (Figura 2D), lo que es consecuente con la unión de estos mAb al tallo en lugar de la cabeza de HA. Por el contrario, V2-36, que usaba *IGHV4-39* y V4-12, inhibió la hemaglutinación por nH1N1 (Figura 2D), lo que indica que se unieron a la cabeza del HA de nH1N1 y no al tallo. Todos estos mAb contra el tallo de HA, tanto el 52 % que usa *IGHV1-69* como el 6 % que usa otros genes *IGHV* se unieron todos a la vacuna contra H1N1 pandémico producida de manera convencional y a la vacuna contra la gripe estacional de 2009/2010 (Fig. 2A y Tabla 1). Por tanto, las vacunas contra la gripe convencionales mostraron el epítomo conservado en el tallo de HA al que se unieron estos anticuerpos heterosubtípicos contra el tallo de HA. Se concluyó a partir de estos datos que las vacunas contra la gripe preparadas de manera convencional presentaban el epítomo conservado en el tallo de HA, así como los epítomos en la cabeza de HA reconocidos por los mAb que inhibían la hemaglutinación, tal como el V2-36. Esto se opuso a la opinión predominante de que el epítomo conservado en el vástago de HA estaba de alguna manera oculto en el virus de la gripe infecciosa o en las vacunas (Chen et al. 2009; Corti et al. 2010; Sui et al. 2009; Steel et al. 2010).
- El autor de la presente invención obtuvo 9 mAb que usaban *IGHV4-39*, y todos inhibieron la hemaglutinación, lo que sugiere que se unieron a un epítomo en la cabeza de HA. Ocho de ellos se obtuvieron de un sujeto, V2, que presentó una respuesta oligoclonal con 7 pertenecientes al mismo clonotipo (que comprende V2-36, V2-2, V2-3, V2-4, V2-7, V2-11 y V2-38). Otro mAb de este donante, V2-12, también usaba *IGHV4-39*, pero combinado con diferentes genes

IGHD e IGJ y un gen V de cadena L diferente. Los mAb que usaban *IGHV4-39* dominaron la respuesta en este donante, ya que el único otro mAb obtenido de este donante usaba otro gen *IGHV*. Otro mAb que usaba *IGHV4-39*, V4-17, se obtuvo de otro donante, V4, y se unió a la cabeza de HA, ya que inhibió la hemaglutinación y no pudo inhibir la unión de C179 (Figura 2C). Aunque no se unió a la vacuna contra la gripe estacional de 2009/2010, como se analiza a continuación, las pruebas de que V4-17 tenía 19 mutaciones en *IGHV4-39* indicaron que el PB fue generado por la HA a partir de nH1N1 que estimulaba un linfocito B de memoria que había sido previamente inducido por infección por o vacunación contra un virus de gripe estacional H1N1 (que difirió en ese epítipo con respecto al virus de la gripe H1N1 en la vacuna contra la gripe estacional de 2009/2010). Por tanto, es probable que V4-17 tenga también reacción cruzada y tenga reactividad con un virus de gripe estacional H1N1 al que haya estado expuesto previamente.

Dado que se ha demostrado que *IGHV1-69* que usa mAb se une a la HA de los virus H5N1, se sometió a prueba la capacidad de algunos de los mAb de unirse a células que expresan la HA H5 de longitud completa de la gripe aviar altamente patógena A Hong Kong 156/97 (H5N1) (Figura 2E, F). Los mAb que usan *IGHV1-69* (Figura 2E, F), así como otros mAb heterosubtípicos que usan otros genes *IGHV*, tal como V3-1E8 y 15-52, se unieron a la HA H5. Por el contrario, V2-36 y V4-17, que reconocen epítipos en la cabeza de HA nH1, se unieron solo débilmente a la HA H5 de Hong Kong 156/97 (H5N1) (Figura 2F). También se encontraron niveles significativos de anticuerpos que se unían a las células que expresan HA H5 en plasma de convaleciente de pacientes infectados por nH1N1 y en sujetos vacunados 7 días después de la vacunación (Figura 2F). Todos los mAb, con la única excepción de V4-17, fueron reactivos en ELISA con HA H5 recombinante purificada (A/Vietnam/1203/2004, Clado e1) (Figura 2A), Tabla 1.

32 de los mAb se sometieron a prueba para determinar su capacidad para neutralizar la infecciosidad del nH1N1 en el ensayo estándar de microneutralización de la OMS. Solo dos de los mAb que fueron sometidos a prueba (V2-36 y V4-17) neutralizaron la infecciosidad de nH1N1. Solo V2-36 neutralizó el virus de la gripe estacional A/Brisbane/59/07 (H1N1), lo que es consecuente con la falta de unión de V4-17 a la vacuna contra la gripe estacional (Figura 2A). V2-36 y V4-17 fueron los únicos mAb de los 32 sometidos a prueba que inhibieron la hemaglutinación. Se razonó que el ensayo estándar estaba sesgado a mAb que se unían a epítipos en la cabeza de HA porque inhibían la unión vírica. Por tanto, en el ensayo estándar de microneutralización, las mezclas de mAb y el virus de exposición solo estuvieron en contacto con las células durante 2 a 3 horas, después de lo cual se eliminaron. Esto se debió a que el ensayo se diseñó para evaluar anticuerpos neutralizantes en suero humano y la eliminación del suero (pero no de los mAb purificados) fue necesaria para permitir que la TPCK-tripsina incluida en el medio activara el virus al escindir la HA (Klenk et al. 1975). Dado que los mAb que se unen al tallo de HA no inhibirán la unión vírica y se eliminarán por lavado después de 3 horas de incubación con la mezcla anticuerpo-virus, el ensayo se modificó dejando el virus y los mAb durante toda la duración del ensayo. En estas condiciones, que imitan la presencia constante de anticuerpos en una infección *in vivo*, la mayoría de los mAb que se unieron al tallo de HA presentaron actividad neutralizadora contra el virus nH1N1 (Figura 3A). Los 10 mAb que usan *IGHV1-69* sometidos a prueba en el ensayo modificado neutralizaron completamente el nH1N1 a concentraciones de 78-2500 ng/ml. Muchos neutralizaron el virus de la gripe estacional A/Brisbane/59/07 (H1N1). El mAb V3-1B9 que usa *IGHV3-11* y el mAb I14-2B7 que usa *IGHV1-18*, también neutralizaron completamente el nH1N1 a 625 ng/ml y 1250 ng/ml, respectivamente. Sin embargo, en este panel de mAb, el neutralizador más potente fue V2-36, que se unió a la cabeza de HA e inhibió completamente la infecciosidad a menos de 40 ng/ml. El segundo fue V3-2G6, que la neutralizó completamente a menos de 80 ng/ml.

La capacidad de los mAb seleccionados para neutralizar la infecciosidad del virus de la gripe aviar altamente patógena A/Goose/Ger/R1400/07 (H5N1) se sometió a prueba y se observó una buena correlación entre la unión a HA H5 (Figura 2F) y la neutralización de la infecciosidad de H5N1 (Figura 3B), con V2-36 que no logra neutralizar la infecciosidad del H5N1. Como se esperaba (Sui et al. 2009; Throsby et al. 2008), estos mAb que usan *IGHV1-69* no neutralizaron la infecciosidad de un virus H7N7 (Figura 4). Además, el plasma de sujetos infectados por (114) o vacunados (V2) contra nH1N1 también neutralizó la infecciosidad de H5N1 (Figura 3B). Estos mAb inhibieron la fusión célula-célula mediada por la expresión en la superficie celular de HA de longitud completa de gripe A/Hong Kong/156/97 (H5N1) (Sui et al. 2009) (Figura 3C). Por tanto, se llegó a la conclusión de que los humanos infectados por o vacunados contra nH1N1 producen anticuerpos de protección cruzada que se pueden unir a la HA de diferentes subtipos de virus y pueden neutralizar los virus de gripe nH1N1 pandémico, H1N1 estacional y de gripe aviar H5N1 altamente patógeno.

¿La HA nH1 indujo la producción de estos mAb heterosubtípicos activando un linfocito B indiferenciado o un linfocito B de memoria generado en una exposición previa a virus de la gripe? Especialmente en el caso de los mAb generados a partir de PB recolectados ~7-10 días después de la infección o la vacunación (por ejemplo, 15-24, V4-29), un gran número de mutaciones somáticas sugeriría que la HA nH1 ha activado de forma cruzada un linfocito B de memoria preexistente. De hecho, un inaudito 52 % de los mAb generados a partir de PB tenía genes *IGHV* con más de 28 mutaciones, lo que significa que más del 10 % de sus nucleótidos estaban mutados. La mediana del número de mutaciones en mAb de PB fue de 29. Esto se compara con la tasa promedio de mutaciones del centro germinal humano o de los linfocitos B de memoria de 13,6 +/- 4,8 (Wrammert et al. 2008). En total, los mAb anti-HA nH1 de PB tuvieron una frecuencia significativamente mayor de mutaciones en el gen *IGHV* que los de los linfocitos B de memoria (mediana de número de mutaciones de 15,5) (Figura 5A) y ninguno de los linfocitos B de memoria

tuvo más del 10 % de los nucleótidos en *IGHV* mutados. Esto es consecuente con las pruebas de que los PB murinos producen anticuerpos de mayor afinidad que los linfocitos B de memoria (Smith et al. 1997). En base a los hallazgos presentes, se predijo que los linfocitos B de memoria de alta afinidad no circularán por la sangre hasta que el antígeno retenido se haya eliminado de los ganglios linfáticos porque este antígeno los activará respecto a PB.

5 Es probable que esos anticuerpos de reacción cruzada o heterosubtípicos que habían acumulado un gran número de mutaciones somáticas en el gen *IGHV* se hubieran generado por la activación por la HA de nH1N1 de linfocitos B de memoria que habían sido inducidas por el contacto previo con el virus de la gripe estacional. Esta noción está respaldada por un artículo que muestra que la vacunación contra la gripe estacional expandió en algunos sujetos una pequeña población de linfocitos B de memoria que producen anticuerpos heterosubtípicos que usaron *IGHV1-69* (Corti et al. 2010). Sin embargo, en contraste con la respuesta a una HA única, como en la infección por o
 10 vacunación contra nH1N1 divulgada en el presente documento, la respuesta heterosubtípica informada en Corti et al. (2010) fue débil y solo se observó en algunos individuos. De hecho, lo comentaron Corti et al., sus observaciones plantean la cuestión de la eficacia de los anticuerpos heterosubtípicos inducida por las vacunas contra la gripe, ya que "incluso en individuos con alta respuesta, los anticuerpos heterosubtípicos difícilmente alcanzan
 15 concentraciones neutralizantes eficaces en el suero". Consecuente con la inducción de niveles bajos de anticuerpos heterosubtípicos por la gripe estacional, un bajo porcentaje de sueros europeos (García et al. 2009) o preparaciones de gamma-globulina humana combinadas contienen niveles bajos de anticuerpos contra la HA H5N1 (Lynch et al. 2009). Los mAb humanos generados antes de la pandemia de 2009 que se unen al tallo de HA pueden neutralizar el nH1N1 (Burioni et al. 2010) y la vacunación contra la gripe estacional induce un incremento en los títulos de neutralización contra H5N1 (Gioia et al. 2008) y el número de linfocitos B de memoria que producen anticuerpos que se unen a HA H5 (Corti et al. 2010). Además, en un sujeto que se vacunó contra nH1N1, antes de la vacunación existían niveles de anticuerpos que se unían a células que expresaban HA H5 que se habían incrementado 7 días después de la vacunación (Figura 5B). Una minoría de los mAb que presentaron pequeñas cantidades de mutaciones somáticas se derivaron en última instancia de linfocitos B indiferenciados que fueron activados por
 25 nH1N1, ya sea directamente generados por PB (I4-112, I5-52 o I4-128 con 5, 11 o 13 mutaciones) o por linfocitos B de memoria (por ejemplo, I4-1G8, I14-B7, V3-3B3, V3-2C3 o V3-2C2 con 3, 5, 6, 6 y 9 mutaciones). Estos mAb sugieren, sin desear estar limitados por ninguna teoría, que la respuesta principal inicial a una hemaglutinina de gripe única antigénicamente distinta y desconocida presenta reacción cruzada o es heterosubtípica. Dado que la respuesta de memoria a la gripe estacional está dominada por un número limitado de clonotipos de anticuerpos específicos de subtipo (Wrammert et al. 2008), con las subsiguientes exposiciones a hemaglutininas levemente mutadas ("deriva antigénica"), estos linfocitos B de memoria iniciales de reacción cruzada o heterosubtípicos son superados rápidamente por los linfocitos B de memoria específicos de cepas de mayor afinidad generados por maduración de afinidad.

El autor de la presente invención sometió a prueba el potencial terapéutico de estos mAb en el tratamiento de infecciones graves por nH1N1 en ratones a los que se administró una dosis letal de un aislado humano del virus nH1N1. El mAb V2-36 se administró 24 horas después de la infección de los ratones. Mientras que 5/5 ratones del grupo de control tratado solo con solución salina murieron, los 5 ratones tratados con una única inyección de 180 µg (~6 mg/kg) de V2-36 24 horas después de la infección de los ratones sobrevivieron (Fig. 6). Una dosis única de 200 µg de V2-36 administrada 48 horas después de la infección todavía tuvo un efecto terapéutico (Fig. 7). También se muestran en la Fig. 7 los efectos terapéuticos en ratones con una infección letal de virus de la gripe de 300 µg de V3-2G6, 15-24, 14-128, V3-3D2, V3-1G10 e I8-1B6 y una mezcla de V2-36 e I5-24.

Para someter a prueba si un mAb heterosubtípico contra el tallo de HA generado a partir de un sujeto vacunado, V3-2G6, tuvo efectos terapéuticos tras una infección letal con gripe aviar H5N1, se infectaron grupos de ratones con un virus de gripe H5N1 heterólogo y se les administró una inyección intraperitoneal única de 150 µg o 300 µg de V3-2G6 24 horas después de la infección intranasal (Figura 8A). A un 3^{er} y 4^o grupo de ratones que fueron tratados con V3-2G6 se les administró una dosis única de 300 µg o 600 µg 48 horas después de la infección (Figura 8A). Hubo un 100 % de supervivencia en todos los grupos de tratamiento, aunque los ratones tratados 48 horas después estaban gravemente enfermos, como lo demuestra su pérdida de peso. Para someter a prueba la dosis mínima necesaria para un efecto terapéutico de protección cruzada en infecciones letales por gripe H5N1, se infectaron grupos de ratones con un virus de gripe H5N1 heterólogo y se les administró una inyección intraperitoneal única de 150 µg o 75 µg o 37,5 µg de V3-2G6 24 horas después de la infección intranasal (Figura 8B). Como se puede observar, 37,5 µg de V3-2G6 solo curaron al 80 % de los ratones que recibieron una infección letal con el virus de la gripe H5N1, pero los ratones tratados con 75 µg, aunque todos sobrevivieron, tuvieron una mayor pérdida de peso en comparación con el grupo tratado con 150 µg.

Para someter a prueba si un mAb heterosubtípico contra el tallo de HA generado a partir de un sujeto vacunado, V3-2G6, protegió a los ratones de una dosis letal de un virus de la gripe H5N1 heterólogo, se trataron grupos de ratones con dosis graduadas de V3-2G6 y, 24 horas después, se infectó a los ratones por vía intranasal. V3-2G6 fue muy potente. Ambas dosis, 15 µg y 5 µg (250 µg/kg y 750 µg/kg), protegieron contra la muerte por infección con H5N1, y la dosis de 750 µg/kg protegió contra cualquier pérdida de peso (Figura 9).

60 A continuación, se preguntó si la respuesta dominante de anticuerpos de protección cruzada en linfocitos B de memoria inducida por la vacunación con la vacuna contra pdmH1N1 estaba correlacionada con los anticuerpos circulantes de protección cruzada en plasma humano. La capacidad del plasma del donante V3 tomado 14 días y un

año después de la vacunación para proteger a los ratones contra una infección letal se sometió a prueba con la gripe H5N1 (Figura 10). Como control se usó plasma de un joven adulto donante tomado en 2006, para garantizar que el sujeto no pudiera haber estado en contacto con el virus pandémico H1N1 de 2009. Se observó que 400 µl de plasma de V3 tomados 14 días después de la vacunación protegían completamente a los ratones contra una infección letal con gripe H5N1. 400 µl de plasma recogido un año después de la vacunación protegieron contra la muerte, pero hubo una pequeña pérdida de peso con la infección por H5N1. Sin embargo, una dosis tres veces superior de plasma humano protegió a los ratones contra una pérdida de peso significativa (Figura 10). Estos datos mostraron que, incluso un año después de la vacunación, el plasma humano confirió protección a ratones posteriormente infectados por el virus de la gripe H5N1.

¿Por qué los anticuerpos de protección cruzada deben dominar la respuesta a la HA de una gripe pandémica, pero no a la gripe estacional (Corti et al. 2010)? En la respuesta a un virus de gripe pandémica, los únicos linfocitos B de memoria que se unen a la HA con suficiente afinidad para diferenciarlos de un PB o inducirlos a sufrir una mutación somática en un centro germinal serán aquellos que producen anticuerpos heterosubtípicos que se unen a estructuras conservadas entre los subtipos víricos. En particular, los linfocitos T cooperadores se activan por epítomos compartidos entre subtipos víricos (Doherty y Kelso, 2008) y linfocitos B que se han activado por la unión a HA o los virus competirán para presentar estos epítomos a los linfocitos T (Allen et al. 2007). A este respecto, los linfocitos B de memoria activados por epítomos conservados en la HA nH1 tendrán múltiples ventajas competitivas con respecto a los linfocitos B indiferenciados que reconocen los rasgos característicos novedosos o únicos específicos de cepas en la cabeza de la HA pandémica. Los linfocitos B de memoria heterosubtípicos no solo son más numerosos, sino que poseen ventajas intrínsecas, incluyendo el incremento de la señalización y la expresión de proteínas que coactivan los linfocitos T (Tangye et al. 2009). Por tanto, en la respuesta a la gripe pandémica, los anticuerpos heterosubtípicos dominarán. En contraste, con la gripe estacional, un gran número de linfocitos B de memoria contra epítomos específicos de las cepas en la cabeza de HA se activan por interacciones de baja afinidad por la HA de cepas estacionales "derivadas" y entran en centros germinales para experimentar una maduración de afinidad (Paus et al. 2006). Allí compiten con los menos numerosos linfocitos B de memoria heterosubtípicos por la ayuda de los linfocitos T, superándolos, lo que explica la rareza y el nivel limitado de las respuestas de anticuerpos heterosubtípicos a la HA de la gripe estacional (Corti et al. 2010; García et al. 2009).

En solo uno de los sujetos, (V2), a partir del cual se generaron 9 mAb que se unieron a HA snH1, el autor de la presente invención no pudo encontrar un mAb que usara *IGHV1-69*. Claramente, los linfocitos B de V2 expresaron *IGHV1-69*, ya que se clonaron otros anticuerpos usando *IGHV1-69* en V2. Para obtener información sobre el mecanismo de la respuesta dominante al pdmH1N1 de los anticuerpos contra el tallo de HA, se analizó el sujeto excepcional, V2, con más detalle. Asumiendo que la frecuencia de mAb contra el tallo de HA que usaban *IGHV1-69* en las respuestas al pdmH1N1 era del 50 %, la probabilidad de obtener el resultado observado en V2 solo por casualidad era de 0,002 y, por tanto, improbable (Tabla 3). Se observaron similitudes entre la respuesta de anticuerpos de V2 a la vacuna contra nH1N1 y la respuesta de anticuerpos humanos típicos a la vacuna contra la gripe estacional. Así, 8 de los 9 mAb de V2 bloquearon la hemaglutinación y se dirigieron contra la cabeza de HA y 7 pertenecían al mismo clonotipo (Tabla 1). Además, estos mAb tenían muchas mutaciones y reaccionaron a la vacuna contra la gripe estacional, lo que indica que se derivaron de linfocitos B de memoria que se habían activado de forma cruzada por la HA de la vacuna contra nH1N1. Por tanto, en V2, la falta de una respuesta dominante de los anticuerpos que usan *IGHV1-69* a la vacuna contra nH1N1 se correlacionó con una respuesta de los anticuerpos contra la cabeza de HA, como la que se produce en la gripe estacional (Wrammert et al. 2008).

En este sujeto, V2, de 63 años de edad, los linfocitos B de memoria con reacción cruzada que usan *IGHV4-39*, la respuesta fue probablemente provocada por un virus relacionado con nH1N1 (Hancock et al. 2009). Consecuente con la noción de que los anticuerpos de reacción cruzada contra la cabeza de HA de la gripe estacional usan *IGHV4-39*, se aisló recientemente un anticuerpo heterosubtípico que reaccionó de forma cruzada con la cabeza de algunos virus de gripe estacional H1N1 y H5N1 y que también usaba *IGHV4-39* de un sujeto vacunado con la vacuna contra la gripe estacional (Corti et al. 2010). Estos linfocitos B de memoria activados contra la cabeza de HA, como en la gripe estacional, hubieran sido más competitivos físicamente (Schwickert et al. 2011) por la ayuda de los linfocitos T (Allen et al. 2007; Victora et al. 2010; Schwickert et al. 2011) que los linfocitos B de memoria raros contra el tallo de HA. V2 tenía más de 60 años de edad y, por su respuesta dominante de anticuerpos de reacción cruzada a la cabeza de HA con muchas mutaciones somáticas (Tabla 1), había estado claramente en contacto con un virus relacionado, como lo confirmaron Hancock et al. (2009). Por el contrario, en otros sujetos infectados por o vacunados contra pdmH1N1, en los que la cabeza de HA de nH1N1 se consideró como única, hubo una escasez de linfocitos B de memoria activados por la cabeza de HA de nH1N1. En ellos, esos linfocitos B de memoria raros contra el tallo de HA que tenían HA endocitosado de nH1N1 o viriones de nH1N1 (Russell et al. 1979), podían presentarse epítomos de linfocitos T compartidos entre subtipos víricos (Doherty et al. 2008) por linfocitos T cooperadores de memoria, sin competencia de los linfocitos B de memoria contra la cabeza de HA (Allen et al. 2007; Victora, et al. 2010; Schwickert et al. 2011). Incluso si unos pocos linfocitos B de memoria tuvieran baja afinidad por la HA de nH1N1, no competirían por la ayuda de los linfocitos T con los linfocitos B de memoria que producen anticuerpos de mayor afinidad contra el tallo de HA (Victora et al. 2010; Schwickert et al. 2011). Además, los linfocitos B de memoria contra el tallo de HA tendrían múltiples ventajas competitivas con respecto a los linfocitos B indiferenciados (Tangye et al. 2009). Por lo tanto, los anticuerpos contra el tallo de HA dominarán la respuesta de anticuerpos a una HA novedosa. Además, es poco probable que la naturaleza intrínseca del antígeno pdmH1N1 o

su presentación al sistema inmunitario (Wei et al. 2010b) fuera un factor en el predominio de la respuesta al pdmH1N1 de los anticuerpos contra el tallo de HA, ya que esto se produjo en nuestros estudios con sujetos tanto infectados por como vacunados contra nH1N1, que implican muchas diferencias en la presentación y la naturaleza del antígeno, el sitio de la respuesta inmunitaria y las respuestas inflamatorias asociadas.

5 **Análisis**

Los resultados actuales tienen implicaciones para la preparación rápida de agentes terapéuticos para pandemias emergentes y para la posibilidad de una vacuna de amplio espectro contra la gripe. En agosto de 2009, solo unos meses después de que comenzara el brote de nH1N1, el autor de la presente invención obtuvo el primer mAb terapéutico contra nH1N1 (14-128). Además, en principio, no existen razones técnicas ni regulatorias para que los anticuerpos monoclonales terapéuticos generados en humanos contra el virus de la gripe pandémica u otros patógenos emergentes no se deban desarrollar y desplegar rápidamente.

La vacuna contra nH1N1 preparada convencionalmente, así como la vacuna contra la gripe estacional, presentaron claramente el epítipo conservado reconocido por los mAb contra el tallo de HA, incluyendo los mAb que usan *IGHV1-69* (Figura 2A). Los mAb contra el tallo de HA se unieron tan fácilmente a las vacunas preparadas convencionalmente como los mAb que se unieron a la cabeza de HA e inhibieron la hemaglutinación, tal como V2-36 (Figura 2A). La vacuna contra nH1N1 se administró con el sistema adyuvante AS03. Sin embargo, se generaron dos mAb contra HA de nH1N1 a partir de un sujeto vacunado con una vacuna contra nH1N1 no adyuvada y uno de los mAb usaba *IGHV1-69*. Por lo tanto, es probable que la vacuna contra nH1N1 no adyuvada induzca una alta frecuencia de anticuerpos contra el tallo de HA. La vacunación humana con la vacuna contra nH1N1, que comprende una HA de gripe única para la mayoría de los humanos, indujo anticuerpos heterosubtípicos circulantes que, cuando se transfirieron a ratones, protegieron contra una infección letal con el virus de la gripe H5N1 heterólogo (Figura 10). La presente observación de una respuesta dominante de anticuerpos heterosubtípicos a la vacunación contra una gripe pandémica nH1N1 preparada de manera convencional respalda una novedosa estrategia de vacunación que evita deliberadamente la inducción de anticuerpos contra la cabeza de HA que normalmente protege contra las infecciones por gripe. Por ejemplo, la primera vacunación podría ser con un virus de gripe inactivado (o su HA) que tenga una cabeza de HA antigénicamente única para ese sujeto, tal como el nH1N1 pandémico. Después de un intervalo, esto podría ser seguido por la vacunación con un virus de gripe inactivado (o la HA) que comparte un epítipo conservado en el tallo de HA, pero tiene otra cabeza de HA antigénicamente única, tal como la de un virus de gripe que circula por otras especies como el virus de gripe aviar H5N1 o una HA mutada artificialmente. Al evitar la activación cruzada de los linfocitos B de memoria que producen anticuerpos con una unión de alta o baja afinidad por los epítopos en la cabeza de HA, que de otro modo superarían competitivamente a los raros linfocitos B de memoria heterosubtípicos que producen anticuerpos contra el tallo de HA conservado, esta estrategia garantiza una respuesta robusta de los anticuerpos heterosubtípicos de protección cruzada. Esto se logra en base a estos resultados con la vacuna contra nH1N1 pandémica, usando vacunas convencionales basadas en HA de virus de gripe que no han circulado en humanos. Un ejemplo es la actual vacuna aprobada para el virus de la gripe aviar H5N1. El refuerzo se debe realizar con otra cabeza de HA única, por ejemplo, la HA H7 aviar en el grupo 2 de subtipos de HA, con el fin de ampliar la gama de anticuerpos ampliamente protectores contra los virus de gripe del Grupo 2. Por tanto, el procedimiento actualmente divulgado de vacunación secuencial con hemaglutininas únicas permite la inducción de anticuerpos heterosubtípicos ampliamente protectores contra otros sitios conservados en virus de la gripe, tales como en el tallo del HA H3 (Wang et al. 2010) y también otros patógenos.

Recientemente, Wrammert et al. (2011) informaron de resultados muy similares de anticuerpos monoclonales (mAb) generados a partir de humanos infectados por gripe pandémica H1N1. Así, 5 de los 15 mAb contra HA (30 %) generados en 3 de las 4 personas infectadas por gripe pandémica H1N1 eran contra el tallo de HA y neutralizaron una amplia gama de virus de gripe H1N1. Además, Wrammert et al. (2011) observaron que 4 de los anticuerpos monoclonales (dos de los cuales eran un par clonal) de 2 sujetos usaron *IGHV1-69*. Encontraron que un total de 11 de los 15 anticuerpos monoclonales contra la hemaglutinina de nH1N1 neutralizaron la gripe pandémica H1N1, de los cuales 5 eran contra el tallo de la hemaglutinina. Solo dos anticuerpos neutralizaron específicamente el virus H1N1 pandémico y no neutralizaron los virus de gripe estacional H1N1. Por tanto, el 82 % de los 15 anticuerpos monoclonales que neutralizaron la gripe pandémica también neutralizaron varios virus de gripe H1N1 estacional. Wrammert et al. (2011) también encontraron que existía un gran número de mutaciones somáticas en el gen *IGHV* de los anticuerpos monoclonales y concluyeron que la mayoría de los anticuerpos contra la gripe pandémica tenían reacción cruzada y se generaron a partir de linfocitos B de memoria inducidos por virus de o vacunas contra gripe estacional y dijeron que si esto *"es cierto, será importante caracterizar la eficacia de la vacuna contra H1N1 pandémico para inducir una respuesta similar de protección cruzada"*. La noticia de sus hallazgos provocó un amplio interés público y científico en sus novedosas implicaciones para la perspectiva de una "vacuna universal contra la gripe". Por tanto, Settembre et al. (2011) concluyeron que *"Ahora parece que la infección secuencial por cepas de virus que comparten un epítipo neutralizante conservado en un contexto de cambio antigénico significativo puede promover la producción de anticuerpos contra ese epítipo conservado. Dichas exposiciones secuenciales deberían promover un mayor abanico de inmunidad"*. Recientemente se ha informado sobre el aislamiento de un anticuerpo monoclonal humano de un humano vacunado con la vacuna contra la gripe estacional que protege de forma cruzada contra la mayoría de los virus del subtipo de hemaglutinina del Grupo 2, incluyendo los virus H3N2 y H7N7 (Ekiert et al. 2011). Esto apoya adicionalmente que existen sitios conservados en el tallo de hemaglutinina en los virus del Grupo 2 (Wang et al. 2010) y es una prueba más de que nuestra divulgación de la vacunación con inmunizaciones

sucesivas de hemaglutininas únicas e "desconocidas" del Grupo 2, como los virus de la gripe aviar del Grupo 2, puede dar como resultado la circulación de anticuerpos de protección cruzada contra los virus del Grupo 2.

Adicionalmente, los resultados actuales muestran que las pruebas de microneutralización estándar y el ensayo de inhibición de la hemaglutinación son inadecuados para monitorizar el grado de protección en suero inducido por esta estrategia de vacunación.

Para concluir, el autor de la presente invención ha demostrado que los humanos pueden responder a una infección por o vacunación contra un virus de la gripe con una hemaglutinina única al generar PB y linfocitos B de memoria que producen anticuerpos de protección cruzada contra HA, incluyendo aquellos que usan *IGHV1-69* que codifica en la línea germinal, residuos de aminoácidos que producen contactos clave con un epítipo conservado en HA de muchos subtipos de gripe (Ekiert et al. 2009; Sui et al. 2009). Por tanto, cuando se toma la precaución de evitar la activación de los linfocitos B de memoria específicos de la cepa, la mayoría de los sujetos son capaces de producir dichos anticuerpos protectores de reacción cruzada o heterosubtípicos, proporcionando una vacuna de amplio espectro contra la gripe.

La presente divulgación muestra que la vacuna contra nH1N1, preparada usando el molde usado para la preparación de vacunas convencionales contra la gripe estacional cada año y administradas de manera segura a millones de seres humanos, puede inducir niveles sin precedentes de anticuerpos heterosubtípicos protectores contra el tallo de la hemaglutinina.

Además, entre los expertos en la técnica, existe un gran conocimiento de la producción de la proteína gp140 o de los vectores víricos que expresan los inmunógenos gp160 que son capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra el VIH-1, aunque contra un número limitado de aislados del VIH-1 (Karlsson Hedstam et al. 2008; Kwong y Wilson 2009 y Rerks-Ngarm et al. 2009). El uso actual de estas proteínas gp140 o ADN o vectores víricos que expresan gp160 en vacunas contra el VIH-1 implica la inmunización repetida con gp140 o gp160 del mismo o un aislado similar de VIH-1. El fundamento es que los anticuerpos ampliamente neutralizantes son muy raros y tienen muchas mutaciones somáticas y tienen estructuras inusuales que hacen necesaria una inmunización prolongada con el mismo antígeno o antígenos similares (por ejemplo, con una proteína gp140 y un ADN o vector vírico que exprese una gp160 similar) (Karlsson Hedstam et al. 2008; Kwong y Wilson 2009 y Rerks-Ngarm et al. 2009). Por el contrario, la presente divulgación enseña que se puede estimular una respuesta dominante de anticuerpos ampliamente neutralizantes contra el virus de la gripe en humanos con vacunación con un antígeno único, en este caso, HA. Esto contrasta notablemente con la débil y baja respuesta del anticuerpo heterosubtípico a la vacunación repetida con versiones desviadas de la gripe estacional (Corti et al. 2010 y Wrammert et al. 2011). Por tanto, los antígenos de gp140 o gp160 de VIH-1 que son diferentes sustancialmente desde el punto de vista antigénico y son de diferentes Clados de VIH-1 (por ejemplo, de Clado A y Clado B) se pueden volver a desplegar como antígenos únicos usados de acuerdo con la metodología actualmente divulgada, para inducir anticuerpos ampliamente neutralizantes contra el VIH-1.

Procedimientos

Estos estudios fueron aprobados por las Juntas de Ética en Investigación de la Universidad de British Columbia y la Universidad de Toronto. La sangre se recogió de pacientes convalecientes con infecciones por nH1N1 confirmadas por laboratorio o de sujetos vacunados con la vacuna contra la gripe nH1N1 adyuvante (Arepanrix™). Se prepararon y congelaron monocitos de sangre periférica (PBMC) y muestras de plasma. La RT-PCR y la clonación del ADNc que codifica las regiones variables de los anticuerpos (McLean et al. 2005) se realizaron con tres fuentes celulares, en dos casos con PB individuales purificados por FACS, elegidos al azar o purificados por FACS multicolor como unión a HA nH1 marcado con fluorescencia, y en el tercero, con clones individuales expandidos a partir de linfocitos B de memoria únicos purificados por FACS que se unían a HA nH1 fluorescente como se describe en la solicitud de patente PCT/CA2006/001074 (publicación nº. WO2007003041 A1). Los PB estudiados se recogieron 7 a 10 días después de la exposición a los antígenos de nH1N1 y los linfocitos B de memoria 2 a 8 semanas. Los anticuerpos monoclonales IgG1 se expresaron de forma transitoria y se purificaron como anteriormente (McLean et al. 2005) y se determinó la unión a la HA snH1 recombinante trimérica purificada a través de un ELISA. Los ensayos de microneutralización de nH1N1 se realizaron como se explica en el Manual de la OMS sobre Diagnóstico y Vigilancia de la Gripe Animal (www.wpro.who.int/internet/resources_ashx/CSR/Publications/manual+on+animal+ai+diagnosis+and+surveillance.pdf). En resumen, el anticuerpo monoclonal se sometió a diluciones en serie de 2 veces en una placa de microvaloración comenzando por 1:2 y se añadió un volumen igual de virus pdmH1N1 que contenía 100 TCID50 a cada dilución y se incubó durante 2 h a 37 °C. Las mezclas se añadieron a los pocillos respectivos de una placa de microvaloración que contenía monocapas de células MDCK en medio de Megavir sin suero que contenía tripsina tratada con TCPK y se incubaron durante 3 h, después de lo cual el medio se reemplazó por medio de Megavir nuevo que contenía tripsina tratada con TCPK. Las monocapas se monitorizaron los días 3, 4 y 5 para el desarrollo del efecto citopático (CPE). El recíproco de la dilución más alta del anticuerpo que inhibió el desarrollo de CPE vírico se designó como el título. Una forma modificada del ensayo permitió eliminar la etapa de omitir la eliminación de las mezclas virus-anticuerpo después de 3 h de incubación y permitir que el mAb y el virus permanezcan en el medio durante toda la duración del ensayo. El ensayo estándar de neutralización de la OMS se realizó en dos laboratorios de salud pública con experiencia y no reveló neutralización por mAb contra el tallo de HA. Razonamos que en el

ensayo estándar, la mezcla de los virus y mAb solo estará en contacto con las células huésped durante 3 h y, si el mAb se dirige al tallo de HA en lugar de a la cabeza, los virus se unirán con éxito a las células huésped. Después de que el virus y el mAb se eliminen, algunos de los mAb se disociarán de los virus que no están endocitosados sino unidos a las células. Cuando el virus es finalmente endocitosado, puede que no exista suficiente mAb unido al virus para inhibir la fusión. Por tanto, el virus se replicará y puede infectar otras células, sin que el mAb lo impida, dado que ya no está presente. En el ensayo modificado, cuando se dejaron los mAb contra el tallo de HA durante los 3-4 días completos del ensayo, se observó neutralización. El ensayo estándar de la OMS se diseñó para detectar anticuerpos neutralizantes en suero. Por lo tanto, la mezcla de virus y las valoraciones de los sueros se eliminaron por lavado después de 3 h de incubación con las células huésped porque el suero contenía inhibidores de tripsina que bloqueaban la tripsina, que era un componente esencial del ensayo. La acción de la tripsina era necesaria para escindir la hemaglutinina en el virus y volverla infecciosa para las células huésped a fin de ver un efecto citopático. Este formato funcionó bien con la gripe estacional, en la que los anticuerpos neutralizantes se dirigieron contra la cabeza de HA y bloquearon la unión con el virus.

Ensayo de reducción de placas H5N1: Se incubaron ~20.000 unidades formadoras de placa (UFP)/ml de virus de gripe A/Goose/Ger/R1400/07 (H5N1) y A/Ck/Ger/R28/03 (H7N7) con los mAb indicados a tres concentraciones diferentes (40 µg/ml, 20 µg/ml y 10 µg/ml) a 37 °C durante 1 h. Se transfirieron 50 µl de una dilución 1:10 de las mezclas virus-anticuerpo (que contenían ~100 UFP) por triplicado a monocapas de células MDCK en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Las células se lavaron y se cubrieron con CMC al 1,5 %. Transcurridas 30 h, las placas se visualizaron mediante inmunotinción usando un anticuerpo monoclonal anti-NP de ratón (F26NP9-2-1) (Weingartl et al. 2010). Las placas se contaron y el % de neutralización se calculó estableciendo la infección sin mAb como el 0 % de neutralización. Los datos mostrados son la media de las mediciones por triplicado con D.E.

Unión a HA H5 expresada en células: El Dr. Suryaprakash Sambhara (Centres for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) proporcionó adenovirus recombinantes que expresan HA de gripe A (AdHA) de virus A/Hong Kong/156/97 (H5N1) (Hoelscher, M.A. et al. 2008). Se utilizó la proproteína convertasa de AdHA (AdHA-PC) que contiene el sitio de escisión multibásico de HA. El adenovirus vacío (AdEmpty) se usó como control negativo (Viraquest Inc.). Para promover la estabilidad de HA, se añadió NH₄Cl (10 mM) al medio de cultivo durante la infección por AdHA. Las monocapas de células A549 en placas de 96 pocillos se infectaron con AdHA a una MOI de 500 y se incubaron durante 40 h antes de la fijación con formaldehído al 4 %. A continuación, las células se incubaron con las concentraciones indicadas de mAb y se trataron con anticuerpos anti-inmunoglobulina humana marcados con FITC. Los núcleos se sometieron a tinción de contraste con Hoechst. Las imágenes se registraron y analizaron/contaron usando el instrumento Cellomics (Thermo Scientific). Los datos mostrados son el promedio de mediciones duplicadas de un experimento representativo.

Ensayo para la inhibición de la fusión mediada por HA: Las células A549 se sembraron e infectaron con AdHA como se describe en el procedimiento para el ensayo de unión. Transcurridas 40 h desde la infección, las células se lavaron con PBS y se incubaron con los anticuerpos indicados (20 µg/ml) durante 30 min a 37 °C. A continuación, las células se lavaron de nuevo y se trataron con tampón de fusión (HEPES 10 mM, MES 10 mM, pH 5) durante 5 min a temperatura ambiente. Los medios se reemplazaron por medios de cultivo celular normales y las células se incubaron a 37 °C durante un período de 5 h para permitir la formación de sincitios. Para monitorizar la formación de sincitios, las células se marcaron con célula de seguimiento verde CMFDA 10 µM (Molecular Probes) durante 30 min a 37 °C, seguido de una incubación adicional durante 30 min en medios frescos antes de que las muestras se fijaran con formaldehído al 4 %. Los núcleos se sometieron a tinción de contraste con tinte Hoechst (1 µg/ml). Las imágenes fueron analizadas usando el sistema Cellomics.

Pruebas terapéuticas y profilácticas de anticuerpos contra la neumonía por pdmH1N1 y H5N1 mortal en ratones: El aislado clínico humano de la gripe pandémica H1N1, A/Halifax/210/2009 o la cepa de la vacuna contra H5N1, A/Hong Kong/213/2003 en la cadena principal PR8/34 se usaron para inducir neumonía vírica mortal en ratones CD-1 o ratones BALB/c, respectivamente. Grupos de 5 ratones CD-1 o BALB/c (19-21 Gm, hembras) fueron infectados bajo anestesia con halotano (3,5 % en O₂) con 50 µl de 2 x 10⁵ UFP de virus H5N1 o virus pdmH1N1 en PBS. Los ratones se trataron con una inyección intraperitoneal de 0,5 ml de anticuerpos monoclonales purificados 1 día antes o 1-2 días después de la infección para monitorizar los efectos protectores o terapéuticos. Los controles se trataron solo con PBS. La supervivencia y la pérdida de peso se monitorizaron durante 12 a 14 días para evaluar los efectos contra las infecciones pandémicas por H1N1 o H5N1 en ratones. De forma similar, los ratones se trataron con una inyección intraperitoneal de 0,4 ml de plasma humano 1 día antes o 0,4 ml de plasma humano durante cada 3, 2 o 1 días antes de la infección por H5N1 para monitorizar los efectos protectores.

Análisis estadístico: Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en R (Versión 2.9.1., The R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>) y Sigmaplot 11.2. Las variables continuas se compararon usando el orden de Mann-Whitney. Para la estimación de la probabilidad de uso del gen V usamos la distribución binomial.

ES 2 739 711 T3

Tabla 1:

Anticuerpos monoclonales humanos que se unen a la hemaglutinina recombinante de nH1N1

mAb	IGHV	D	J	κ/λ	IGK/LV	J	Mutaciones
(A) mAb generado a partir de plasmoblastos							
I3-15	1-69*01	3-10	6	κ	1-39*01	2	18
I4-112 [#]	1-2*02	6-19	3	λ	2-8*01	2	5
I4-115 [#]	3-20*01	3-10	4	κ	3-11*01	1	30
I4-128 [#]	1-69*01	5-5	5	κ	3-11*01	1	13
I4-109 [#]	3-33*01	4-17	4	λ	1-40*01	2	16
15-24	1-69*02	3-22	4	κ	3-20*01	2	29
15-52	1-18*01	3-16	6	κ	2-30*01	1	11
I5-69	1-69*02	5-24	4	κ	3-11*01	5	8
I5-7	1-69*12	3-10	3	κ	3-15*01	1	29
V2-1	3-30*18	1-26	6	κ	3-20*01	1	15
V2-2	4-39*01	6-13	5	λ	1-40*01	1	33
V2-3	4-39*01	6-13	5	λ	1-40*01	1	33
V2-4	4-39*01	6-13	5	λ	1-40*01	1	31
V2-11	4-39*01	6-13	5	λ	1-40*01	1	21
V2-36	4-39*01	6-13	5	λ	1-40*01	1	33
V2-38	4-39*01	6-13	5	λ	1-40*01	1	34
V2-7	4-39*01	6-13	5	λ	1-40*01	1	21
V2-12	4-39*01	3-22	4	κ	4-1*01	3	34
V4-1	1-69*06	5-12	4	κ	3-20*01	2	29
V4-9	1-69*02	7-27	5	κ	3-15*01	1	34
V4-12	3-33*02	5-24	4	λ	3-1*01	3	31
V4-17 ^H	4-39*01	3-3	4	λ	1-47*02	2	19
V4-18	1-69*06	5-12	4	κ	3-20*01	2	23
V4-23	1-69*02	7-27	6	κ	1-39*01	1	34
V4-29	1-69*01	5-5	6	λ	2-14*01	2	28
(B) mAb generado a partir de linfocitos B de memoria							
I4-1G8	2-70*11	2-8	6	λ	3-1*01	1	5
I4-1C4	1-69*09	4-23	5	κ	3-11*01	1	23
I4-1F7	3-66*01	1-26	2	κ	3-15*01	3	0
I8-1B6	1-69*01	3-3	6	λ	2-14*01	1	22
I14-2B7	1-18*01	2-8	6	κ	2-30*01	2	3
I14-1F8	5-51*01	5-12	6	κ	3-11*01	5	10
I14-2B6	4-59*01	2-8	3	κ	1-39*01	1	19
I14-2C5	3-30*03	6-6	4	κ	1-6*01	2	22
I14-1D9	1-69*04	2-15	4	κ	3-15*01	2	10
V3-1B9	3-11*01	3-3	3	κ	1-12*01	4	10
V3-1C6	1-69*01	1-1	6	λ	7-43*01	3	18
V3-1E8	3-33*01	1-26	4	λ	3-25*03	3	11
V3-2C10	1-69*01	5-12	5	κ	1-39*01	4	21
V3-2C2	1-69*06	3-9	4	κ	1-39*01	4	9
V3-2C3	1-69*01	3-10	5	κ	1-5*03	2	6

Anticuerpos monoclonales humanos que se unen a la hemaglutinina recombinante de nH1N1

mAb	IGHV	D	J	κ/λ	IGK/LV	J	Mutaciones
V3-2F10	1-69*06	3-22	4	κ	1-5*03	1	17
V3-2G6	1-69*01	3-16	4	κ	3-20*01	2	18
V3-3B3	1-69*01	3-10	3	λ	2-11*01	1	6
V3-3B6	1-69*06	2-2	6	κ	3-20*01	1	19
V3-2E2	1-69*01	3-10	4	κ	1-16*02	4	14
V3-3C11	1-69*01	5-12	4	λ	2-14*01	1	9
V3-1G10	1-69*06	1-14	5	K	3-15*01	2	25
V3-3D2	1-69*01	1-14	6	κ	1-16*-01	4	21

Los mAb se nombran sistemáticamente, con la letra y el número iniciales que indican el sujeto a partir del cual se generaron, con I o V que indican que se generaron a partir de un sujeto infectado por (I) o vacunado contra (V) el virus nH1N1. Las mutaciones enumeradas están en IGHV. Todos los mAb se unieron por ELISA al ectodominio recombinante purificado de HA de nH1N1 y a la vacuna contra nH1N1, y todos excepto V4-17 (*) también se unieron a la vacuna estacional de 2009/2010 y a HA H5 (A/Vietnam/1203/2004, Clado 1). Los mAb de la sección (A) se generaron a partir de PB, con # indicando aquellos que se generaron a partir de PB elegidos al azar que no se clasificaron por su capacidad para unirse a HA de nH1N1; otros mAb de la sección (A) se generaron a partir de PB purificados por su unión a HA de nH1N1. Los mAb de la sección (B) se generaron a partir de linfocitos B de memoria purificados por su unión a HA de nH1N1.

Tabla 2 Secuencias : Las CDR como se definen en IGMT están subrayadas. También se proporcionan (pero no están subrayados) los aminoácidos en el marco cercano a las CDR que están mutadas. Los últimos residuos se pueden reemplazar en el marco cuando estas CDR se trasplantan a un marco de inmunoglobulina para recrear el sitio de unión de estos anticuerpos.

5 **1 V2-36**

Seq 1H

ELRLHESGPGLVKPSGTLSTCTVSGGSISGGSHYWAWIRQSPGKGLEWIG
S

IYYSGSTYDSPSLKSRLSMSVDKSKNQFHLTLRSVTAADTAVYFCAKHESDS

10 SSWHTGWNWFDP (SEQ ID NO:8)

Seq1L

QSVLTQPSSVSGAPGQRVTISCTGYSYNIQTGFDVHWYQHLPKAPKLLIFG

NN NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQPEDEGDYQCQSFSSLSGSNV

(SEQ ID NO:7)

15 **Seq1cdrh1** GGGISGGSHY WA (SEQ ID NO:4 - subrayada, SEQ ID NO:81)

Seq1cdrh2 IYYSGST YDS (SEQ ID NO:5 - subrayada, SEQ ID NO:102)

Seq1cdrh3 AKHESDSSSWHTGWNWFDP (SEQ ID NO:6)

Seq1cdri1 YSNIGTGFD(SEQ ID NO:1)

Seq1cdri2 GNN (SEQ ID NO:2)

20 **Seq1cdri3** QSFSSLSGSNV (SEQ ID NO:3)

2 V2-7

Seq2h

QLQLQESGPGLVKTSETLSLCTVSGGSIRGGTNYWAWIRQPPGKGPPEWL
GSVYYSGSTYDNPSLKSRSVSIWDTSKNKFSRLRSVTAADTAIYYCARHES

25 DSSSWHTGWNWFDPWGQGLVTVSSAS (SEQ ID NO:16)

Seq2l

QSMLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSTNIGAGLAVHWYQHLPGTAPKLLIY
GNTNRPSGVPDRFSGSKSGTTASLAI TGLQADDEADYYCQSF DGSLSGSNV
FGTGTKVTVLTAA

5 (SEQ ID NO:15)

Seqcdrh1 GG SIRGGTNY WA (SEQ ID NO:12 - subrayada, SEQ ID NO:82)

Seqcdrh2 VYYSGSTYD (SEQ ID NO:13 - subrayada, SEQ ID NO:83)

Seqcdrh3 ARHESDSSSWHTGWNWFDP(SEQ ID NO:14)

Seqcdr1 STNIGAGLA (SEQ ID NO:9)

10 **Seqcdr12** GNT (SEQ ID NO:10)

Seqcdr13 QSF DGSLSGSNV(SEQ ID NO:11)

3 V3-2G6

Seq3h

QSQVQLEQSGAEVKRPGSSVKVSCQTSGGTFSSFAFSWVRQAPGQGLEW
15 VGG IIGMFGTTSYAQKFQGRVTISADESTSTAYMELSSLRSDDTAIYYC
ARGKKYYHDTLDY (SEQ ID NO:24)

Seq3l

EIVLTQSPGTL S LSPGERATL SCRASQIVSSSQLAWYQHKPGQAPRLLIYAA
S SRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSHA
20 (SEQ ID NO:23)

Seq3cdrh1 GGTFSSFA F (SEQ ID NO:20 - subrayada, SEQ ID NO:84)

Seq3cdrh2 IIGMFGTT S (SEQ ID NO:21 - subrayada, SEQ ID NO:85)

Seq3cdrh3 ARGKKYYHDTLDY (SEQ ID NO:22)

Seq3cdr1 QIVSSSQ (SEQ ID NO:17)

25 **Seq3cdr12** AAS (SEQ ID NO:18)

Seq3cdr13 QQYGTSHA (SEQ ID NO:19)

4. I8-1B6

Seq4h

QAQLEQSGAEVRRPGSSVKVACKTSGGIFSNFAVSVWRQAPGQGLEW MG
30 GILSIFRTTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELNSLRSDDTAVYYCARSITN
LYYYMDV (SEQ ID NO:32)

Seq4l

QSALTQPASVSGSPGQSITVSCTGTNSDVGTYNVSWFQQHPGEAPKVIIF
DVS HRP SGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEADYYC SSYTTSNTRV
35 (SEQ ID NO:31)

Seq4cdrh1 GGIFSNFA V (SEQ ID NO:28 - subrayada, SEQ ID NO:86)

Seq4cdrh2 ILSIFRTT (SEQ ID NO:29)

Seq4cdrh3 ARSITNLYYYYMDV (SEQ ID NO:30)

Seq4cdr11 NSDVGTYNY (SEQ ID NO:25)

Seq4cdr12 DVS H (SEQ ID NO:26 - subrayada, SEQ ID NO:87)

Seq4cdr13 SSYTTSNTRV (SEQ ID NO:27)

5 **5 V3-3D2**

Seq5h

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAPGVIFNAYAMSWVRQAPGQGLEWMG
GITGVFHTATYAPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARGPK
YYHSYMDV (SEQ ID NO:40)

10 **Seq5i**

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNWAWFQQKPGKTPKSLMYAT
S KLQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDFATYYCQQYSRYPPT
(SEQ ID NO:39)

Seq5cdrh1 P GVIFNAYA M (SEQ ID NO:36 - subrayada, SEQ ID NO:88)

15 **Seq5cdrh2** ITGVFHTA T (SEQ ID NO:37 - subrayada, SEQ ID NO:89)

Seq5cdrh3 ARGPKYYHSYMDV (SEQ ID NO:38)

Seq5cdr11 QDISNY V (SEQ ID NO:33 - subrayada, SEQ ID NO:90)

Seq5cdr12 MY ATS K (SEQ ID NO:34 - subrayada, SEQ ID NO:91)

Seq5cdr13 QQYSRYPPT (SEQ ID NO:35)

20 **6 V3-1G10**

Seq6h

QVQLVQSGAEVKKPGSTVKVCSCEASGVTFNHYTVSWVRQAPGQGLEWMG
G IIPFLGTADYAQKFQDRVTITADRSTGTAYMELSSLRPEDTALYYC
ARSGTTKTRYNWFD (SEQ ID NO:48)

25 **Seq6i**

EIIMTQSPATLSLSPGERVTLSRASQSVGTNLAWYQQKPGQAPRLLIFGAS
TRATGIPARFSGSGSETEFTLSISSLQSEDFAVYYCQHYNWPPYT
(SEQ ID NO:47)

Seq6cdrh1 EAS GVTFNHYT V (SEQ ID NO:44 - subrayada, SEQ ID NO:92)

30 **Seq6cdrh2** IIPFLGTA D (SEQ ID NO:45 - subrayada, SEQ ID NO:93)

Seq6cdrh3 ARSGTTKTRYNWFD (SEQ ID NO:46)

Seq6cdr11 QSVGTN (SEQ ID NO:41)

Seq6cdr12 F GAS (SEQ ID NO:42 - subrayada, SEQ ID NO:94)

Seq6cdr13 QHYNWPPYT (SEQ ID NO:43)

35 **7 15-24**

Seq7h

QFQLVQSGAEVRKPGSSVKVCTASGGTFSRYTVNWVRQAPGQGLQWM

ES 2 739 711 T3

GR FIPLLGMTNYAQRFGGRATITADKSTTTAFLELSSLTSEDVAVYFC
ARHDSSGYHPLDY (SEQ ID NO:56)

Seq7I

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSLSSGHLAWYQQKPGQAPRLLIY
5 GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYAVFLYT
(SEQ ID NO:55)

Seq7cdrh1 TAS GGTFSRYT VN (SEQ ID NO:52 - subrayada, SEQ ID NO:95)

Seq7cdrh2 FIPLLGMT (SEQ ID NO:53)

Seq7cdrh3 ARHDSSGYHPLDY (SEQ ID NO:54)

10 **Seq7cdr11** QSLSSGH (SEQ ID NO:49)

Seq7cdr12 GAS (SEQ ID NO:50)

Seq7cdr13 QQYAVFLYT (SEQ ID NO:51)

8 14-128

Seq8h

15 QVQLVQSGAEVKKPGSSVMVSKASGGTFSTYGVSWVRQAPGQGLEWVG
G IIPFGTAKYAQKFQGRVTITADESSTTAYMELSRLRSEDVAVYYC
ARPNTYGYILPVY (SEQ ID NO:64)

Seq8I

DIQMTQSPSTLSASVGRVTIGCRASQTISTYLAWYQQVPGKAPKLLIYMAS
20 TLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPGDFATYYCQHYNTYSST
(SEQ ID NO:63)

Seq8cdrh1 GGTFSTYG V (SEQ ID NO:60 - subrayada, SEQ ID NO:96)

Seq8cdrh IIPFGTA K (SEQ ID NO:61 - subrayada, SEQ ID NO:97)

Seq8cdrh3 ARPNTYGYILPVY (SEQ ID NO:62)

25 **Seq8cdr11** QTISTY (SEQ ID NO:57)

Seq8cdr12 MAS T (SEQ ID NO:58 - subrayada, SEQ ID NO:98)

Seq8cdr13 QHYNTYSST (SEQ ID NO:59)

9 V4-17

Seq9h

30 QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSITRNSYFWGWIRQPPGKGLEWIG
S
MYDGTTHNPSLKSRLTSLADTSKNQFSVRLSSVTAADTAVYYCARHHVT
ELRVLEWLPKSDY (SEQ ID NO:72)

Seq9I

35 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGTYVHWYQHLPGTAPKLLIY
DNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYHCAAWDDSLSGVV
(SEQ ID NO:71)

Seq9cdrh1 GGSITRNSYF (SEQ ID NO:68)

Seq9cdrh2 MYYDGTI YH (SEQ ID NO:69 - subrayada, SEQ ID NO:99)

Seq9cdrh3 ARHHVTELRVLEWLPKSDY (SEQ ID NO:70)

Seq9cdr1 SSNIGTY VH (SEQ ID NO:65 - subrayada, SEQ ID NO:100)

5 **Seq9cdr12** DNN (SEQ ID NO:66)

Seq9cdr13 AAWDDSLSGVV (SEQ ID NO:67)

10 V3-2C3

Seq10h

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFNNYA

10 VSWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAHKFQ-

GRVTITVDESTSTAYMELS SLRSEDAMYYCARVCSFYGSGSYNVFCY (SEQ ID NO:80)

Seq10l

DIQMTQSPSTLSASAGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPKAPKLLIY

KASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCQHYNSYSQTFGQ

15 GTKVEIKRTAAA (SEQ ID NO:79)

Seq10cdrh1 GGTFNNYA V (SEQ ID NO:76 - subrayada, SEQ ID NO:101)

Seq10cdrh2 IPIFGTA (SEQ ID NO:77)

Seq10cdrh3 ARVCSFYGSGSYNVFCY (SEQ ID NO:78)

Seq10cdr1 QSISSW (SEQ ID NO:73)

20 **Seq10cdr12** KAS (SEQ ID NO:74)

Seq10cdr13 QHYNSYSQT (SEQ ID NO:75)

Tabla 3: Uso de *IGHV1-69* esperado versus observado de la unión de mAb a snHA por sujeto

Sujeto	N.º de mAb anti-snHA		* Probabilidad de resultado observado
	Total	Usando <i>IGHV1-69</i>	
I3	1	1	0,04
I4	8	2	0,03
I5	4	3	0,0002
I8	1	1	0,04
I14	5	1	0,2
V3	14	12	1E-15
V4	7	5	2E-6
V2	9	0	0,7

* basado en la frecuencia promedio de uso de *IGHV1-69* en anticuerpos humanos del 4 %.

25 Tener en cuenta que todos menos 2 de los 8 sujetos (V2 y I14) tenían una frecuencia mayor a la esperada de mAb que usan *IGHV1-69*. La proporción total de mAb que usan *IGHV1-69* fue del 52 % (intervalos de confianza del 95 % de 38-66 %). Si se plantea la hipótesis de que, en la respuesta a nH1N1, se usa *IGHV1-69* en el 52 % de los mAb, la probabilidad de que los resultados obtenidos con el sujeto V2 se produjeran por casualidad fue de solo 0,002, mientras que para I14 la probabilidad fue de 0,16 (es decir, probable).

Referencias:

30 Allen, C. D., Okada, T., Tang, H. L. & Cyster, J. G. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. Science 315, 528-531 (2007).

- Babcock, J. S., Leslie, K. B., Olsen, O. A., Salmon, R. A. & Schrader, J. W. A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7843-7848 (1996).
- 5 Bardiya, N. & Bae, J. H. Influenza vaccines: recent advances in production technologies. *Appl Microbiol Biotechnol* 67, 299-305, doi:10.1007/s00253-004-1874-1 (2005).
- Barington, T., Heilmann, C. & Andersen, V. Quantitation of antibody-secreting cells in the blood after vaccination with Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine [published erratum appears in *Scand J Immunol* 1990 Jul;32(1):59]. *Scand J Immunol* 31, 515-522 (1990).
- 10 Burioni, R. et al. Monoclonal antibodies isolated from human B cells neutralize a broad range of H1 subtype influenza A viruses including swine-origin Influenza virus (S-OIV). *Virology* 399, 144-152.
- Chen, G. L. & Subbarao, K. Attacking the flu: neutralizing antibodies may lead to 'universal' vaccine. *Nat Med* 15, 1251-1252 (2009).
- Corti, D. et al. Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine *Journal of Clinical Investigation* 120, 1663-1673 (2010).
- 15 de Wildt, R.M., Hoet, R.M., van Venrooij, W.J., Tomlinson, I.M. & Winter, G. Analysis of heavy and light chain pairings indicates that receptor editing shapes the human antibody repertoire. *Journal of Molecular Biology* 285, 895-901 (1999).
- Ding, N., Wu, N., Xu, Q., Chen, K. & Zhang, C. Molecular evolution of novel swine-origin A/H1N1 influenza viruses among and before human. *Virus Genes* 39, 293-300 (2009).
- 20 Doherty, P. C. & Kelso, A. Toward a broadly protective influenza vaccine. *J Clin Invest* 118, 3273-3275 (2008).
- Eisenlohr, L. C., Gerhard, W. & Hackett, C. J. Role of receptor-binding activity of the viral hemagglutinin molecule in the presentation of influenza virus antigens to helper T cells. *Journal of Virology* 61, 1375-1383 (1987).
- Ekiert, D. C. et al. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* 324, 246-251 (2009).
- 25 Ekiert, D.C., et al. A Highly Conserved Neutralizing Epitope on Group 2 Influenza A Viruses. *Science*. (2011) July 7 Epub ahead of print
- Garcia, J. M. et al. Heterosubtype neutralizing responses to influenza A (H5N1) viruses are mediated by antibodies to virus haemagglutinin. *PLoS One* 4, e7918, (2009).
- Garten, R.J., et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325, 197-201 (2009).
- 30 Gioia, C. et al. Cross-subtype immunity against avian influenza in persons recently vaccinated for influenza. *Emerging Infectious Diseases* 14, 121-128 (2008).
- Hancock, K. et al. Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *N Engl J Med* (2009).
- 35 Heilmann, C., Henrichsen, J. & Pedersen, F. K. Vaccination-induced circulation of human B cells secreting type-specific antibodies against pneumococcal polysaccharides. *Scand J Immunol* 25, 61-67 (1987).
- Hoelscher, M.A., et al. A Broadly Protective Vaccine against Globally Dispersed Clade 1 and Clade 2 H5N1 Influenza Viruses. *The Journal of Infectious Diseases* 197, 1185-1188 (2008).
- Itoh, Y. et al. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460, 1021-1025 (2009).
- 40 Karlsson Hedestam, G.B., et al. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Micro* 6, 143-155 (2008).
- Kashyap, A. K. et al. Combinatorial antibody libraries from survivors of the Turkish H5N1 avian influenza outbreak reveal virus neutralization strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5986-5991 (2008).
- 45 Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M. & Bloedorn, J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* 68, 426-439 (1975).
- Kropff, B., Landini, M. P. & Mach, M. An ELISA using recombinant proteins for the detection of neutralizing antibodies against human cytomegalovirus. *J Med Virol* 39, 187-195 (1993).

- Lynch, G. W., Selleck, P. & Sullivan, J. S. Acquired heterosubtypic antibodies in human immunity for avian H5N1 influenza. *J Virol* 3, 205-209 (2009).
- McLean, G. R. et al. Recognition of human cytomegalovirus by human primary immunoglobulins identifies an innate foundation to an adaptive immune response. *J Immunol* 174, 4768-4778 (2005).
- 5 McLean, G. R., Cho, C. W. & Schrader, J. W. Autoreactivity of primary human immunoglobulins ancestral to hypermutated human antibodies that neutralize HCMV. *Mol Immunol* 43, 2012-2022 (2006).
- Nossal, G. J. V. & Lewis, H. Variation In Accessible Cell Surface Immunoglobulin Among Antibody-Forming Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 135, 1416-1422 (1972).
- 10 Ohlin, M., Sundqvist, V. A., Mach, M., Wahren, B. & Borrebaeck, C. A. Fine specificity of the human immune response to the major neutralization epitopes expressed on cytomegalovirus gp58/116 (gB), as determined with human monoclonal antibodies. *J Virol* 67, 703-710 (1993).
- Odendahl, M. et al. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* 105, 1614-1621 (2005).
- 15 Okuno, Y., Isegawa, Y., Sasao, F. & Ueda, S. A common neutralizing epitope conserved between the hemagglutinins of influenza A virus H1 and H2 strains. *J Virol* 67, 2552-2558 (1993).
- Paus, D. et al. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 1081-1091 (2006).
- Pinna, D., Corti, D., Jarrossay, D., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Clonal dissection of the human memory B-cell repertoire following infection and vaccination. *Eur J Immunol* 39, 1260-1270, doi:10.1002/eji.200839129 (2009).
- 20 Rerks-Ngarm, S., et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *The New England Journal of Medicine* 361, 2209-2220 (2009).
- Russell, S. M. & Liew, F. Y. T cells primed by influenza virion internal components can cooperate in the antibody response to haemagglutinin. *Nature* 280, 147-148 (1979).
- 25 Sagawa, H., Ohshima, A., Kato, I., Okuno, Y. & Isegawa, Y. The immunological activity of a deletion mutant of influenza virus haemagglutinin lacking the globular region. *J Gen Virol* 77, 1483-1487 (1996).
- Sasso, E. H., Johnson, T. & Kipps, T. J. Expression of the immunoglobulin VH gene 51p1 is proportional to its germline gene copy number. *Journal of Clinical Investigation* 97, 2074-2080 (1996).
- Settembre, E.C., Dormitzer, P.R. & Rappuoli, R. Learning from the 2009 H1N1 pandemic: prospects for more broadly effective influenza vaccines. *J Mol Cell Biol* 3, 144-146. (2011).
- 30 Schwickert, T.A., et al. A dynamic T cell limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center *The Journal of Experimental Medicine*. 208, 1243-1252 (2011).
- Smith, K. G., Light, A., Nossal, G. J. & Tarlinton, D. M. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *Embo J* 16, 2996-3006 (1997).
- 35 Steel, J. et al. Influenza Virus Vaccine Based on the Conserved Hemagglutinin Stalk Domain. *mBio*1, e00018-00010 (2010).
- Sui, J. et al. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat Struct Mol Biol* 16, 265-273 (2009).
- Tangye, S. G. & Tarlinton, D. M. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol* 39, 2065-2075 (2009).
- 40 Thomson, C. A. et al. Germline V-genes sculpt the binding site of a family of antibodies neutralizing human cytomegalovirus. *Embo J* (2008).
- Throsby, M. et al. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells. *PLoS One* 3, e3942 (2008).
- 45 Victora, G.D., et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143, 592-605 (2010).
- Wagner, B. et al. A continuous sequence of more than 70 amino acids is essential for antibody binding to the dominant antigenic site of glycoprotein gp58 of human cytomegalovirus. *Journal of Virology* 66, 5290-5297 (1992).

- Wang, T. T. et al. Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins. *PLoS Pathog* 6, e1000796,. (2010).
- Wei, C.-J., et al. Cross-neutralization of 1918 and 2009 influenza viruses: role of glycans in viral evolution and vaccine design. *Science Translational Medicine* 2, 24ra21 (2010)a.
- 5 Wei, C.-J., et al. Induction of broadly neutralizing H1N1 influenza antibodies by vaccination. *Science (New York, N.Y.)* 329, 1060-1064 (2010)b.
- Weingartl, H.M., et al. Genetic and Pathobiologic Characterization of Pandemic H1N1 2009 Influenza Viruses from a Naturally Infected Swine Herd. *J. Virol.* 84, 2245-2256 (2010).
- 10 Wen, L., et al. Limiting dilution assay for human B cells based on their activation by mutant EL4 thymoma cells: total and antimalaria responder B cell frequencies. *Eur J Immunol* 17, 887-892 (1987).
- Wiley, D. C. & Skehel, J. J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 56, 365-394 (1987).
- Wrammert, J. et al. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature* 453, 667-671 (2008).
- 15 Wrammert, J., et al. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *The Journal of Experimental Medicine* 208, 181-193 (2011).
- Xu, R. et al. Structural Basis of Preexisting Immunity to the 2009 H1N1 Pandemic Influenza Virus. *Science* 328, 357-360 (2010).
- 20 Yen, H.-L. & Webster, R.G. Pandemic influenza as a current threat. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 333, 3-24 (2009).
- Yoshida, R., et al. Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses. *PLoS Pathog* 5, e1000350 (2009).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Schrader, John W.
- <120> PROTECCIÓN CONTRA PATÓGENOS DE PROTECCIÓN CRUZADA, PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES DE LOS MISMOS
- 5 <130> 14636-10
- <150> US 61/366.747
- <151> 22-07-2010
- <160> 102
- <170> PatentIn versión 3.5
- 10 <210> 1
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- Tyr Ser Asn Ile Gly Thr Gly Phe Asp
- 15 1 5
- <210> 2
- <211> 3
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 20 <400> 2
- Gly Asn Asn
- 1
- <210> 3
- <211> 12
- <212> PRT
- 25 <213> Homo sapiens
- <400> 3
- Gln Ser Phe Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Asn Val
- 1 5 10
- <210> 4
- <211> 10
- 30 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 4
- Gly Gly Ser Ile Ser Gly Gly Ser His Tyr
- 1 5 10
- <210> 5
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 35 <400> 5
- Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
- 1 5
- 40 <210> 6
- <211> 19
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Lys His Glu Ser Asp Ser Ser Ser Trp His Thr Gly Trp Asn Trp
1 5 10 15

Phe Asp Pro

<210> 7

<211> 102

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Tyr Ser Asn Ile Gly Thr Gly
20 25 30

Phe Asp Val His Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Phe Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Asn Val
100

<210> 8

10 <211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Leu Arg Leu His Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Gly Gly
20 25 30

Ser His Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Asp Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Ser Met Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

His Leu Thr Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
85 90 95

Cys Ala Lys His Glu Ser Asp Ser Ser Ser Trp His Thr Gly Trp Asn
100 105 110

Trp Phe Asp Pro
115

ES 2 739 711 T3

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 9
 Ser Thr Asn Ile Gly Ala Gly Leu Ala
 1 5
 <210> 10
 <211> 3
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Gly Asn Thr
 1
 <210> 11
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 Gln Ser Phe Asp Gly Ser Leu Ser Gly Ser Asn Val
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Gly Gly Ser Ile Arg Gly Gly Thr Asn Tyr
 1 5 10
 25 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
 1 5
 30 <210> 14
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 14
 Ala Arg His Glu Ser Asp Ser Ser Ser Trp His Thr Gly Trp Asn Trp
 1 5 10 15
 Phe Asp Pro
 <210> 15
 <211> 115
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 15

ES 2 739 711 T3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Thr Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

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

Leu Ile Tyr Gly Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Thr Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Gly Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

Thr Ala Ala
115

<210> 16
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 16

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Gly Gly
20 25 30

Thr Asn Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Pro Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Ser Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Asp Asn Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Arg Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg His Glu Ser Asp Ser Ser Ser Trp His Thr Gly Trp Asn
100 105 110

Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

Ser

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 17

Gln Ile Val Ser Ser Ser Gln
1 5

ES 2 739 711 T3

<210> 18
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 18
 Ala Ala Ser
 1
 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 Gln Gln Tyr Gly Thr Ser His Ala
 1 5
 <210> 20
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Phe Ala
 1 5
 <210> 21
 <211> 8
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 Ile Ile Gly Met Phe Gly Thr Thr
 1 5
 25 <210> 22
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 Ala Arg Gly Lys Lys Tyr Tyr His Asp Thr Leu Asp Tyr
 30 1 5 10
 <210> 23
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 23

ES 2 739 711 T3

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

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

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

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

Ala

<210> 24
 <211> 111
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 24

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

Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Thr Ser Gly Gly Thr Phe Ser
 20 25 30

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

Trp Val Gly Gly Ile Ile Gly Met Phe Gly Thr Thr Ser Tyr Ala Gln
 50 55 60

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr
 65 70 75 80

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Gly Lys Lys Tyr Tyr His Asp Thr Leu Asp Tyr
 100 105 110

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<400> 25

Asn Ser Asp Val Gly Thr Tyr Asn Tyr
 1 5

<210> 26
 <211> 3
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 26

Asp Val Ser
 20 1

ES 2 739 711 T3

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 27
 Ser Ser Tyr Thr Thr Ser Asn Thr Arg Val
 1 5 10
 <210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 Gly Gly Ile Phe Ser Asn Phe Ala
 1 5
 <210> 29
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Ile Leu Ser Ile Phe Arg Thr Thr
 1 5
 <210> 30
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 30
 Ala Arg Ser Ile Thr Asn Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val
 1 5 10
 <210> 31
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 31
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Val Ser Cys Thr Gly Thr Asn Ser Asp Val Gly Thr Tyr
 20 25 30
 Asn Tyr Val Ser Trp Phe Gln Gln His Pro Gly Glu Ala Pro Lys Val
 35 40 45
 Ile Ile Phe Asp Val Ser His Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Ser
 85 90 95
 30 Asn Thr Arg Val
 100
 <210> 32

ES 2 739 711 T3

<211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

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

Ser Val Lys Val Ala Cys Lys Thr Ser Gly Gly Ile Phe Ser Asn Phe
 20 25 30

5 Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Leu Ser Ile Phe Arg Thr Thr 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 Asn Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Ile Thr Asn Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val
 100 105 110

<210> 33
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 33

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 1 5

<210> 34
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 34

Ala Thr Ser
 1

<210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 35

Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Pro Thr
 1 5

25

<210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

Gly Val Ile Phe Asn Ala Tyr Ala
 1 5

30

<210> 37
 <211> 8
 <212> PRT

ES 2 739 711 T3

<213> Homo sapiens

<400> 37

Ile Thr Gly Val Phe His Thr Ala
1 5

5 <210> 38
<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Ala Arg Gly Pro Lys Tyr Tyr His Ser Tyr Met Asp Val
1 5 10

10 <210> 39
<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Ser Leu Met
35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Lys Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Pro
85 90 95

15 Thr

<210> 40

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 40

ES 2 739 711 T3

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 Pro Gly Val Ile Phe Asn Ala Tyr
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Thr Gly Val Phe His Thr Ala Thr Tyr Ala Pro 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 Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Pro Lys Tyr Tyr His Ser Tyr Met Asp Val
 100 105

5 <210> 41
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41

Gln Ser Val Gly Thr Asn
 1 5

10 <210> 42
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

Gly Ala Ser
 1

15 <210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

20 Gln His Tyr Asn Asn Trp Pro Pro Tyr Thr
 1 5 10

<210> 44
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 44

Gly Val Thr Phe Asn His Tyr Thr
 1 5

30 <210> 45
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

ES 2 739 711 T3

Ile Ile Pro Leu Phe Gly Thr Ala
 1 5

<210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 46

Ala Arg Ser Gly Thr Thr Lys Thr Arg Tyr Asn Trp Phe Asp Pro
 1 5 10 15

<210> 47
 <211> 98
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr

<210> 48
 <211> 111
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 48

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

Thr Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Val Thr Phe Asn His Tyr
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Leu Phe Gly Thr Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Arg Ser Thr Gly Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Thr Thr Lys Thr Arg Tyr Asn Trp Phe Asp Pro
 100 105 110

ES 2 739 711 T3

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 49
 Gln Ser Leu Ser Ser Gly His
 1 5
 <210> 50
 <211> 3
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 50
 Gly Ala Ser
 1
 <210> 51
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 Gln Gln Tyr Ala Val Phe Leu Tyr Thr
 1 5
 <210> 52
 <211> 8
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 52
 Gly Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Thr
 1 5
 25 <210> 53
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 Phe Ile Pro Leu Leu Gly Met Thr
 1 5
 30 <210> 54
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 54
 Ala Arg His Asp Ser Ser Gly Tyr His Pro Leu Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 55
 <211> 98
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 55

ES 2 739 711 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ser Ser Gly
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Val Phe Leu
 85 90 95

Tyr Thr

- <210> 56
- <211> 109
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 56

Gln Phe Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

Thr Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Phe Ile Pro Leu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Thr Thr Ala Phe
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg His Asp Ser Ser Gly Tyr His Pro Leu Asp Tyr
 100 105

- <210> 57
- 10 <211> 6
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 57

Gln Thr Ile Ser Thr Tyr
 1 5

- 15 <210> 58
- <211> 3
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 58

20 Met Ala Ser
 1

ES 2 739 711 T3

<210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 59
 Gln His Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Thr
 1 5
 <210> 60
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 60
 Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr Gly
 1 5
 <210> 61
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 61
 Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala
 1 5
 <210> 62
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 62
 Ala Arg Pro Asn Thr Tyr Gly Tyr Ile Leu Pro Val Tyr
 1 5 10
 <210> 63
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 63
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 30 Asp Arg Val Thr Ile Gly Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Met Ala 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 Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Gly Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser
 85 90 95
 Thr
 <210> 64
 <211> 109
 <212> PRT

ES 2 739 711 T3

<213> Homo sapiens

<400> 64

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

Ser Val Met Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Asn Thr Tyr Gly Tyr Ile Leu Pro Val Tyr
100 105

5 <210> 65
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

Ser Ser Asn Ile Gly Thr Tyr Tyr
1 5

10 <210> 66
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

Asp Asn Asn
1

15 <210> 67
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Val Val
1 5 10

25 <210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

Gly Gly Ser Ile Thr Arg Asn Ser Tyr Phe
1 5 10

30 <210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

Met Tyr Tyr Asp Gly Thr Thr
1 5

<210> 70

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Ala Arg His His Val Thr Glu Leu Arg Val Leu Glu Trp Leu Pro Lys
1 5 10 15

Ser Asp Tyr

<210> 71

10 <211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

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 Thr Tyr
20 25 30

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

Ile Tyr Asp 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 Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr His Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Val Val
100

15 <210> 72

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

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 Thr Arg Asn
20 25 30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Met Tyr Tyr Asp Gly Thr Thr Tyr His Asn Pro Ser
50 55 60

20 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Leu Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

ES 2 739 711 T3

Ser Val Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg His His Val Thr Glu Leu Arg Val Leu Glu Trp Leu Pro
 100 105 110

Lys Ser Asp Tyr
 115

<210> 73
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 73

Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 74
 <211> 3
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74

Lys Ala Ser
 1

<210> 75
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 75

Gln His Tyr Asn Ser Tyr Ser Gln Thr
 1 5

<210> 76
 <211> 8
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 76

Gly Gly Thr Phe Asn Asn Tyr Ala
 1 5

<210> 77
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 77

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala
 1 5

<210> 78
 <211> 18
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 78

Ala Arg Val Cys Ser Phe Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Val Phe
 1 5 10 15

Cys Tyr

ES 2 739 711 T3

<210> 79
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 79

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ala 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 His Tyr Asn Ser Tyr Ser Gln
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Ala Ala Ala
 100 105 110

<210> 80
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 80

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 Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Val 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 His Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Cys Ser Phe Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Val Phe
 100 105 110

Cys Tyr

<210> 81
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 81

Gly Gly Ser Ile Ser Gly Gly Ser His Tyr Trp Ala
 1 5 10

ES 2 739 711 T3

<210> 82
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 82
 Gly Gly Ser Ile Arg Gly Gly Thr Asn Tyr Trp Ala
 1 5 10
 <210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 83
 Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Asp
 1 5
 <210> 84
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 84
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Phe Ala Phe
 1 5
 20 <210> 85
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 85
 Ile Ile Gly Met Phe Gly Thr Thr Ser
 1 5
 25 <210> 86
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 86
 Gly Gly Ile Phe Ser Asn Phe Ala Val
 1 5
 30 <210> 87
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 87
 Asp Val Ser His
 1
 <210> 88
 <211> 10
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 88
 Pro Gly Val Ile Phe Asn Ala Tyr Ala Met
 1 5 10
 <210> 89
 <211> 9

ES 2 739 711 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 89

 Ile Thr Gly Val Phe His Thr Ala Thr
 5 1 5

 <210> 90
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 10 <400> 90

 Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Val
 1 5

 <210> 91
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 91

 Met Tyr Ala Thr Ser Lys
 1 5

 <210> 92
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 92

 Glu Ala Ser Gly Val Thr Phe Asn His Tyr Thr Val
 1 5 10

 <210> 93
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 93

 Ile Ile Pro Leu Phe Gly Thr Ala Asp
 1 5

 30 <210> 94
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 94

 Phe Gly Ala Ser
 35 1

 <210> 95
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 40 <400> 95

 Thr Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Thr Val Asn
 1 5 10

 <210> 96
 <211> 9
 <212> PRT

ES 2 739 711 T3

<213> Homo sapiens
 <400> 96
 Gly Gly Thr Phe Ser Thr Tyr Gly Val
 1 5

5 <210> 97
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 97
 Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Lys
 1 5

10 <210> 98
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 98
 Met Ala Ser Thr
 1

15 <210> 99
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 99
 Met Tyr Tyr Asp Gly Thr Thr Tyr His
 1 5

25 <210> 100
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 100
 Ser Ser Asn Ile Gly Thr Tyr Tyr Val His
 1 5 10

30 <210> 101
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 101
 Gly Gly Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Val
 1 5

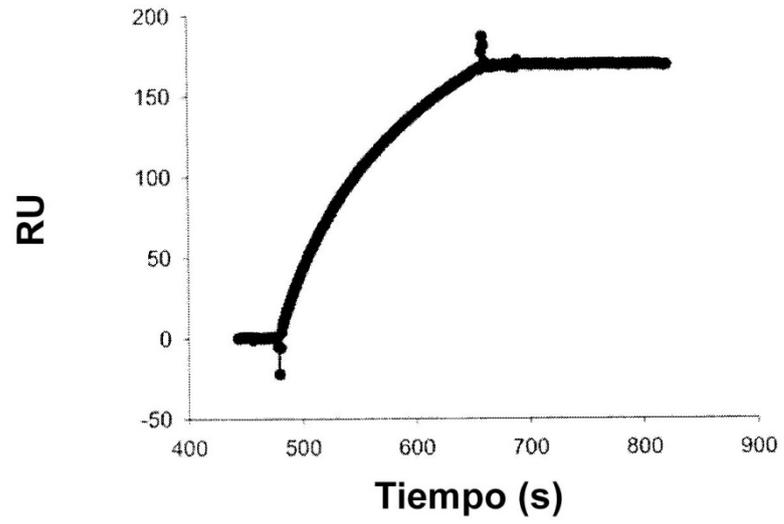
35 <210> 102
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 102
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Asp Ser
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende las secuencias CDR de la cadena ligera de SEQ ID NO:17, 18 y 19 y las secuencias CDR de la cadena pesada de SEQ ID NO:20, 21 y 22, o que comprende la región variable de cadena ligera como se muestra en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:23 y la región variable de cadena pesada como se muestra en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:24.
- 5
2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento o prevención de una infección por el virus de la gripe.

Figura 1

A



B

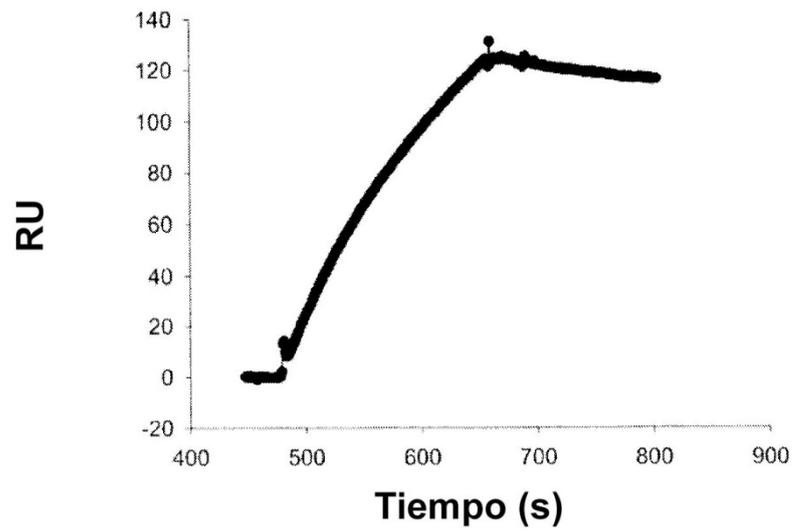
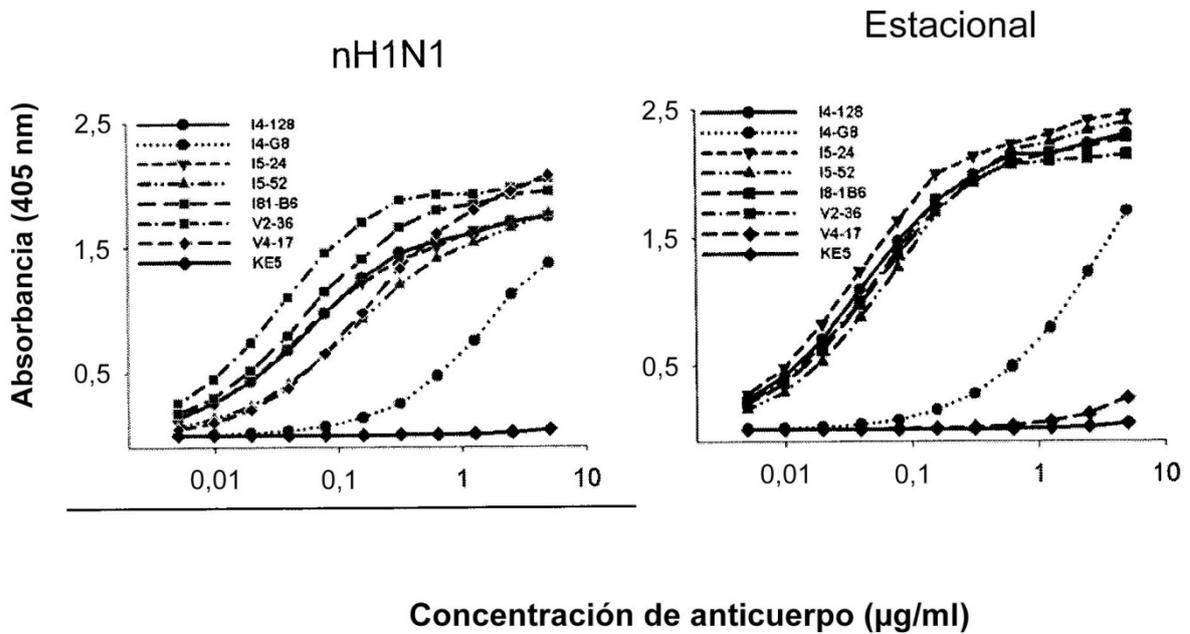


Figura 2

A



Unión de anticuerpos a HA de H5N1

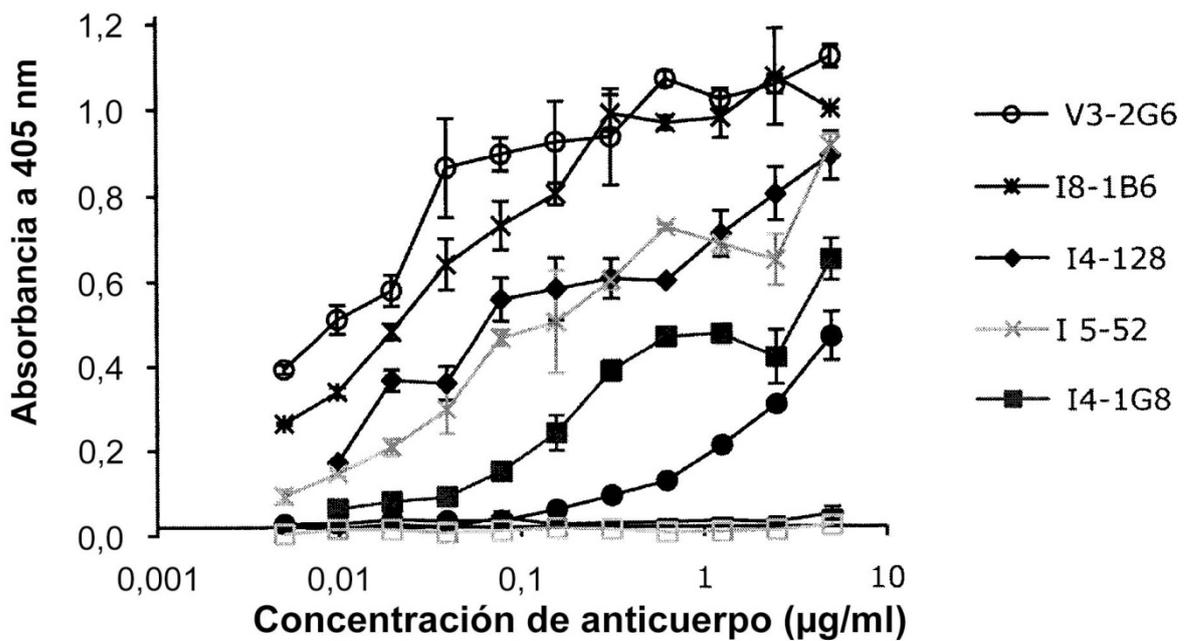
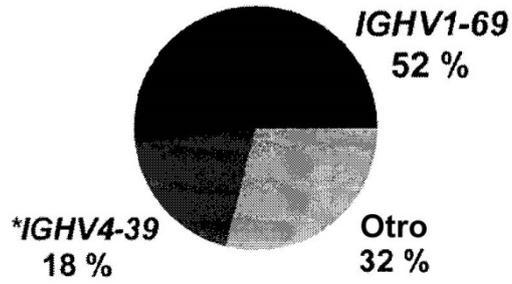


Figura 2 (cont.)

B



C

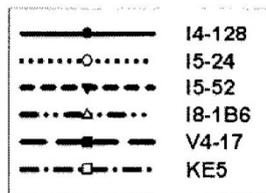
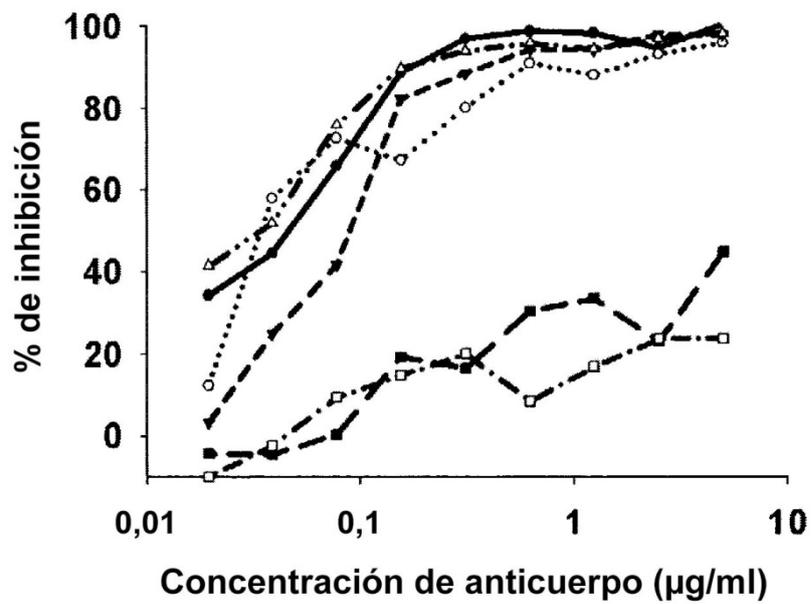
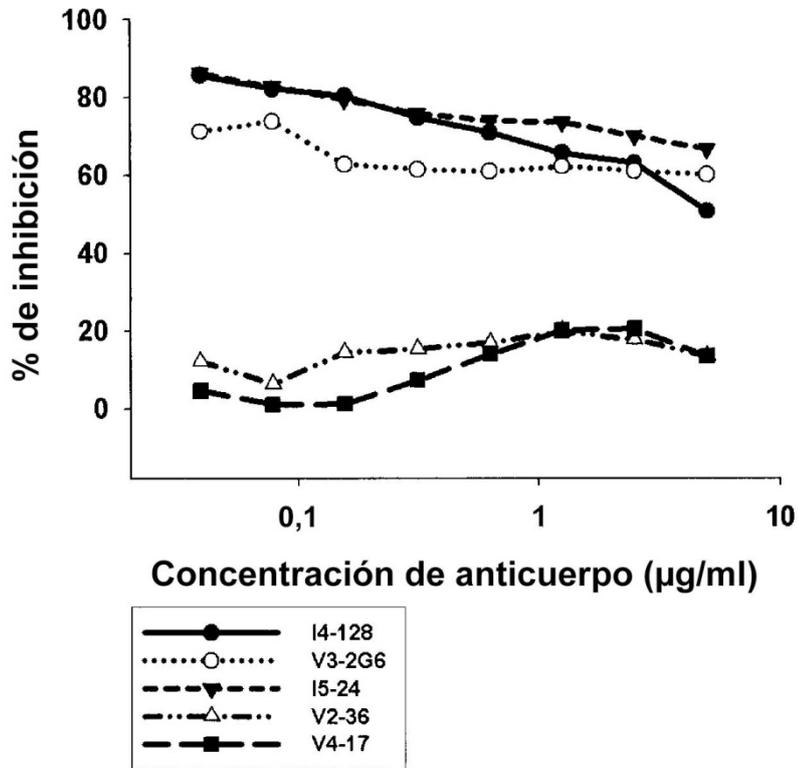


Figura 2 (cont.)



D

Inhibición de la hemaglutinación

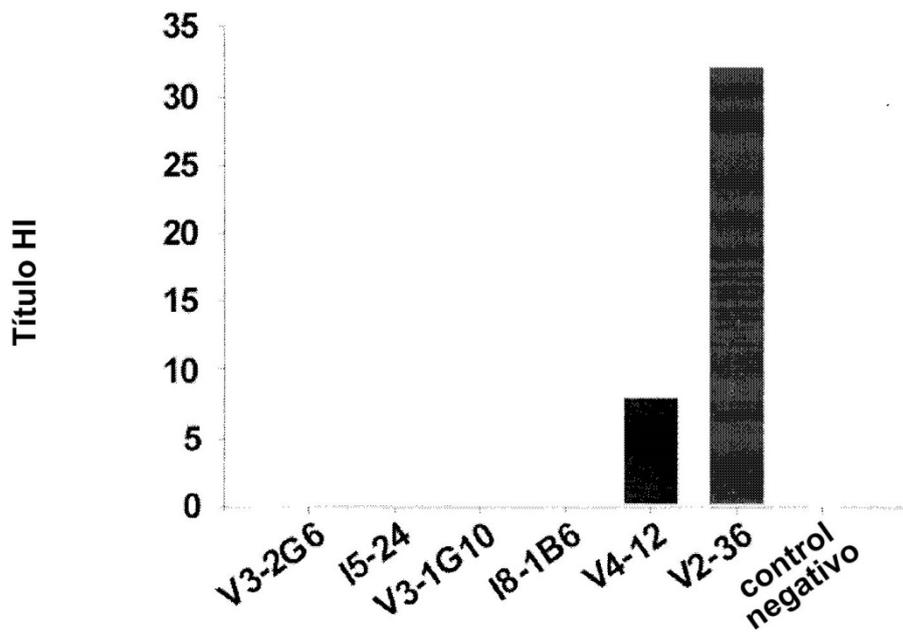
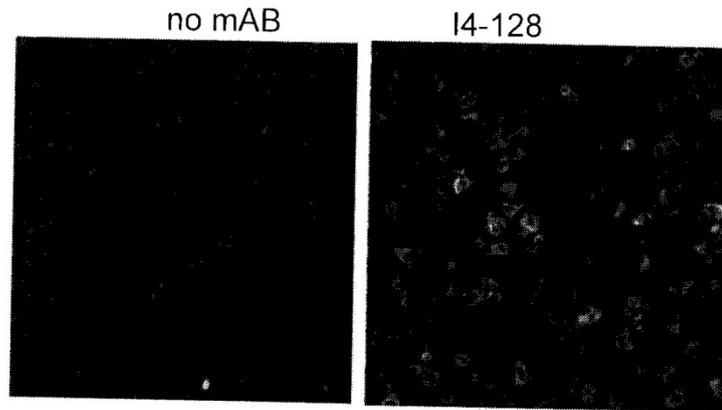


Figura 2 (cont.)

E Unión a hemaglutinina H5



F Unión a hemaglutinina H5 expresada en células A549

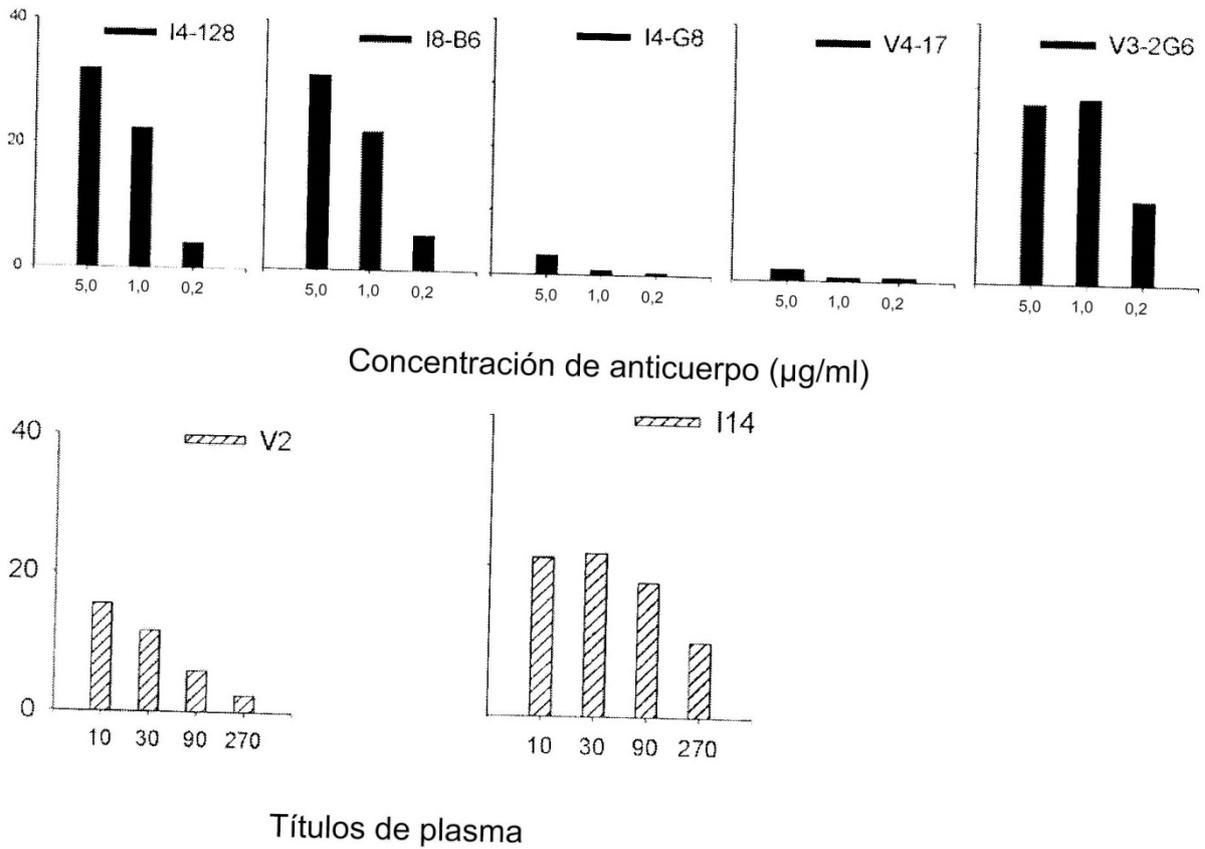
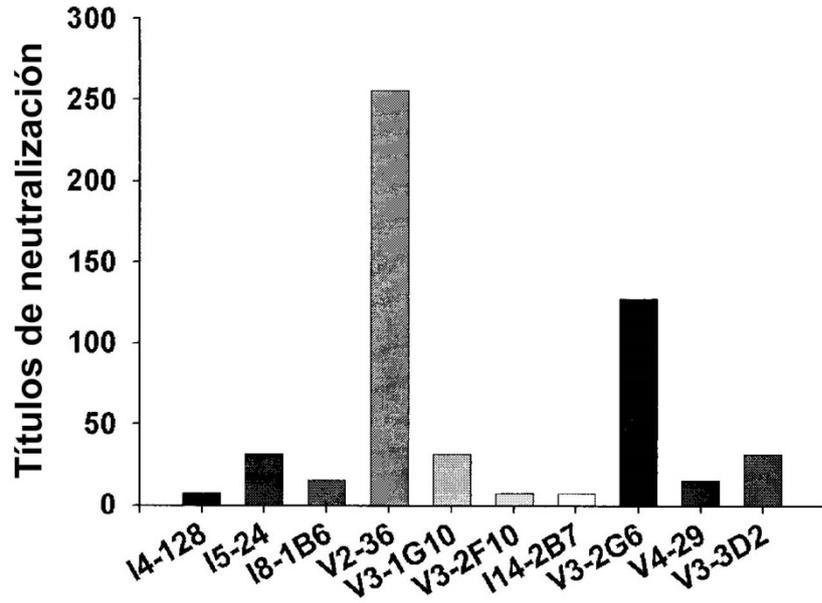
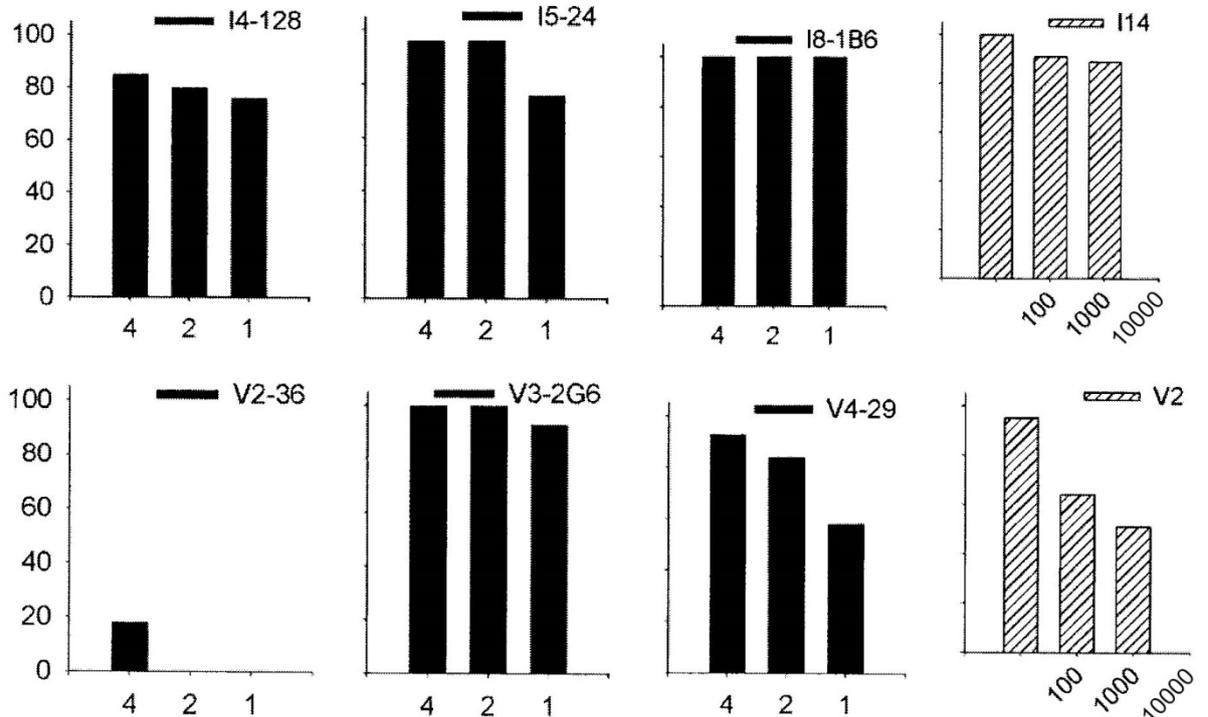


Figura 3

A



B

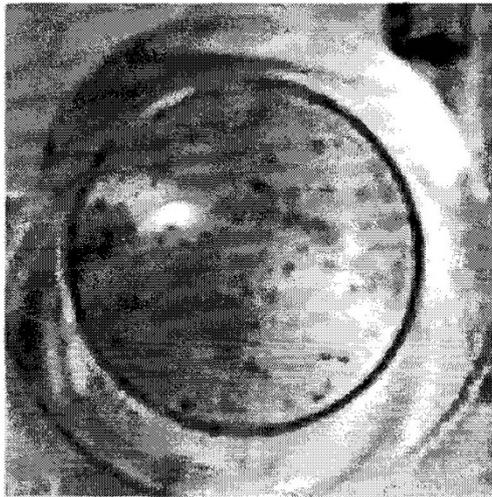
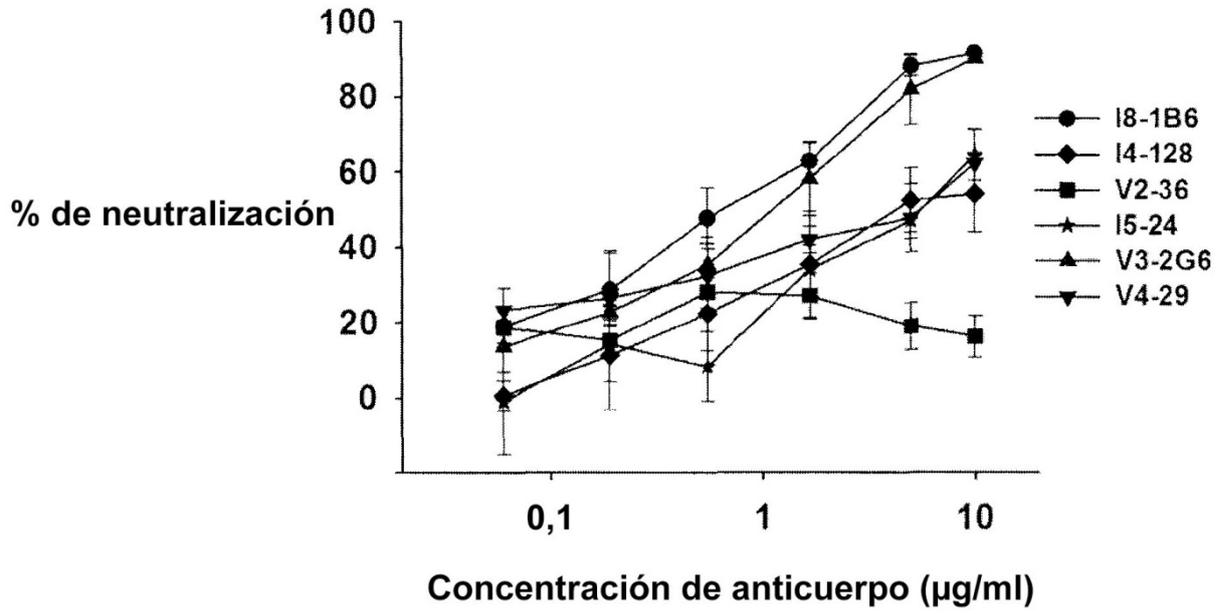


Concentración de anticuerpo (µg/ml)

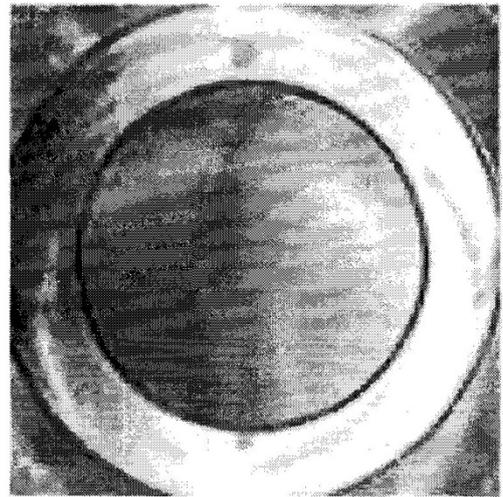
Plasma

Títulos

Figura 3B (cont.)



no Ab



I8-1B6

Figura 3 (cont.)

C

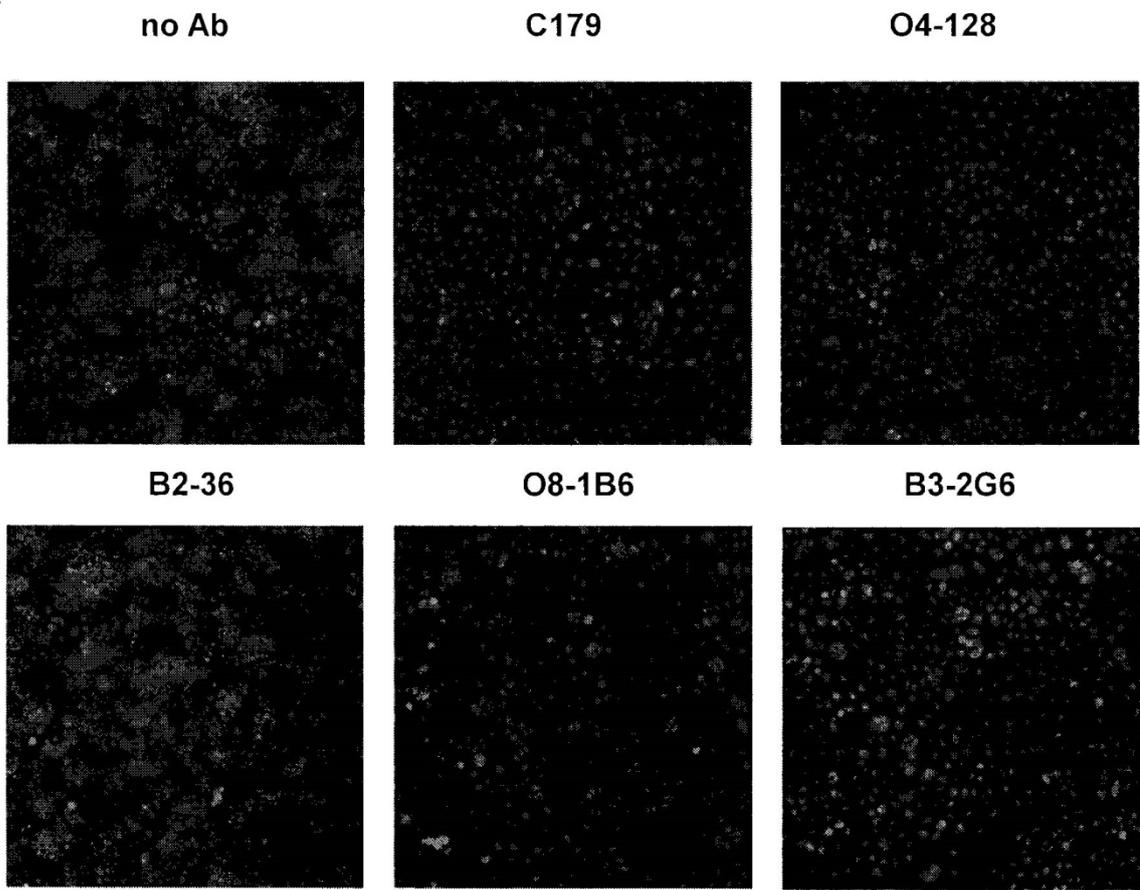


Figura 4

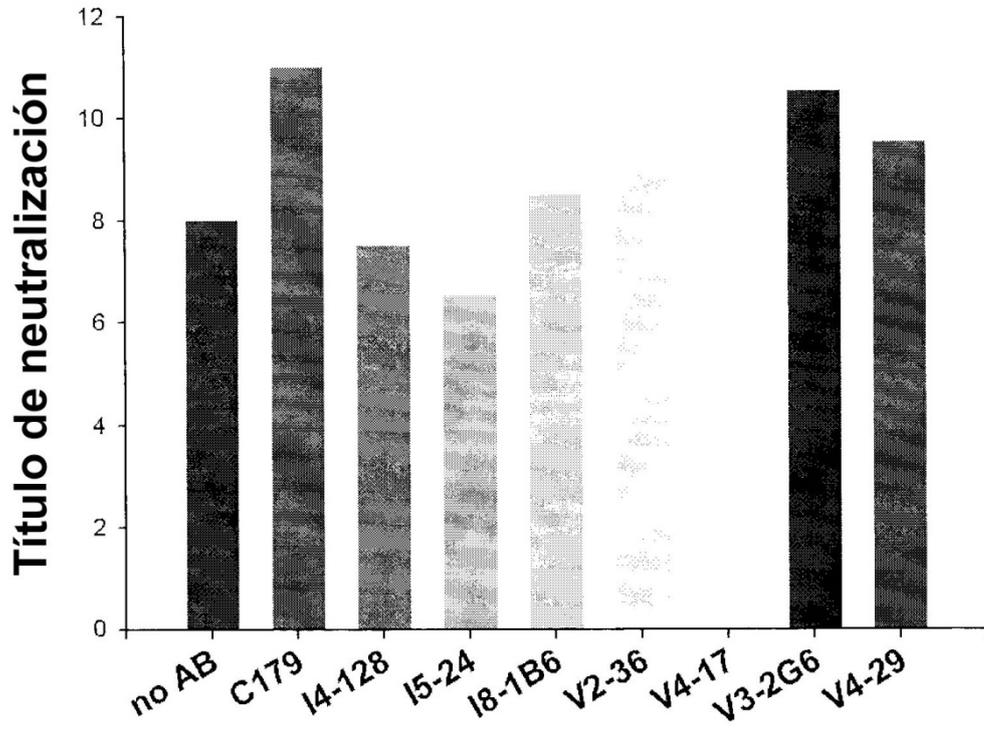


Figura 5

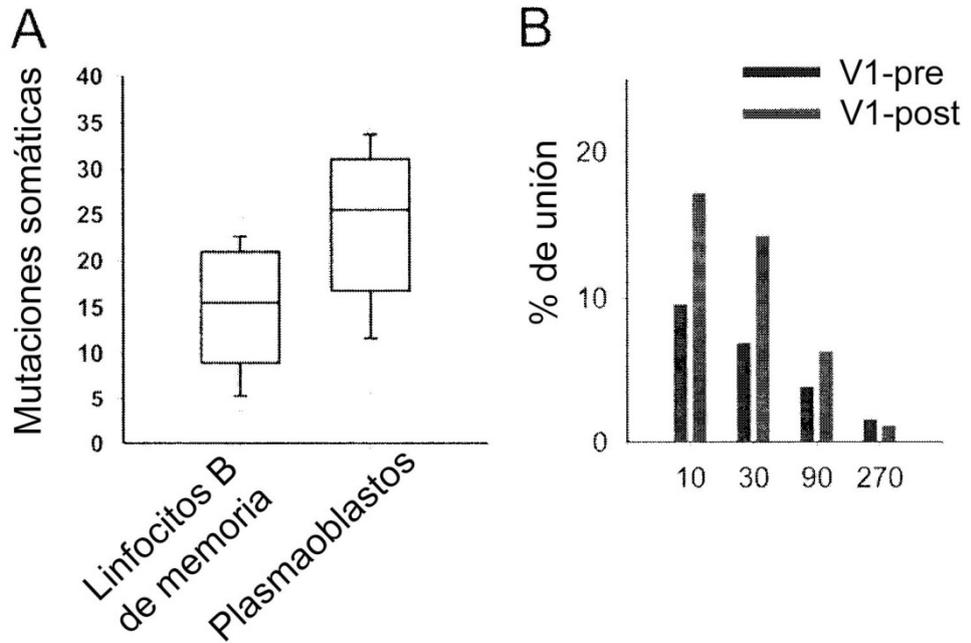


Figura 6

A

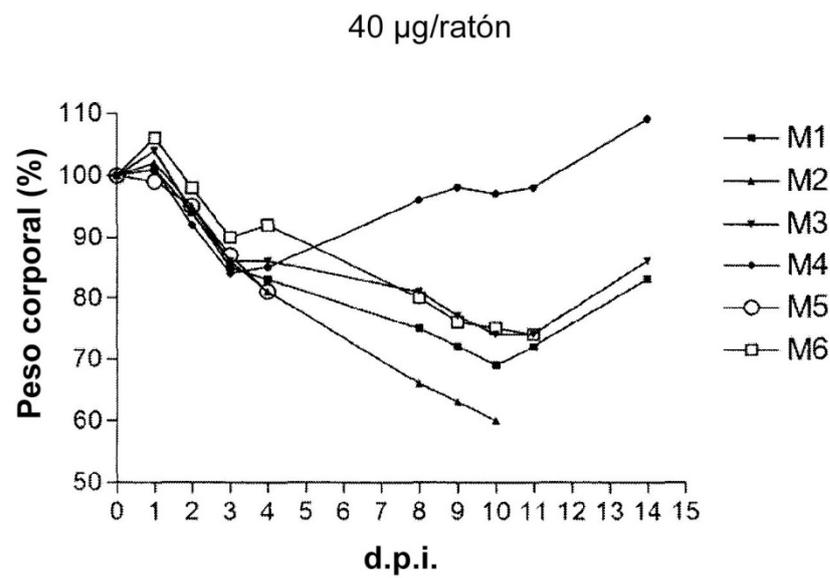
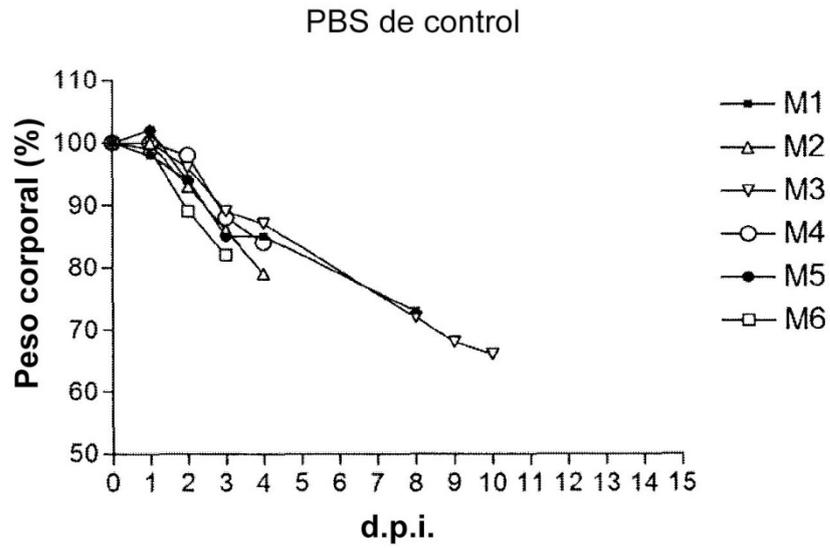


Figura 6 (cont.)

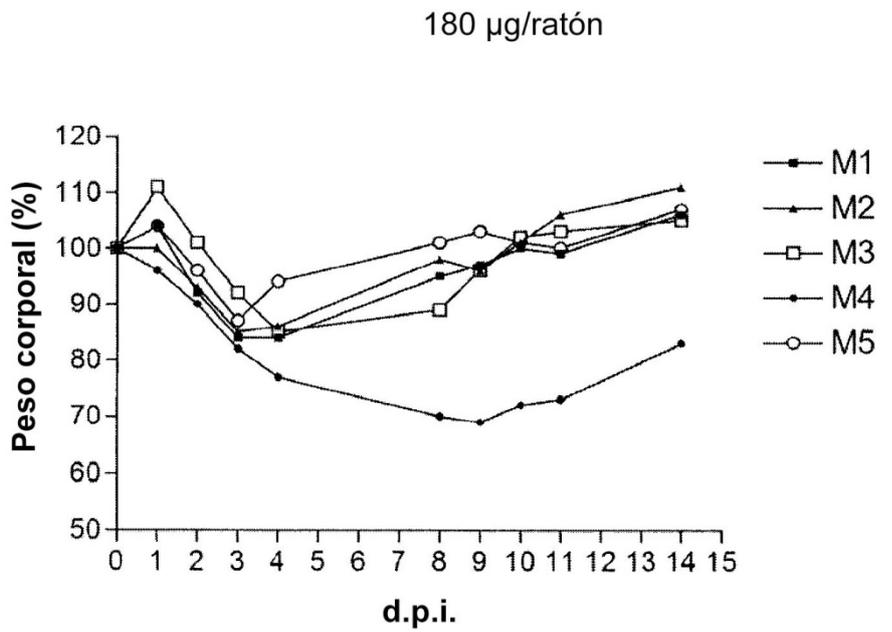
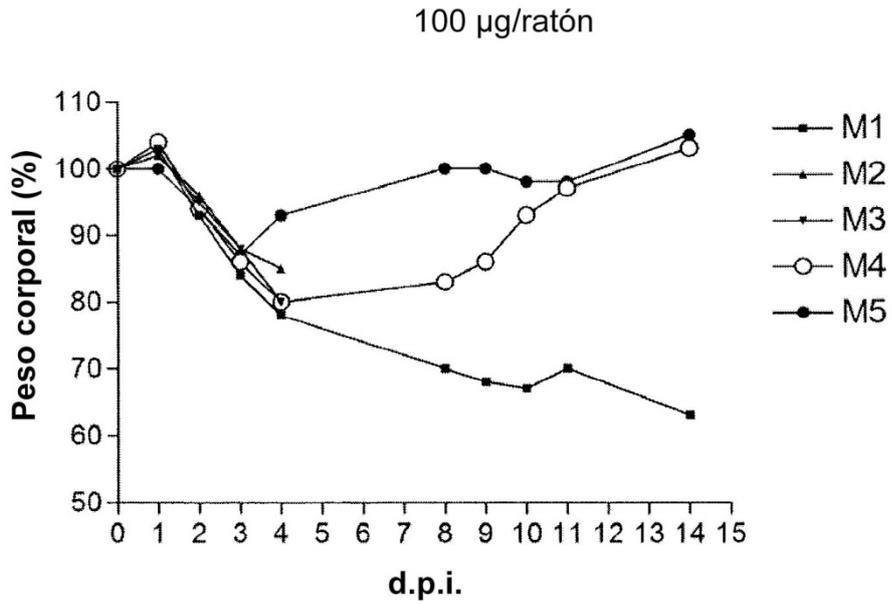


Figura 6 (cont.)

B

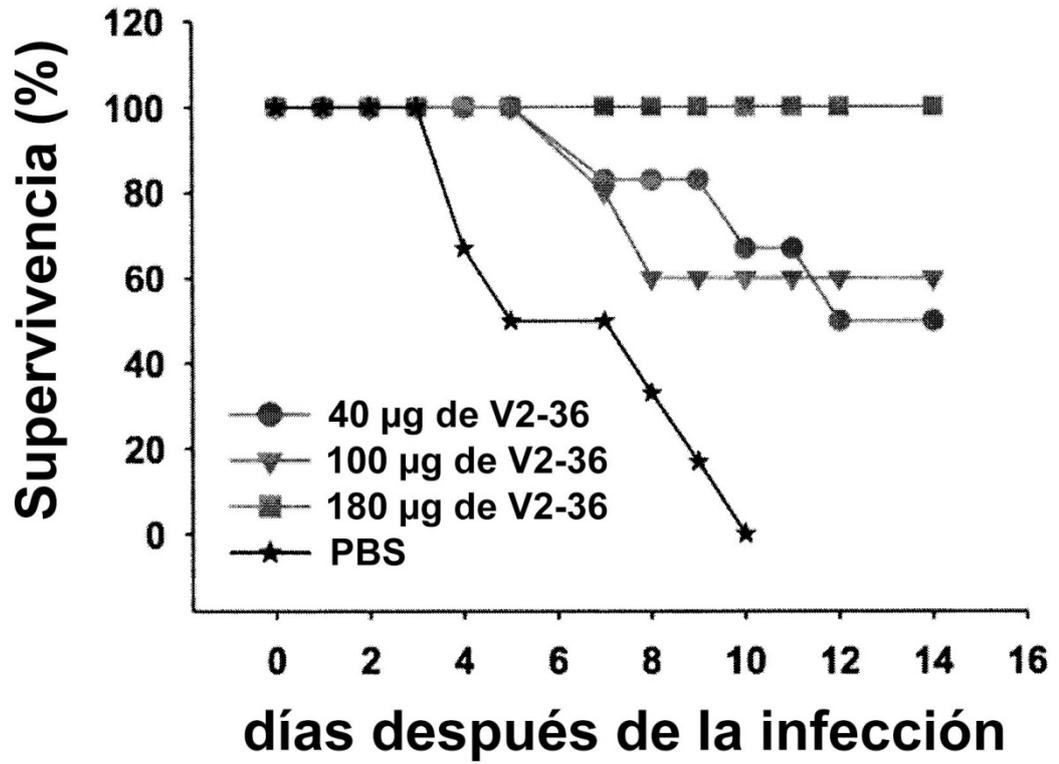


Figura 7

A

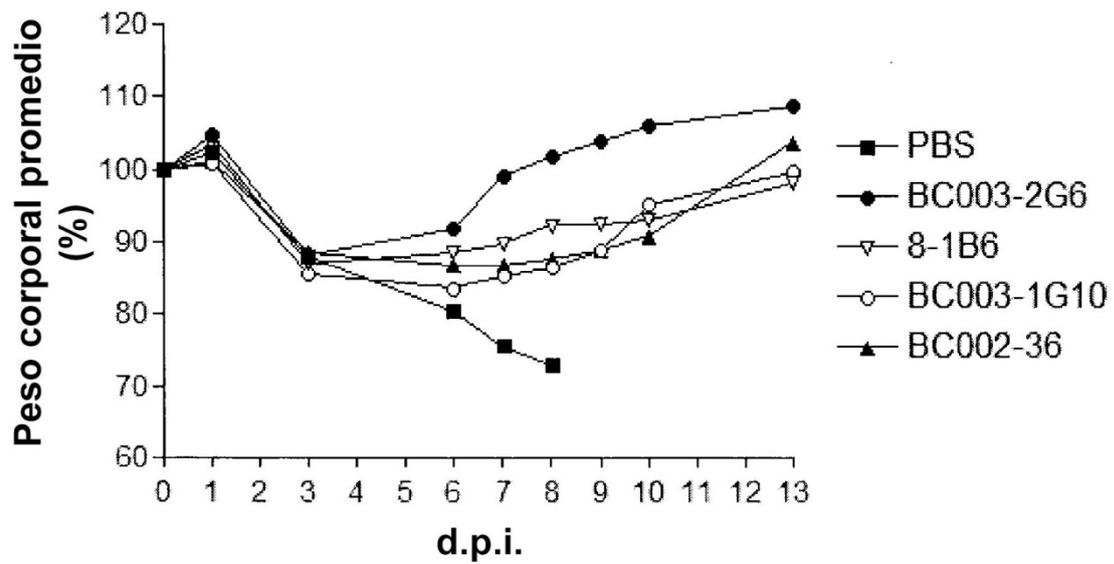
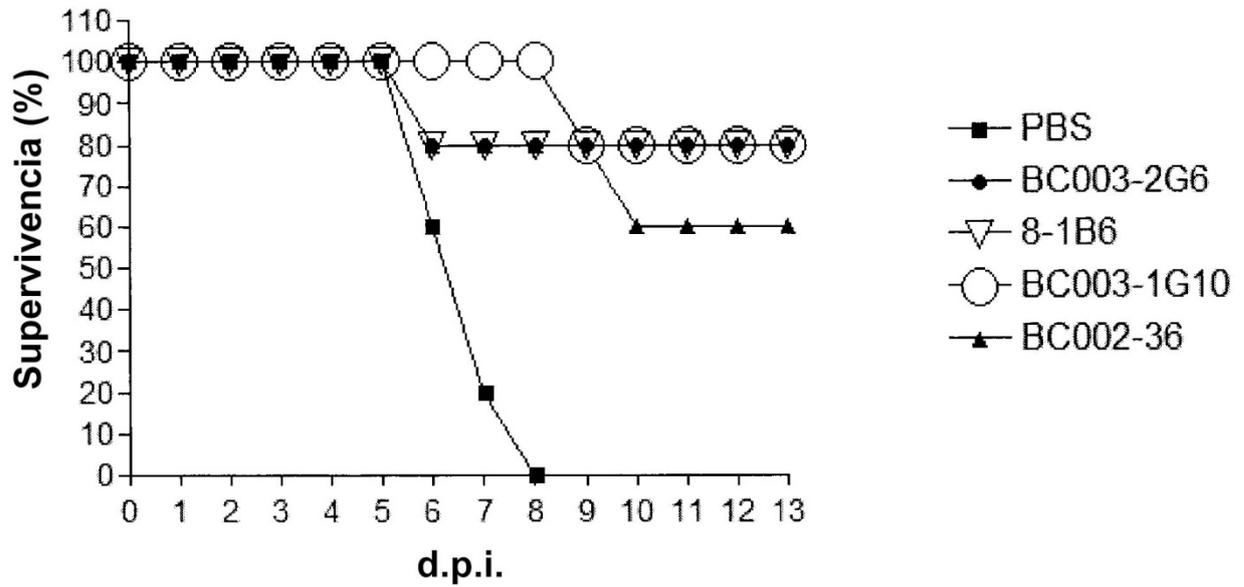


Figura 7 (cont.)

B

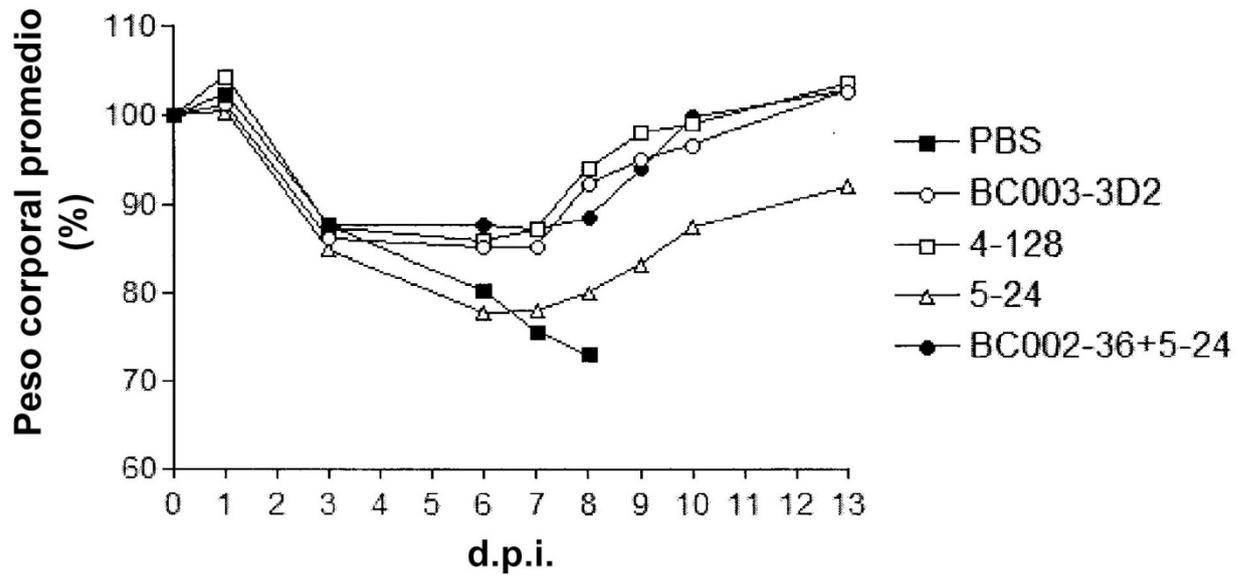
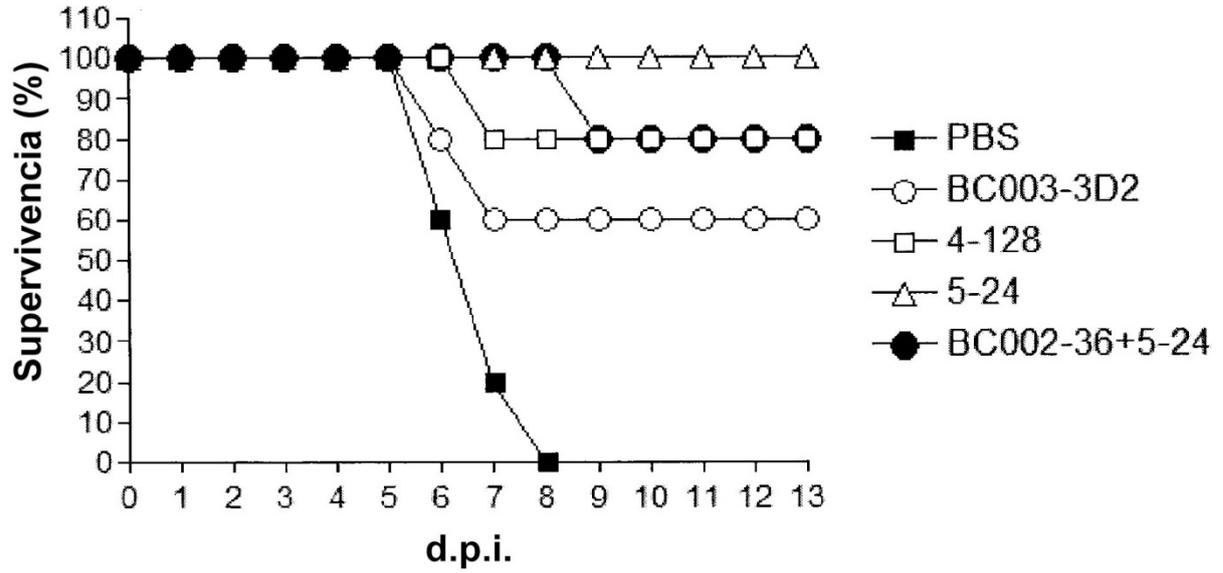


Figura 8

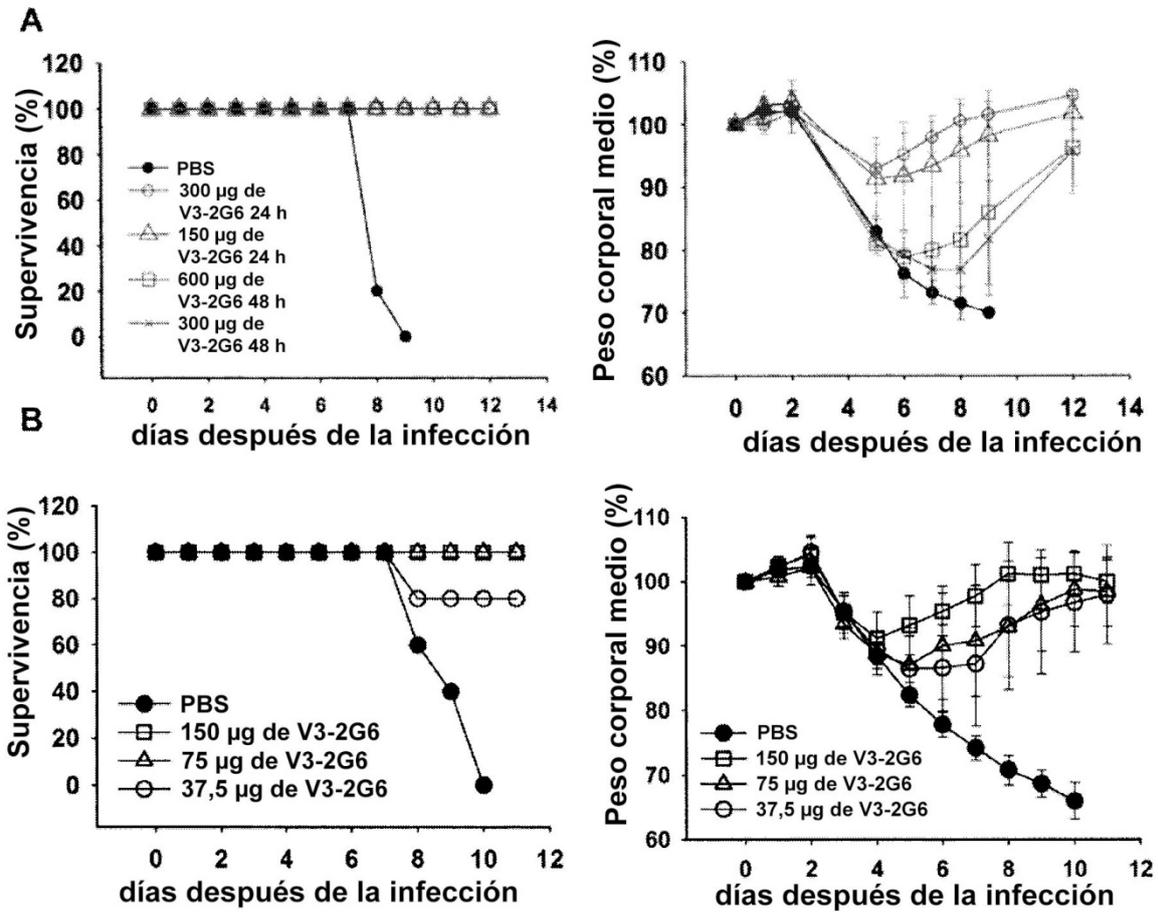
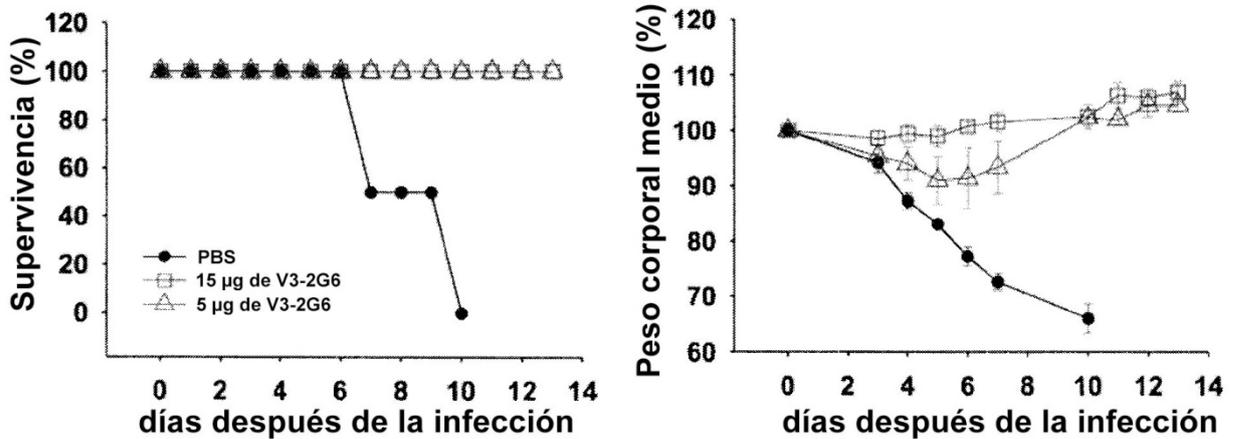


Figura 9

Profilaxis de la infección por H5N1 por mAb, V3-2G6



Profilaxis de la infección por H5N1 por plasma de un sujeto vacunado

