



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1012749-6 A2



(22) Data do Depósito: 06/05/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 17/11/2020

(54) **Título:** MOLÉCULA DE LIGAÇÃO, VARIANTE FUNCIONAL DA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO, IMUNOCONJUGADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO. VETOR, HOSPEDEIRO, E, MÉTODO PARA PRODUIR UMA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO.

(51) **Int. Cl.:** C07K 16/10; A61K 39/42.

(30) **Prioridade Unionista:** 11/05/2009 EP 09159947.2; 11/05/2009 US 61/215890; 20/01/2010 EP 10151155.8.

(71) **Depositante(es):** CRUCELL HOLLAND B.V.

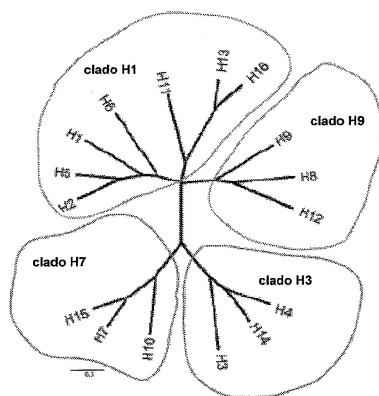
(72) **Inventor(es):** MARK THROSBY; ROBERT HEINZ EDWARD FFIESEN; THEODORUS HENDRIKUS JACOBUS KWAKS; MANDY ANTONIA CATHARINA JONGENEELLEN.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2010056217 de 06/05/2010

(87) **Publicação PCT:** WO 2010/130636 de 18/11/2010

(85) **Data da Fase Nacional:** 19/10/2011

(57) **Resumo:** MOLÉCULA DE LIGAÇÃO, VARIANTE FUNCIONAL DA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO, IMUNOCONJUGADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO, VETOR, HOSPEDEIRO, E, METODO PARA PRODUIR UMA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A presente invenção diz respeito a moléculas de ligação, tais anticorpos monoclonais humanos, que ligam-se ao vírus influenza que compreende HA do subtipo H3, tal como H3N2 e tem um ampla atividade neutralizadora contra tais vírus influenza. A divulgação fornece moléculas de ácido nucléico que codificam os anticorpos, suas sequências e composições que compreendem os anticorpos e métodos de identificar ou produzir os anticorpos. Os anticorpos podem ser usados no diagnóstico, profilaxia e/ou tratamento de uma infecção por vírus influenza H3N2. Em uma forma de realização preferida, os anticorpos fornecem proteção do subtipo cruzado, tal que as infecções com subtipos de influenza com base em H3, H7, e/ou H10 podem ser evitadas e/ou tratadas.



“MOLÉCULA DE LIGAÇÃO, VARIANTE FUNCIONAL DA
MOLÉCULA DE LIGAÇÃO, IMUNOCONJUGADO, COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA, USO DA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO, MOLÉCULA
DE ÁCIDO NUCLÉICO, VETOR, HOSPEDEIRO, E, MÉTODO PARA
5 PRODUZIR UMA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO”

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção diz respeito a medicamento. A invenção, em particular, diz respeito às moléculas de ligação humanas capazes de neutralizar vários subtipos de influenza A, incluindo a neutralização das
10 moléculas de ligação contra vírus influenza que compreendem HA do subtipo H3, tal como vírus influenza H3N2. Em particular, a invenção diz respeito ao diagnóstico, profilaxia e/ou tratamento de uma infecção por um vírus influenza que compreende HA do subtipo H3, em particular vírus influenza H3N2.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os vírus influenza são RNA ortomixovírus e consistem de três tipos, A, B e C. Visto que os vírus influenza dos tipos B e C são predominantemente patogênicos humanos, os vírus influenza A infectam uma ampla variedade de pássaros e mamíferos, incluindo humanos, cavalos,
20 mamíferos marinhos, porcos, furões e galinhas. Em animais, a maioria dos vírus influenza A causam infecções localizadas brandas do trato respiratório e intestinal. Entretanto, também subtipos de influenza A altamente patogênicos, tais como H5N1, existem, que causam infecções sistêmicas em aves domésticas em que a mortalidade pode atingir 100 %. Diversos tipos de vírus
25 influenza A também podem causar doenças graves no homem.

O vírus influenza A pode ser classificado em subtipos fundamentados em variações alélicas em regiões antigênicas de dois genes que codificam as glicoproteínas de superfície, isto é, hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) que são requeridos para a ligação viral e liberação

celular. Outras proteínas virais principais incluem a nucleoproteína, a proteína estrutural de nucleocapsídeo, proteínas de membrana (M1 e M2), polimerases (PA, PB e PB2) e proteínas não estruturais (NS1 e NS2). correntemente, dezesseis de HA (H1-H16) e nove NA (N1-N9) variantes antigênicas são conhecidas no vírus influenza A. Os subtipos de vírus influenza ainda podem ser classificados por referência a seu grupo filogenético. A análise filogenética (Fouchier et al., 2005) demonstrou uma subdivisão de HA's que estão em dois grupos principais (Air, 1981): *inter alia* os subtipos H1, H2, H5 e H9 no grupo filogenético 1 e *inter alia*, os subtipos H3, H4 e H7 no grupo filogenético 2 (Figura 1).

Apenas alguns dos subtipos de influenza A (isto é, H1N1, H1N2 e H3N2) circulam entre as pessoas, mas todas as combinações dos subtipos 16 HA e 9 NA foram identificados em espécies aviárias. Os animais infectados com influenza A frequentemente atuam como um reservatório para o vírus influenza e certos subtipos foram mostrados cruzar a barreira das espécies para seres humanos, tal como a cepa H5N1 de influenza A altamente patogênica.

A infecção por influenza é uma das doenças mais comuns conhecidas pelo homem causando entre três e cinco milhões de casos de e entre 250.000 e 500.000 mortes a cada ano no mundo todo. O influenza dissemina-se rapidamente em epidemias sazonais que afetam de 5 a 15 % da população e a carga nos custos de cuidado com a saúde e as perdas de produtividade são extensivas (World Healthcare Organization (WHO)). A hospitalização e as mortes ocorrem principalmente em grupos de alto-risco (idosos, cronicamente doentes).

As epidemias anuais de influenza ocorrem quando as propriedades antigênicas da proteína de superfície viral HA e NA são alteradas. O mecanismo de antigenicidade alterada é duplo: mudança antigênica, causado pela redistribuição genética entre vírus humanos e animais

após a infecção dupla de células hospedeiras, que podem causar uma pandemia e tendência antigênica causada por mudanças pequenas nas proteínas HA e NA na superfície viral, que pode causar epidemias de influenza. A emergência de cepas de vírus variantes por estes dois mecanismos é a causa da epidemia de influenza. Três vezes no último século, o vírus influenza A sofreu grandes mudanças genéticas, principalmente, em seu componente HA, resultando em pandemias globais e grandes perdas tanto em termos doença e mortes. A pandemia mais infame foi a “Gripe Espanhola”, causada pelo vírus influenza H1N1, que afetou grandes partes da população mundial e é pensado ter matado pelo menos 40 milhões de pessoas em 1918-1919. mais recentemente, duas outras pandemias de influenza A ocorreram, em 1957 (“influenza asiática”, causada por vírus influenza H2N2) e 1968 (“influenza de Hong Kong”, causada pelo vírus influenza H3N2) e causou morbidez e mortalidade significantes globalmente. Em contraste com as epidemias de influenza sazonais correntes, estas epidemias foram associadas com resultados graves também entre pessoas mais jovens saudáveis.

Os métodos correntes para lidar com as epidemias de influenza anuais incluem a vacinação anual, preferivelmente, gerando proteção cruzada heterotípica. Entretanto, como indicado acima, a circulação de vírus influenza em seres humanos está sujeita à mudanças antigênicas permanentes que requerem a adaptação anual da formulação da vacina contra influenza para garantir a igualdade mais próxima possível entre as cepas de vacina contra influenza e as cepas de influenza circulantes.

Embora a vacinação anual com a vacina contra a gripe seja a melhor maneira de prevenir a gripe, medicamentos antivirais, tais como oseltamivir (Tamiflu®) podem ser eficazes para a prevenção e tratamento da gripe. Entretanto, o número de cepas de vírus influenza que apresentam resistência contra tal oseltamivir está aumentando.

Um método alternativo é o desenvolvimento de meios profiláticos ou terapêuticos com base em anticorpo para a neutralização de vários vírus influenza sazonais. O alvo primário de anticorpos neutralizadores que protegem contra a infecção por vírus influenza é a cabeça globular (parte HA1) da proteína HA viral que contém o local de ligação do receptor, mas que está sujeito a continuar a evolução genética com as substituições de aminoácido em locais de ligação de anticorpo (tendência antigênica). Os anticorpos de neutralização cruzada que reconhecem a região de tronco mais conservada de HA de vírus influenza A do grupo filogenético 1 (por exemplo, H1 e H5) foram recentemente identificados (por exemplo, o WO2008/028946). Entretanto, este teve sucesso limitado na identificação de anticorpos que neutralizam um ou mais subtipos de vírus influenza A do grupo filogenético 2, tal como vírus H3 e sua amplitude de neutralização é mais estreita e sua potência baixa.

Os anticorpos que reconhecem especificamente as cepas de vírus influenza H3N2 foram descritos. Desta maneira, um anticorpo monoclonal humano, C28, capaz de ligar e neutralizar diversas cepas de vírus influenza H3N2 dos anos entre 1968 e 1980 foram descritos por Östberg and Pursch (1983). Wang et al. (2010), descreveu um anticorpo murino anti-HA2 que neutraliza os vírus H3 que estendem diversas décadas, mas que não mostrou neutralizar quaisquer vírus de subtipo não H3.

Os anticorpos murinos anti-HA2 reativos cruzados que reconhecem HA do subtipo H3, bem como do subtipo H4 e H7 e capaz de reduzir in vitro a replicação do vírus influenza de vírus influenza H3 e H4 foram descritos por Stropkovská et al., (2009). Foi demonstrado que a acessibilidade dos epítomos HA2 para estes anticorpos nos vírus nativos foi baixa e que os anticorpos têm uma reatividade mais alta com HA após sua clivagem de tripsina e tratamento de pH 5 (Varečková et al., 2003a), que pode explicar a observação que a inibição in vitro de replicação de vírus

(Varečková et al., 2003b), bem como na potência *in vivo* destes anticorpos foi relativamente baixa (Gocník et al., 2007).

No WO 2009/115972, um anticorpo monoclonal humano, Fab28, foi divulgado, que reconhece um epítopo na região de tronco de HA e apresenta uma atividade neutralizadora contra H1N1 mas atividade menos neutralizadora contra H3N2.

Em vista da gravidade da doença respiratória causada por certos vírus influenza A e a característica sempre existente de uma pandemia potencial, também tem o impacto econômico alto das epidemias sazonais, existe uma necessidade contínua para os meios eficazes para a prevenção e tratamento dos vários subtipos de influenza A. Desta maneira, existe uma necessidade para moléculas de ligação, preferivelmente neutralizando amplamente as moléculas de ligação humanas, capazes de neutralizar subtipos de vírus influenza sazonais, incluindo vírus influenza que compreende HA do subtipo H3, preferivelmente H3N2 e que não tem ou tem menos desvantagens dos anticorpos conhecidos na técnica.

A presente invenção fornece estas moléculas de ligação que podem ser usadas no medicamento, em particular, para diagnóstico, prevenção e/ou tratamento de infecção com vírus influenza que compreende HA do subtipo H3, preferivelmente, infecções de H3N2. algumas das moléculas de ligação da invenção são únicos em sua amplitude de atividade neutralizadora dentro do subtipo H3. Desta maneira, algumas das moléculas de ligação identificados aqui são capazes de neutralizar diversos, incluindo pelo menos uma ou mais cepas recentes, as cepas dentro do subtipo de H3N2 e podem ser usados como um agente profilático e/ou de tratamento universal para influenza sazonal, irrespectivo da cepa de influenza H3N2. Pelo menos algumas de uma a molécula de ligação são capazes de evitar *in vitro* a clivagem da molécula de precursor de HA HA0 por tripsina. Além disso, pelo menos algumas das moléculas de ligação da presente invenção são

capazes de evitar a mudança conformacional da proteína HA, pensado estar envolvido na fusão da membrana da membrana viral de influenza e a membrana endossomal de uma célula infectada. Além disso, pelo menos algumas moléculas de ligação da invenção são únicos em que estes são capazes de neutralização reticulada de vírus influenza de pelo menos um outro sub-tipo, incluindo vírus influenza que compreende HA dos subtipos H7 e/ou H10 e, desta maneira, podem ser usados como um agente profilático, de diagnóstico e/ou de tratamento universal para vírus influenza, ainda irrespectivo do subtipo de influenza causativo.

10 DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG. 1 mostra uma árvore filogenética de sequências de aminoácido no nível de subtipo. A divisão dos subtipos por grupos é indicado. O clado H1, que compreende inter alia os subtipos H1 e o clado H9, que compreende os subtipos H9, forma o grupo filogenético 1 e o H7, que compreende inter alia os subtipos H7 e o clado H3, que compreende inter alia os subtipos H3, forma o grupo filogenético 2.

FIG. 2 é um diagrama de barra que mostra a ligação de IgG1 à superfície expressou H3 rHA, medido pela análise FACS, após o tratamento sequencial com tripsina (barras listradas), meio tamponado pH 4,9 (barras brancas sólidas) e DTT (barras cruzadas) e expressado como a porcentagem de ligação ao rHA não tratado (barras pretas sólidas).

FIG. 3 mostra os resultados de um ensaio de suscetibilidade de protease *in vitro*. As amostras foram realizados em um gel de BisTris de 4 a 12 % em tampão de 1x MOPS. As faixas de proteína foram visualizadas por tingimento azul coloidal.

FIG. 4 é uma representação esquemática das conformações diferentes da proteína HA durante o processo de infecção.

FIG. 5 é um diagrama de barras que apresenta ligação do H3 mAbs a células que expressam HA após os tratamentos diferentes medidos

pela análise FACS, após o tratamento sequencial com tripsina (barras listradas), meio tamponado pH 4,9 (barras brancas sólidas) e DTT (barras cruzadas) e expressado como porcentagem de ligação ao rHA não tratado (barras pretas sólidas).

5 FIG. 6 mostra o resultado do curso de tempo do experimento no Exemplo 11. para determinar o tempo de incubação de HA com tripsina para atingir a clivagem de H3 HA.

FIG. 7 mostra os resultados de digestão de tripsina de amostras H3 HA pré-incubadas com mAbs, como descrito no Exemplo 11.

10 FIG. 8 é um diagrama de barra demonstrando que o CR8043 inibe a mudança conformacional induzida por pH em H3 HA.

FIG. 9 mostra que CR8020 e CR8041 também são capazes de bloquear a mudança conformacional induzida por pH de HA: A. mAbs adicionado antes da clivagem de tripsina; B. mAbs adicionado após a clivagem de tripsina; C. mAbs adicionados após todos os tratamentos.

15 FIG. 10 mostra as curvas de probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier. O anticorpo foi administrado intravenosamente no dia -1 antes do desafio usando-se uma faixa de dose de 30 até 1 mg/kg. O controle Ab foi administrado em 30 mg/kg (cinza), seguido por um desafio letal no dia 0 com 25 LD50 A/HK/1/68-MA20 (H3N2). O CR8020 (A) foi testado em um estado separado de CR8041 (B) e CR8043 (C), que foi avaliado no experimento 1. Portanto, o mesmo grupo de anticorpo de controle é usado para B and C.

20 FIG. 11 mostra a mudança de peso corporal média (%) com relação ao dia 0. O anticorpo foi administrado intravenosamente no dia -1 antes do desafio usando-se uma faixa de dose de 30 até 1 mg/kg. O controle Ab foi administrado em 30 mg/kg (cinza), seguido por um desafio letal no dia 0 com 25 LD50 A/HK/1/68-MA20 (H3N2). As barras representam o CI de 95 % da média. Se um camundongo morreu / foi submetido à eutanásia durante o seguimento do estudo, o último peso corporal observado foi carregado

adiante. CR8020 (A) foi testado em um estado separado de CR8041 (B) e CR8043 (C), que foram avaliados no experimento 1. Portanto, o mesmo grupo de anticorpo de controle é usado para B e C.

5 FIG. 12 mostra o registro clínico médio. O anticorpo foi administrado intravenosamente no dia -1 antes do desafio usando-se uma faixa de dose de 30 a 1 mg/kg. O controle Ab foi administrado em 30 mg/kg (cinza), seguido por um desafio letal no dia 0 com 25 LD₅₀ A/HK1/68-MA20 (H3N2). As barras representam as faixas interquartil. CR8020 (A) foi testado em um estudo separado de CR8041 (B) e CR8043 (C), que foram avaliados no experimento 1. Portanto, o mesmo grupo de anticorpo de controle é usado para B e C. Explicação do registro clínico: 0 = nenhum sinal clínico; 1 = revestimento bruto; 2 = revestimento bruto, menos reativo, manuseio durante passivo; 3 = revestimento bruto, enrolado, respiração forçada, manuseio durante passivo; 4 = revestimento bruto, enrolado, respiração forçada, não enrola-se novamente no estômago quando está na sua parte posterior. Os camundongos observados com o registro clínico 4 foram submetidos à eutanásia no mesmo dia.

15 FIG. 13 demonstra a eficácia terapêutica de mAb CR8020 no modelo de desafio letal de camundongo com influenza A/HK/1/68-MA20 (H3N2). Uma dose simples de mAb CR8020 (15 mg/kg) foi administrado intravenosamente no dia -1 pré-desafio ou no dia 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 pós desafio em camundongos 129X1/SvJ (n = 10 /grupo). O mAb controle (15 mg/kg) foi administrado no dia 1 pós desafio. Os camundongos foram desafiados no dia 0 com 25 LD₅₀ A/HK/1/68-MA20 (H3N2) e monitorado por 21 dias. Painel A: curvas de probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier. Painel B: Mudança de peso corporal médio (%) com relação ao dia 0. As barras representam os 95 % de CI da média. Se um camundongo morreu / foi submetido à eutanásia durante o seguimento do estudo, o último peso corporal observado foi realizado adiante. Painel C: Registro clínico médio. As barras

representam as faixas interquartil. 0 = nenhum sinal clínico; 1 = revestimento bruto; 2 = revestimento bruto, menos reativo, manuseio durante passivo; 3 = revestimento bruto, enrolado, respiração forçada, manuseio durante passivo; 4 = revestimento bruto, enrolado, respiração forçada, não enrola-se novamente no estômago quando deixado na sua parte posterior. Os camundongos observados com o registro clínico 4 foram submetidos à eutanásia no mesmo dia.

FIG. 14 mostra a eficácia profilática de mAb CR8020 no modelo do desafio letal de camundongo com influenza adaptado ao camundongo A/CH/NL/621557/03 (H7N7). A: curvas de probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier. Painel B: Mudança de peso corporal médio (%) com relação ao dia 0. As barras representam os 95 % de CI da média. Se um camundongo morreu / foi submetido à eutanásia durante o seguimento do estudo, o último peso corporal observado foi realizado adiante. Painel C: Registro clínico médio. As barras representam as faixas interquartil. 0 = nenhum sinal clínico; 1 = revestimento bruto; 2 = revestimento bruto, menos reativo, manuseio durante passivo; 3 = revestimento bruto, enrolado, respiração forçada, manuseio durante passivo; 4 = revestimento bruto, enrolado, respiração forçada, não enrola-se novamente no estômago quando deixado na sua parte posterior. Os camundongos observados com o registro clínico 4 foram submetidos à eutanásia no mesmo dia.

FIG. 15 mostra a eficácia profilática de mAbs CR8020, CR8041 e CR8043 no modelo do desafio letal de camundongo com influenza adaptado ao camundongo A/CH/NL/621557/03 (H7N7) MAb foram administrados intravenosamente no dia -1 antes do desafio em camundongos Balb/c fêmeas (n = 8/grupo) usando-se uma faixa de dose de 10 a 1 mg/kg (CR8020) ou 30 a 1 mg/kg (CR8041 e CR8043). O mAb controle foi administrado no dia -1 em 30 mg/kg (cinza). No dia 0, um desafio letal foi dado pela inoculação intranasal com 25 camundongos LD₅₀ adaptados

A/CH/NL/621557/03 (H7N7) e os camundongos foram subsequentemente monitorados por 21 dias. Painel A: curvas de probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier. Painel B: Mudança de peso corporal médio (%) com relação ao dia 0. As barras representam os 95 % de CI da média. Se um camundongo morreu / foi submetido à eutanásia durante o seguimento do estudo, o último peso corporal observado foi realizado adiante. Painel C: Registro clínico médio. As barras representam as faixas interquartil. 0 = nenhum sinal clínico; 1 = revestimento bruto; 2 = revestimento bruto, menos reativo, manuseio durante passivo; 3 = revestimento bruto, enrolado, respiração forçada, manuseio durante passivo; 4 = revestimento bruto, enrolado, respiração forçada, não enrola-se novamente no estômago quando deixado na sua parte posterior. Os camundongos observados com o registro clínico 4 foram submetidos à eutanásia no mesmo dia.

FIG. 16 mostra a eficácia terapêutica de mAb CR8020 no modelo do desafio letal de camundongo com influenza adaptado ao camundongo A/CH/NL/621557/03 (H7N7). Uma dose simples de mAb CR8020 (15 mg/kg) foi administrado intravenosamente no dia -1 pré-desafio ou no dia 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 pós desafio em camundongos Balb/c fêmeas (n = 8/grupo). O mAb controle (15 mg/kg) foi administrado no dia 1 pós desafio. Os camundongos foram desafiados no dia 0 com 25 camundongos LD₅₀ adaptados A/CH/NL/621557/03 (H7N7) e monitorado por 21 dias. Painel A: curvas de probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier. Painel B: Mudança de peso corporal médio (%) com relação ao dia 0. As barras representam os 95 % CI da média. Se um camundongo morreu / foi submetido à eutanásia durante o seguimento do estudo, o último peso corporal observado foi realizado adiante. Painel C: Registro clínico médio. As barras representam as faixas interquartil. 0 = nenhum sinal clínico; 1 = revestimento bruto; 2 = revestimento bruto, menos reativo, manuseio durante passivo; 3 = revestimento bruto, enrolado, respiração forçada, manuseio durante passivo; 4

= revestimento bruto, enrolado, respiração forçada, não enrola-se novamente no estômago quando deixado na sua parte posterior. Os camundongos observados com o registro clínico 4 foram submetidos à eutanásia no mesmo dia.

5 DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

As definições de termos como usado na invenção são dadas abaixo.

O termo “incluído” ou “incluindo” como usado neste é jugado ser seguido pelas palavras “sem limitação”.

10 Como usado neste, o termo “molécula de ligação” refere-se a uma imunoglobulina intacta incluindo anticorpos monoclonais, tais como anticorpos quiméricos, humanizados ou anticorpos humanos monoclonais ou a um domínio de ligação de antígeno e/ou variável que compreende fragmento de uma imunoglobulina que compete com a imunoglobulina intacta para a ligação específica ao parceiro de ligação da imunoglobulina, por exemplo, H3. com respeito à estrutura, o fragmento de ligação de antígeno liga-se como mesmo antígeno que é reconhecidos pela imunoglobulina intacta. Um fragmento de ligação de antígeno pode compreender um peptídeo ou polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido de pelo menos 2,
15 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200 ou
20 250 resíduos de aminoácidos contíguos da sequência de aminoácido da molécula de ligação.

O termo “molécula de ligação”, como usado aqui inclui todas as classes e subclasses de imunoglobulina conhecidos na técnica. Dependendo da sequência de aminoácido do domínio constante e suas cadeias pesadas, as moléculas de ligação podem ser divididas em classes principais de anticorpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM e diversos destes ainda podem ser divididos em subclasses (isotipos), por exemplo, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Os fragmentos de ligação de antígeno incluem, *inter alia*, Fab,

F(ab'), F(ab')₂, Fv, dAb, Fd, fragmentos de região determinadores de complementaridade (CDR), anticorpos de cadeia simples (scFv), anticorpos de cadeia simples bivalentes, anticorpos de fago de cadeia simples, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, (poli)peptídeos que contêm pelo menos um fragmento de uma imunoglobulina que é suficiente para conferir ligação de antígeno específica ao (poli)peptídeo, etc. Os fragmentos acima podem ser produzidos de maneira sintética ou pela clivagem química ou enzimática de imunoglobulinas intactas ou estes podem ser geneticamente projetadas pelas técnicas de DNA recombinantes. Os métodos de produção são bem conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, in *Anticorpos: A Laboratory Manual*, Editado por: E. Harlow and D, Lane (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, que é incorporado neste por referência. A molécula de ligação ou seu fragmento de ligação de antígeno podem ter um ou mais locais de ligação. Se houver mais do que um local de ligação, os locais de ligação podem ser idênticos um ao outro ou estes podem ser diferentes.

A molécula de ligação pode ser uma molécula de ligação molécula de ligação exposta ou não conjugada mas também pode ser parte de um imunoconjugado. A molécula de ligação exposta ou não conjugada é pretendida referir-se a uma molécula de ligação que não é conjugada, operacionalmente ligada ou, de outra maneira física ou funcionalmente associada com uma porção ou rótulo atuadores, tal como *inter alia*, uma substância tóxica, uma substância radioativa, um lipossoma, uma enzima. Será entendido que as moléculas de ligação expostas ou não conjugadas não excluem as moléculas de ligação que foram estabilizadas, multimerizadas, humanizadas ou de qualquer outra maneira manipuladas, outras que não pela ligação de uma porção ou rótulo atuadores. Conseqüentemente, todas as moléculas de ligação expostas e não conjugadas modificadas pós-tradução estão incluídas neste, incluindo quando as especificações são feitas no

ambiente de célula que produz molécula de ligação natural, por uma célula de produção de molécula de ligação recombinante e são introduzidos pela mão do homem após a preparação de molécula de ligação inicial. É claro, o termo molécula de ligação exposta ou não conjugada não exclui a capacidade da molécula de ligação para formar as associações funcionais com as células atuadoras e/ou moléculas após a administração ao corpo, quando algumas de tais interações são necessárias a fim de exercer um efeito biológico. A perda de grupo ou rótulo atuadores associados é portanto, aplicada na definição para a molécula de ligação exposta ou não conjugada *in vitro*, não *in vivo*.

Como usado neste, o termo “amostra biológica” abrange uma variedade de tipos de amostra, incluindo sangue e outras amostras líquidas de origem biológica, amostras de tecido sólido, tais como espécimes de biópsia ou culturas de tecido ou células derivadas destes e a sua progênie. O termo também inclui amostras que foram manipuladas de qualquer maneira após sua obtenção, tal como pelo tratamento com reagentes, solubilização ou enriquecimentos para certos compostos, tais como proteínas ou poid nucleotídeos. O termo abrange vários tipos de amostras clínicas obtidas a partir de quaisquer espécies e também inclui células na cultura, sobrenadantes celulares e lisados celulares.

O termo “regiões determinadoras de complementaridade” (CDR) como usado aqui significa sequências dentro das regiões variáveis de moléculas de ligação, tais como imunoglobulinas, que contribuem usualmente até certo ponto ao local de ligação de antígeno que é complementar em forma e distribuição de cargas ao epítipo reconhecido no antígeno. As regiões de CDR podem ser específicas para epítipos lineares, epítipos descontínuos ou epítipos conformacionais de proteínas ou fragmentos de proteína, quando presente na proteína em sua conformação natural ou, em alguns casos, quando presente nas proteínas quando desnaturadas, por exemplo, pela solubilização em SDS. Os epítipos também podem consistir de modificação pós-tradução

de proteína.

O termo “anulação”, como usado neste, indica uma mudança na sequência de aminoácido ou nucleotídeo em que um ou mais resíduos de aminoácido ou nucleotídeo, respectivamente, estão ausentes em comparação com a referência, frequentemente, a molécula de ocorrência natural.

O termo “sequência de ácido nucléico reguladora de expressão” como usado neste refere-se às sequências de polipeptídeo necessárias para e/ou afetam a expressão de uma sequência codificadora operacionalmente ligada em um organismo hospedeiro particular. As sequências de ácido nucléico reguladoras de expressão, tais como *inter alia* iniciação de transcrição apropriada, terminação, promotor, sequências intensificadoras; sequências repressoras ou ativadoras; sinais de processamento de RNA eficientes, tais como sinais de união e de poliadenilação; sequências que estabilizam o mRNA citoplásmico; sequências que intensificam a eficiência de tradução (por exemplo, locais de ligação de ribossomo); sequências que intensificam a estabilidade da proteína e quando desejado, sequências que intensificam a secreção de proteína, pode ser qualquer sequência de aminoácido que apresente atividade no organismo hospedeiro de escolha e pode ser derivado de genes que codificam proteínas, que são homólogos ou heterólogos ao organismo hospedeiro. A identificação e a utilização de sequências reguladoras de expressão é de rotina para a pessoa habilitada na técnica.

O termo “variante funcional”, como usado neste, refere-se a uma molécula de ligação que compreende um nucleotídeo e/ou sequência de aminoácido que é alterada por um ou mais nucleotídeos e/ou aminoácidos em comparação com o nucleotídeo e/ou sequências de aminoácido da molécula de ligação de referência e que é capaz de competir para a ligação ao parceiro de ligação, por exemplo, H3N2, com a molécula de ligação de referência. Em outras palavras, as modificações na sequência de aminoácido e/ou nucleotídeo

da molécula de ligação de referência não afeta ou altera significativamente as características de ligação da molécula de ligação codificada pela sequência de nucleotídeo ou contendo a sequência de aminoácido, isto é, a molécula de ligação ainda é capaz de reconhecer e ligar seu alvo. A variante funcional pode ter modificações de sequência conservativas incluindo substituições, adições e anulações de nucleotídeo e de aminoácido. Estas modificações podem ser introduzidas por técnicas padrão conhecidas na técnica, tais como mutagênese direcionada ao local e mutagênese mediada por PCR aleatória e podem compreender nucleotídeos e aminoácidos naturais bem como não naturais.

As substituições de aminoácido conservativas incluem as em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido tendo propriedades estruturais ou químicas similares. As famílias de resíduos de aminoácidos tendo cadeias secundárias similares foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias secundárias básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias secundárias ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias secundárias polares não carregadas (por exemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias secundárias não polares (por exemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias secundárias ramificadas beta (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias secundárias aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano). Estará claro para o técnico habilitado que outras classificações de famílias de resíduo de aminoácido que não a usada acima também podem ser utilizadas. Além disso, uma variante pode ter substituições de aminoácido não conservativas, por exemplo, substituição de um aminoácido com um resíduo de aminoácido tendo propriedades estruturais ou químicas diferentes. As variações menores similares também podem incluir anulações ou inserções de aminoácido ou ambas. Orientação na determinação que os resíduos de

aminoácido podem ser substituídos, inseridos ou anulados sem abolir a atividade imunológica pode ser observada usando-se programas de computador bem conhecidos na técnica.

Uma mutação em uma sequência de nucleotídeo pode ser uma alteração simples feitas em um local (um ponto de mutação), tal como mutações de transição ou transversão ou, alternativamente, os nucleotídeos múltiplos podem ser inseridos, anulados ou mudados em um local simples. Além disso, uma ou mais alterações podem ser feitas em qualquer número de locais dentro de uma sequência de nucleotídeo. As mutações podem ser realizadas por qualquer método conhecido na técnica.

O termo “subtipo de vírus influenza” como usado aqui refere-se às variantes de vírus influenza A que são caracterizados por várias combinações da hemaglutinina (H) e proteínas de superfície viral de neuramidase (N). De acordo com a presente invenção, os subtipos de vírus influenza podem ser referidos por seu número H, tal como por exemplo “vírus influenza que compreende HA do subtipo H3” ou “influenza H3” ou uma combinação de um número H e um número N, tal como por exemplo “vírus influenza subtipo H3N2” ou “H3N2”. O termo “subtipo” inclui especificamente todos os indivíduos “cepas” dentro de cada subtipo, que usualmente resulta das mutações e apresentam perfis patogênicos diferentes. Tais cepas também podem ser referidas como vários “isolados” de um subtipo viral. Consequentemente, como usado neste, os termos “cepas” e “isolados” podem ser usados de maneira intercambiável. A nomenclatura corrente para cepas de vírus influenza humanos ou isolados incluem a localização geográfica do primeiro isolamento, o número da cepa e o ano de isolamento, usualmente com a descrição antigênica de HA e NA dado em parênteses, por exemplo, A/Moscow/10/00 (H3N2). As cepas não humanas também incluem o hospedeiro de origem na nomenclatura.

Os subtipos de vírus influenza ainda podem ser classificados

por referência a seu grupo filogenético. A análise filogenética (Fouchier et al., 2005) demonstrou uma subdivisão de HA's que estão em dois grupos principais (Air, 1981): *inter alia*, os subtipos H1, H2, H5 e H9 subtipos no grupo filogenético 1 e *inter alia*, os subtipos H3, H4 e H7 no grupo filogenético 2 (Figura 1).

O termo “neutralização” como usado neste em relação às moléculas de ligação da invenção refere-se as moléculas de ligação que inibem vírus influenza de infectar replicantemente uma célula alvo, com respeito ao mecanismo pelo qual a neutralização é atingida. Desta maneira, a neutralização pode, por exemplo, ser atingida pela inibição da ligação ou adesão do vírus à superfície celular ou pela inibição da fusão de membranas virais e celulares seguindo a ligação do vírus à célula alvo e outros.

O termo “neutralização cruzada” como usado neste com relação às moléculas de ligação da invenção refere-se à capacidade das moléculas de ligação da invenção neutralizarem o vírus influenza A de subtipos diferentes, tais como, por exemplo, vírus influenza que compreende HA do subtipo H3, H7 e/ou H10.

O termo “hospedeiro”, como usado neste, é pretendido referir-se a um organismo ou a uma célula em que um vetor, tal como um vetor de clonagem ou um vetor de expressão foi introduzido. O organismo ou célula podem ser procarióticos ou eucarióticos. Preferivelmente, os hospedeiros isolaram as células hospedeiras, por exemplo, células hospedeiras na cultura. O termo “células hospedeiras” meramente significa que as células são modificadas para a (super)-expressão das moléculas de ligação da invenção e incluem células B que originalmente expressam estas moléculas de ligação e que as células foram modificadas para super-expressar a molécula de ligação por imortalização, amplificação, intensificação de expressão etc. Deve ser entendido que o termo hospedeiro é pretendido referir-se não apenas ao organismo ou célula de objetivo particular mas também à progênie de um tal

organismo ou célula. Por causa de certas modificações, poderem ocorrer em gerações que vêm depois devido à sua mutação ou influências ambientais, tal progênie, de fato, poderão ser idêntica ao organismo ou célula precursores, mas ainda estão incluídos dentro do escopo do termo “hospedeiro” como usado neste.

O termo “humano”, quando aplicado as moléculas de ligação como definido neste, refere-se as moléculas que são diretamente derivadas de uma sequência humana ou com base em uma humana. Quando a molécula de ligação é derivada de ou fundamentada em uma sequência humana e subsequentemente modificada, ainda deve ser considerada humana como usado por todo o relatório descritivo. Em outras palavras, o termo humano, quando aplicado as moléculas de ligação é pretendido incluir moléculas de ligação tendo regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina de linha germinativa humana ou com base em regiões variáveis ou constantes que ocorrem em um ser humano ou linfócito humano e modificado de alguma forma. Desta maneira, as moléculas de ligação humanas podem incluir resíduos de aminoácido não codificados por sequência de imunoglobulina de linha germinativa humana, compreendem substituições e/ou anulações (por exemplo, mutações introduzidas por, por exemplo, mutagênese aleatória ou específica de local *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*). “Com base em” como usado neste refere-se à situação que uma sequência de ácido nucléico pode ser exatamente copiada a partir de um padrão ou com mutações menores, tais como, por métodos de PCR propensos ao erro ou feitos sinteticamente comparando-se o padrão exatamente ou com modificações menores. As moléculas semi-sintéticas com base em sequências humanas também são consideradas serem humanas como usado neste.

O termo “inserção”, também conhecido como o termo “adição”, indica uma mudança em uma sequência de aminoácido ou nucleotídeo que resulta na adição de um ou mais resíduos de nucleotídeo ou

aminoácido, respectivamente, em comparação com a sequência precursora.

O termo “isolado”, quando aplicado às moléculas de ligação como definido aqui, refere-se as moléculas de ligação que são substancialmente isentas de outras proteínas ou polipeptídeos, particularmente livres de outras moléculas de ligação tendo especificidades antigênicas diferentes e também são substancialmente isentas de outros materiais celulares ou produtos químicos. Por exemplo, quando as moléculas de ligação são recombinantemente produzidas, estas são, preferivelmente substancialmente isentas de componentes de meio de cultura e quando as moléculas de ligação são produzidas pela síntese química, estes são, preferivelmente, substancialmente isentos de precursores químicos ou outros produtos químicos, isto é, estes são separados dos precursores químicos ou outros produtos químicos que estão envolvidos na síntese da proteína. O termo “isolado” quando aplicado às moléculas de ácido nucléico que codificam as moléculas de ligação como definido aqui, é pretendido referir-se às moléculas de ácido nucléico em que as sequências de nucleotídeo que codificam as moléculas de ligação são livres de outras sequências de nucleotídeo, particularmente sequências de nucleotídeo que codificam as moléculas de ligação que ligam os outros parceiros de ligação que não H5N1. Além disso, o termo “isolado” refere-se às moléculas de ácido nucléico que são substancialmente separadas de outros componentes celulares que acompanham naturalmente a molécula de aminoácido natural em seu hospedeiro natural, por exemplo, ribossomas, polimerases ou sequências genômicas com as quais este está naturalmente associado. Além disso, as moléculas de ácido nucléico “isoladas”, tais como moléculas de cDNA, podem ser substancialmente isentas de outro material celular ou meio de cultura quando produzido por técnicas recombinantes ou substancialmente isentas de precursores químicos ou outros produtos químicos quando quimicamente sintetizados.

O termo “anticorpo monoclonal” como usado neste refere-se a uma preparação de moléculas de anticorpo de especificidade simples. Um anticorpo monoclonal apresenta uma especificidade de ligação e de afinidade simples para um epítopo particular. Conseqüentemente, o termo “anticorpo monoclonal humano” refere-se a um anticorpo que apresenta uma especificidade de ligação simples que tem regiões variáveis e constantes derivadas de ou fundamentadas em sequências de imunoglobulina de linha germinativa humana ou derivadas de sequências completamente sintéticas. O método de preparar o anticorpo monoclonal não é relevante para a especificidade de ligação.

O termo “ocorrência natural” como usado neste quando aplicado a um objeto refere-se ao fato de que um objeto pode ser encontrado em estado natural. Por exemplo, uma sequência de polipeptídeo ou de polinucleotídeo que está presente em um organismo que pode ser isolado a partir de uma fonte em estado natural e que não foi intencionalmente modificada pelo homem em laboratório é de ocorrência natural.

O termo “molécula de ácido nucléico” como usado na presente invenção refere-se a uma forma polimérica de nucleotídeos e inclui filamentos tanto sentido quanto não sentido de RNA, cDNA, DNA genômico e formas sintéticas e polímeros mistos do acima. Um nucleotídeo refere-se a um ribonucleotídeo, desoxinucleotídeo ou um forma modificada de cada tipo de nucleotídeo. O termo também inclui formas de filamento simples e duplo de DNA. Além disso, um polinucleotídeo podem incluir cada um ou ambos os nucleotídeos de ocorrência natural ou modificados ligados juntos por ligações de nucleotídeo de ocorrência natural ou de ocorrência não natural. As moléculas de ácido nucléico podem ser modificadas de maneira química ou bioquímica ou podem conter nucleotídeos base não naturais ou derivados, como será facilmente estimado por aqueles de habilidade comum na técnica. Tais modificações incluem, por exemplo, rótulos, metilação, substituição de

um ou mais dos nucleotídeos de ocorrência natural com um análogo, modificações internucleotídeo, tais como ligações não carregadas (por exemplo, fosfonatos de metila, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), ligações carregadas (por exemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), porções pendentes (por exemplo, polipeptídeos), intercaladores (por exemplo, acridina, psoralen, etc.), queladores, alquiladores e ligações modificadas (por exemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). o termo acima também é pretendido incluir qualquer conformação topológica, incluindo conformações de filamento simples, de filamento duplo, parcialmente na forma de duplex, triplex, na forma de grampo de cabelo, circular e na forma de cadeado. Também estão incluídas moléculas sintéticas que imitam polinucleotídeos em sua capacidade de ligação a uma sequência projetada por intermédio da ligação de hidrogênio e outras interações químicas. Tais moléculas são conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, aquelas em que as ligações de peptídeo substituem as ligações de fosfato na cadeia principal da molécula. Uma referência a uma sequência de ácido nucleico abrange seu complemento a não ser que especificado de outra maneira. Desta maneira, uma referência a uma molécula de ácido nucleico tendo uma sequência particular deve ser entendida abranger seu filamento complementar, com sua sequência complementar. O filamento complementar também é útil, por exemplo, para a terapia anti-sentido, sondas de hibridização e iniciadores de PCR.

O termo “operacionalmente ligado” refere-se a dois ou mais elementos de sequência de ácido nucleico que são, de maneira usual, ligados fisicamente e estão em uma relação funcional um com o outro estão em uma relação funcional um com o outro. Por exemplo, um promotor é operacionalmente ligado a uma sequência codificadora, se o promotor for capaz de iniciar ou regular a transcrição ou expressão de uma sequência codificadora, caso no qual a sequência codificadora deve ser entendida como estando “sob o controle” do promotor.

Por “excipiente farmacologicamente aceitável” é entendida qualquer substância inerte que é combinada com uma molécula ativa, tal como um medicamento, agente ou molécula de ligação para a preparação de uma forma de dosagem agradável ou conveniente. O “excipiente farmacologicamente aceitável” é um excipiente que é não tóxico a receptores nas dosagens e concentrações utilizadas e é compatível com outros ingredientes da formulação que compreendem o medicamento, agente ou molécula de ligação. Os excipientes farmacologicamente aceitáveis são amplamente aplicados na técnica.

10 O termo “ligação específica”, como usado neste, em referência à interação da molécula de ligação, por exemplo, um anticorpo e seu parceiro de ligação, por exemplo, um antígeno, significa que a interação é dependente da presença de uma estrutura particular, por exemplo, um determinante antigênico ou epítopo, no parceiro de ligação. Em outras palavras, o anticorpo
15 liga-se preferivelmente ou reconhece o parceiro de ligação mesmo quando o parceiro de ligação está presente em uma mistura de outras moléculas ou organismos. A ligação pode ser mediada por interações covalentes ou não covalentes ou uma combinação de ambas. Ainda em outras palavras, o termo “ligação específica” significa ligação imuno-específica a um determinante ou
20 epítopo antigênicos e não ligação imuno-específica a outros determinantes ou epítopos antigênicos. A molécula de ligação que liga-se imuno-especificamente a um antígeno pode ligar-se a outros peptídeos ou polipeptídeos com afinidade mais baixa quando determinado por, por exemplo, radioimunoensaios (RIA), os ensaios imunosorventes ligados por
25 enzima (ELISA), BIACORE ou outros ensaios conhecidos nanotécnica. As moléculas de ligação ou seus fragmentos que ligam-se imuno-especificamente a um antígenos podem ser reativos cruzados com os antígenos relacionados, que carregam o mesmo epítopo. Preferivelmente, as moléculas de ligação ou seus fragmentos que ligam-se imuno-especificamente a um antígeno não

reagem com outros antígenos.

Uma “substituição”, como usado neste, indica a substituição de um ou mais aminoácidos ou nucleotídeos por diferentes aminoácidos ou nucleotídeos, respectivamente.

5 O termo “quantidade terapêuticamente eficaz” refere-se a uma quantidade da molécula de ligação como definido aqui sendo eficaz para evitar, melhorar e/ou tratar uma condição que resulta da infecção com influenza do subtipo H3. A melhora como usada aqui, pode referir-se à
10 redução de sintomas de doença visíveis ou perceptíveis, vire mais ou qualquer outra manifestação mensurável de infecção por influenza.

O termo “tratamento” refere-se ao tratamento terapêutico bem como profilático ou medidas preventivas para curar ou interromper ou pelo menos retardar o progresso da doença. Aqueles em necessidade de tratamento já inflingidos por uma condição que resulta da infecção por vírus influenza
15 que compreende HA do subtipo H3 bem como aqueles em que a infecção por vírus influenza que compreende HA do subtipo H3 deve ser evitada. Os pacientes total ou parcialmente recuperados da infecção com influenza H3 também devem estar em necessidade de tratamento. A prevenção abrange a
20 inibição ou redução da disseminação de vírus influenza que compreende HA do subtipo H3 ou inibição ou redução do início, desenvolvimento ou progressão de um ou mais dos sintomas associados com a infecção por influenza H3.

O termo “vetor” indica uma molécula de ácido nucléico em que uma segunda molécula de ácido nucléico pode ser inserida para a
25 introdução em um hospedeiro onde este será replicado e, em alguns casos expressado. Em outras palavras, um vetor é capaz de transportar uma molécula de ácido nucléico à qual este será ligado. A clonagem, bem como os vetores de expressão são considerados pelo termo “vetor”, como usado neste. Os vetores incluem, mas não são limitados a, plasmídeos, cosmídeos,

cromossomos artificiais bacterianos (BAC) e cromossomos artificiais de levedura (YAC) e vetores derivados de bacteriófagos ou vírus vegetais ou animais (incluindo humano). Os vetores compreendem uma origem de replicação reconhecida pelo hospedeiro proposto e no caso de vetores de expressão, promotor e outras regiões reguladoras reconhecidas pelo hospedeiro. Um vetor contendo uma segunda molécula de ácido nucléico é introduzido em uma célula por transformação, transfecção ou usando-se mecanismos de entrada viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em um hospedeiro em que estes são introduzidos (por exemplo, vetores tendo uma origem bacteriana de replicação pode replicar-se em bactérias). Outros vetores podem ser integrados no genoma de um hospedeiro na introdução no hospedeiro e, desse modo, são replicados juntos com o genoma do hospedeiro.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção fornece as moléculas de ligação humanas capazes de ligação específica às cepas de vírus influenza que compreendem HA do subtipo H3, incluindo H3N2 e que apresentam atividade neutralizadora contra tais vírus influenza. Em uma forma de realização, as moléculas de ligação da invenção são únicas sendo capazes de neutralizar diversas cepas, incluindo uma ou mais recentes, , preferivelmente todas as cepas conhecidas, de vírus influenza subtipo H3, o subtipo epidêmico mais comum em seres humanos, com potência alta. Em uma forma de realização, as moléculas de ligação ligam-se a um epítipo conservado na região de tronco da proteína H3 HA. Em uma forma de realização, as moléculas de ligação têm atividade inibidora de hemaglutinina. Em uma forma de realização, as moléculas de ligação são capazes de evitar a clivagem in vitro da molécula precursora de HA HA0. Em uma forma de realização, as moléculas de ligação da presente invenção são capazes de evitar a mudança conformacional da proteína HA requerida para a fusão da membrana viral de influenza com a membrana endossômica de uma

célula infectada.

A invenção também fornece moléculas de ligação que ligam-se a um epítipo na proteína de hemaglutinina que é dividida entre subtipos de influenza dentro do grupo filogenético 2 ao qual os subtipos H3 pertencem e, portanto, dizem respeito às moléculas de ligação que reagem entre subtipos com base em influenza H3, H7 e/ou H10 e outros subtipos de influenza que contêm a proteína HA com estes epítipos particulares, preferivelmente todos os subtipos do grupo filogenético 2. Diversas moléculas de ligação da presente invenção são, desta maneira, únicas em que estas possuem atividade de neutralização cruzada contra um ou mais outros subtipos de vírus influenza A, tais como vírus influenza que compreende HA do subtipo H7 e/ou H10. Preferivelmente, as moléculas de ligação da presente invenção são capazes de neutralizar todos subtipos de vírus influenza do grupo filogenético 2, que abrange os subtipos H3, H7 e H10 e, desta maneira, podem ser usados como um agente profilático, de diagnóstico e/ou de tratamento universal para vírus influenza que pertence ao grupo filogenético 2, ainda irrespectivo o influenza subtipo causativo dentro daquele grupo filogenético.

É suposto que as moléculas de ligação de acordo com a presente invenção ligam-se a epítipos conservados até agora desconhecidos que não são ou são muito menos propensos à tendência ou mudança antigênica. Em consequência, também é considerado usar as moléculas de ligação da invenção para identificar e/ou caracterizar estes epítipos. A invenção também diz respeito às moléculas de ácido nucléico que codificam pelo menos a região de ligação das moléculas de ligação humanas. A invenção ainda diz respeito ao uso das moléculas de ligação humanas da invenção na profilaxia e/ou tratamento de um paciente tendo ou em risco de desenvolver, uma infecção por influenza H3, tal como uma infecção de influenza H3N2. Além disso, a invenção diz respeito ao uso das moléculas de ligação humanas da invenção no diagnóstico/detecção de tal infecção por

influenza.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Em um primeiro aspecto, a presente invenção abrange moléculas de ligação capazes de ligar especificamente a e tendo atividade neutralizadora contra vírus influenza A, particularmente vírus influenza A que compreende HA do subtipo H3, em particular H3N2. Preferivelmente, as moléculas de ligação são as moléculas de ligação humanas. Em uma forma de realização, as moléculas de ligação da invenção são capazes de ligação específica a e/ou têm atividade neutralizadora contra diversas cepas de vírus influenza H3N2, preferivelmente duas ou mais cepas H3N2 diferentes, mais preferivelmente três ou mais, mais preferivelmente quatro ou mais, mais preferivelmente cinco ou mais cepas de H3N2 diferentes. As cepas podem ser obtidas tanto de seres humanos quanto de animais não humanos, por exemplo, pássaros. Em uma forma de realização, as moléculas de ligação ligam-se a e neutralizam pelo menos uma ou mais das cepas de H3N2 recentes selecionadas do grupo que consiste de A/Wisconsin/67/2005, A/Hiroshima/52/2005, A/Panama/2007/99 e A/Johannesburg/33/94. Em uma outra forma de realização, as moléculas de ligação também ligam-se a e neutralizam a cepa de H3N2 A/Hong Kong/1/68. Mais preferivelmente, as moléculas de ligação ligam-se a e têm atividade neutralizadora contra todas as cepas de influenza H3N2 dos anos entre 1968 e 2005. Preferivelmente, as moléculas de ligação têm atividade neutralizadora contra pelo menos todos os isolados de ocorrência natural de vírus influenza H3N2 conhecido antes de 20 de janeiro de 2010.

As moléculas de ligação da invenção podem ser capazes de ligação específica às subunidade de HA0, HA1 e/ou HA2 da proteína HA. Estes podem ser capazes de ligação específica a epítomos lineares ou estruturais e/ou conformacionais na subunidade HA0, HA1 e/ou HA2 da proteína HA. A molécula de HA pode ser purificada a partir de vírus ou

recombinantemente produzida e opcionalmente isolada antes do uso. Alternativamente, HA pode ser expressado na superfície das células. Preferivelmente, as moléculas de ligação da invenção ligam-se a um epítipo que compreende um ou mais dos aminoácidos na posição 19, 25, 27, 33 e 34 do polipeptídeo HA2 da proteína H3 HA. Em uma forma de realização, as moléculas de ligação ligam-se ao dito epítipo em HA2, quando o aminoácido na posição 19 é ácido aspártico (D), o aminoácido na posição 25 é glutamina (Q), o aminoácido na posição 27 é glicina (G), o aminoácido na posição 33 é glicina (G) e/ou o aminoácido na posição 34 é glutamina (numeração de início de HA2 na posição 1 seguindo logo o resíduo de arginina que constitui o local de clivagem entre HA1 e HA2). Em uma forma de realização, as moléculas de ligação não ligam-se ao dito epítipo em HA2 quando um ou mais dos aminoácidos foram mudados.

Em um outro aspecto, a presente invenção abrange moléculas de ligação que são capazes de, pelo menos *in vitro*, evitar a clivagem da tripsina da molécula precursora H3 HA HA0 em HA1 e HA2.

Em um outro aspecto, a presente invenção abrange moléculas de ligação que são capazes de evitar a mudança conformacional da proteína H3 HA, requerido para a fusão da membrana da membrana viral de influenza e a membrana endossomal de uma célula infectada, pelo menos *in vitro*.

Em um outro aspecto, as moléculas de ligação tem algumas ou todas as propriedades listadas acima, isto é, atividade de neutralização cruzada, que liga-se a um epítipo conservado na região de tronco de HA2, inibindo a clivagem de tripsina *in vitro* de HA0 e/ou inibir a mudança conformacional.

Em uma forma de realização, as moléculas de ligação da invenção tem todas ou algumas das propriedades acima e, além disso, não são capazes de ligação a e/ou neutralização de vírus influenza A que compreende HA do subtipo H1, tal como H1N1.

As moléculas de ligação da invenção podem ser capazes de ligação específica a, por exemplo, vírus influenza H3N2 que são viáveis, viventes e/ou infecciosos ou que estão na forma inativada/atenuada. Os métodos para inativar/atenuar vírus, por exemplo, vírus influenza H3N2, são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não limitam-se a, tratamento com formalina, β -propiolactona (BPL), mertiolate e/ou luz ultravioleta.

As moléculas de ligação da invenção também podem ser capazes de ligar-se especificamente a um ou mais fragmentos do vírus influenza, tal como *inter alia*, uma preparação de uma ou mais proteínas e/ou (poli)peptídeos derivados do subtipo H3N2 ou uma ou mais proteínas recombinantemente produzidas e/ou polipeptídeos de H3N2. para os métodos de tratamento e/ou prevenção de infecções de H3N2 as moléculas de ligação são preferivelmente capazes de ligação específica às proteínas acessíveis de superfície de H3N2, tal como as glicoproteínas de superfície, hemaglutinina (HA), que são requeridas para a ligação viral e liberação celular.

A sequência de nucleotídeo e/ou aminoácido de proteínas de várias cepas de H3N2 podem ser observados em GenBank-database, NCBI Influenza Virus Sequence Database, Influenza Sequence Database (ISD), EMBL-database e/ou outros bancos de dados. Está bem dentro da capacidade da pessoa habilitada encontrar tais sequências nos bancos de dados respectivos.

Em uma outra forma de realização as moléculas de ligação da invenção são capazes de ligação específica a um fragmento das proteínas e/ou polipeptídeos mencionados acima, em que o fragmento pelo menos compreende um epítopo reconhecido pelas moléculas de ligação da invenção. Um “epítopo” como usado neste é uma porção que é capaz de ligar a uma molécula de ligação da invenção com afinidade suficientemente alta para formar um complexo de antígeno detectável-molécula de ligação.

As moléculas de ligação da invenção podem ou podem não ser

capazes de ligação específica à parte extracelular de HA (também denominado aqui HA solúvel (sHA)).

As moléculas de ligação da invenção podem ser moléculas de imunoglobulina intactas tais como anticorpos policlonais ou monoclonais ou
5 as moléculas de ligação podem ser fragmentos de ligação de antígeno que incluem, mas não limitam-se a, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, dAb, Fd, fragmentos de região determinadora de complementaridade (CDR), anticorpos de cadeia simples (scFv), anticorpos de cadeia simples bivalentes, anticorpos de fago de
10 cadeia simples, diacorpos, triacorpos, tetracorpos e (poli)peptídeos que contêm pelo menos um fragmento de uma imunoglobulina que é suficiente para conferir ligação de antígeno específica às cepas de vírus influenza H3N2 ou um fragmento deste. Em uma forma de realização preferida as moléculas de ligação da invenção são anticorpos monoclonais humanos.

As moléculas de ligação da invenção podem ser usadas na
15 forma isolada ou não isolada. Além disso, as moléculas de ligação da invenção podem ser usadas sozinhas ou em uma mistura que compreende pelo menos uma molécula de ligação (ou variante ou fragmento desta) da invenção. Em outras palavras, as moléculas de ligação podem ser usadas em
20 combinação, por exemplo, como uma composição farmacêutica que compreende duas ou mais moléculas de ligação da invenção, variantes ou seus fragmentos. Por exemplo, moléculas de ligação tendo atividades diferentes, mas complementares podem ser combinadas em uma terapia simples para atingir um efeito profilático, terapêutico ou de diagnóstico, mas, alternativamente, as moléculas de ligação tendo atividades idênticas também
25 podem ser combinadas em uma terapia simples para atingir um efeito profilático, terapêutico ou de diagnóstico. opcionalmente, a mistura ainda compreende pelo menos um outro agente terapêutico. Preferivelmente, o agente terapêutico, tal como, por exemplo, inibidores de M2 (por exemplo, amantidina, rimantadina) e/ou inibidores de neuraminidase (por exemplo,

zanamivir, oseltamivir) é útil na profilaxia e/ou tratamento de uma infecção por vírus influenza H3N2.

Tipicamente, as moléculas de ligação de acordo com a invenção podem ligar-se aos seus parceiros de ligação, isto é, vírus influenza H3N2 ou seus fragmentos, com uma constante de afinidade (valor K_d) que é menor do que $0,2 \times 10^{-4}$ M, $1,0 \times 10^{-5}$ M, $1,0 \times 10^{-6}$ M, $1,0 \times 10^{-7}$ M, preferivelmente menor do que $1,0 \times 10^{-8}$ M, mais preferivelmente menor do que $1,0 \times 10^{-9}$ M, mais preferivelmente menor do que $1,0 \times 10^{-10}$ M, ainda mais preferivelmente menor do que $1,0 \times 10^{-11}$ M e em particular menor do que $1,0 \times 10^{-12}$ M. As constantes de afinidade podem variar para os isotipos de anticorpo. Por exemplo, ligação por afinidade de um a um isotipo IgM refere-se a uma afinidade de ligação de pelo menos cerca de $1,0 \times 10^{-7}$ M. As constantes de afinidade pode ser, por exemplo, medidas usando-se a ressonância de superfície de plasmon, por exemplo, usando-se o sistema BIACORE (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden).

Tipicamente, as moléculas de ligação de acordo com a invenção têm uma atividade neutralizadora de 10 $\mu\text{g/ml}$ ou menos, preferivelmente 5 $\mu\text{g/ml}$ ou menos, mais preferivelmente 2 $\mu\text{g/ml}$ ou menos, ainda mais preferivelmente 1 $\mu\text{g/ml}$ ou menos, como determinado em um ensaio de neutralização de vírus *in vitro* (VNA) como descrito no Exemplo 6.

As moléculas de ligação de acordo com a invenção podem ligar-se ao vírus influenza H3N2 ou a um fragmento destes na forma solúvel, tal como, por exemplo, em uma amostra ou em suspensão ou podem ligar-se ao vírus influenza H3N2 ou um fragmento deste ligados ou unidos a um carregador ou substrato, por exemplo, placas micorituladoras, membranas e contas, etc. Os carregadores ou substratos podem ser feitos de vidro ou plástico (por exemplo, poliestireno), polissacarídeos, náilon, nitrocelulose ou Teflon, etc. A superfície de tais suportes pode ser sólida ou porosa e de qualquer forma conveniente. Além disso, as moléculas de ligação podem ligar

ao vírus influenza H3N2 na forma isolada purificada ou forma não purificada/não isolada.

As moléculas de ligação da invenção apresentam atividade neutralizadora. A atividade neutralizadora pode, por exemplo, ser medida como descrito neste. Os ensaios alternativos que medem a atividade neutralizadora como descrito em, por exemplo, WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, Geneva: World Health Organisation, 2005, versão 2002.5.

A presente invenção diz respeito a uma molécula de ligação humana isolada que é capaz de reconhecer e ligar-se a um epítipo na proteína de hemaglutinina de influenza (HA), caracterizada na dita molécula de ligação tem atividade neutralizadora contra um vírus influenza A, que compreende HA do subtipo H3. Um exemplo de um subtipo de influenza que contém HA do subtipo H3 é H3N2. particularmente preferidas são as moléculas de ligação que neutralizam o subtipo de influenza H3N2. Em uma forma de realização, as moléculas de ligação neutralizam pelo menos uma ou mais cepas de H3N2 recentes. Em uma forma de realização, as moléculas de ligação desta maneira ligam-se pelo menos a e neutralizam uma ou mais cepas de H3N2 selecionadas do grupo que consiste de A/Wisconsin/67/2005, A/Hiroshima/52/2005, A/Panama/2007/99 e A/Johannesburg/33/94. Em uma outra forma de realização, as moléculas de ligação também ligam-se a e neutralizam a cepa de H3N2 A/Hong Kong/1/68. Mais preferivelmente, as moléculas de ligação ligam-se a e têm atividade neutralizadora contra todas as cepas de influenza H3N2 dos anos entre 1968 e 2005, preferivelmente todas as cepas conhecidas do dito subtipo de vírus influenza.

Em uma outra forma de realização, as moléculas de ligação de acordo com a invenção também têm atividade neutralizadora contra o vírus influenza de outros subtipos de vírus influenza A, preferivelmente pelo menos o vírus influenza que compreende HA do subtipo H7, tal como a cepa

A/Mallard/Netherlands/12/2000 e/ou H10 subtipo, tal como a cepa A/chick/Germany/N/49. desta maneira foi mostrado que algumas das moléculas de ligação da presente invenção neutralizam estes subtipos influenza. Desta maneira, a invenção também fornece moléculas de ligação que ligam-se a um epítipo na proteína de hemaglutinina que é dividida e conservada entre os subtipos de influenza e portanto dizem respeito às moléculas de ligação que reagem entre os subtipos com base em influenza H3, H7 e/ou H10 e outros subtipos influenza que contêm a proteína HA com estes epítipos particulares, preferivelmente, todos os vírus influenza do grupo filogenético 2. As moléculas de ligação neutralizadoras preferivelmente ligam-se a e neutralizam diversas cepas dos subtipos H3, H7 e/ou H10. Em uma forma de realização, estas moléculas de ligação neutralizadoras ligam-se a e neutralizam pelo menos uma ou mais das cepas recentes de H3N2 selecionadas do grupo que consiste de A/Wisconsin/67/2005, A/Hiroshima/52/2005, A/Johannesburg/33/94 e A/Panama/2007/99. Em uma outra forma de realização, as moléculas de ligação também ligam-se a e neutralizam a cepa H3N2 A/Hong Kong/1/68. Mais preferivelmente, as moléculas de ligação ligam-se a e têm atividade neutralizadora contra todas as cepas de influenza H3N2 dos anos entre 1968 e 2005, preferivelmente todas conhecidas e ainda mais preferivelmente também cepas de H3N2 futuras. Em uma forma de realização adicional, as moléculas de ligação neutralizam substancialmente todos os isolados dos ditos outros subtipos de vírus influenza.

Em uma forma de realização, as moléculas de ligação ligam-se a e neutralizam todos os subtipos de vírus influenza do grupo filogenético 2.

A pessoa habilitada, com base no que foi divulgado neste, pode determinar se um anticorpo de fato reage com as proteínas de HA dos subtipos diferentes e também determinam se estes são capazes de neutralizar os vírus influenza de subtipos diferentes *in vivo*.

O vírus influenza infecta células pela ligação aos resíduos de ácido siálico na superfície celular de células alvo e seguindo a transferência em endossomas, pela fusão de suas membranas com as membranas endossômicas e liberando o complexo de genoma-transcriptase na célula.

5 Tanto o processo de ligação de receptor quanto de fusão de membrana são mediados pela glicoproteína HA. O HA de vírus influenza A compreende duas regiões estruturalmente, isto é, uma região superior globular, que contém um local de ligação de receptor que é responsável pela ligação de vírus à

10 célula alvo e está envolvido na atividade de hemaglutinação de HA e uma região de tronco, contendo um peptídeo de fusão que é necessário para a fusão de membrana entre o envelope viral e a membrana endossômica da célula. A proteína HA é um trímero em que cada monômero consiste de dois glicopolipeptídeos ligados por bissulfeto, HA1 e HA2, que são produzidos durante a infecção pela clivagem proteolítica de um precursor (HA0). A

15 clivagem é necessária para a infectividade viral visto que isto é requerido para iniciar o HA para a fusão de membrana, para permitir a mudança conformacional. A ativação da molécula iniciada ocorre em pH baixo em endossomas, entre o pH5 e o pH6 e requer mudanças extensivas na estrutura de HA. A estrutura 3-dimensional das conformações de HA não clivado por

20 pré-fusão (I), clivado por pré-fusão (II) e pós-fusão (III) são esquematicamente mostrados na Figura 4. Cada um dos estágios na iniciação e ativação de HA para a sua participação no processo de fusão de membrana presente em um estágio diferente para a inibição, por exemplo, por anticorpos monoclonais.

25 Em uma forma de realização da presente invenção, as moléculas de ligação são pelo menos capazes de prevenir a clivagem da molécula precursora de HA HA0 em um ensaio *in vitro*, por exemplo, um ensaio como descrito abaixo nos Exemplos. Como explicado acima, a clivagem da molécula precursora de HA HA0 em HA1 e HA2 pelas proteases

hospedeiras é requerida para ativar a infectividade viral. A prevenção da clivagem da molécula precursora de HA HA0 pelas moléculas de ligação da invenção, desta maneira, podem evitar a infecção pelo vírus influenza.

Em uma forma de realização, as moléculas de ligação ligam-se a um epítopo que compreende o aminoácido na posição 19, 25, 27, 33 e/ou 34 do polipeptídeo HA2 da proteína H3 HA. Em uma forma de realização, as moléculas de ligação ligam ao dito epítopo em HA2, quando o aminoácido na posição 19 é ácido aspártico (D), o aminoácido na posição 25 é glutamina (Q), o aminoácido na posição 27 é glicina (G), o aminoácido na posição 33 é glicina (G) e/ou o aminoácido na posição 34 é glutamina. Preferivelmente, as moléculas de ligação não ligam-se ao dito epítopo em HA2 quando um ou mais dos aminoácidos foram mudados. A numeração dos aminoácidos é fundamentada com base na sequência de hemaglutina do banco de dados Uniprot número Q91MA7 (SEQ ID N°: 193). O Q91MA7 dá a sequência de comprimento total de HA imaturo de A/Hong Kong/1/1968. A sequência de HA2 começa em G346 da proteína imatura de HA não clivada. Na numeração acima o G346 é G1 na sequência HA2.

É preferida uma molécula de ligação de acordo com a presente invenção que é selecionada do grupo que consiste de:

a) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 81, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 82 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 83,

b) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 87, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 88 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 89,

c) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 103, uma região CDR2 de cadeia

pesada da SEQ ID N°: 104 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 105,

5 d) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 109, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 110 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 111,

10 e) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 115, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 116 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 117,

f) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 121, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 122 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 123,

15 g) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 126, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 127 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 128,

20 h) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 132, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 133 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 134,

i) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 138, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 139 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 140,

25 j) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 144, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 145 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 146,

k) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 150, uma região CDR2 de cadeia

pesada da SEQ ID N°: 151 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 152,

l) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 156, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 157 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 158,

m) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 162, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 163 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 164,

n) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 168, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 169 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 170,

o) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 173, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 174 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 175 e

p) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 179, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 180 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 181.

Em uma forma de realização preferida, a molécula de ligação de acordo com a invenção é para o uso como um medicamento e preferivelmente para o diagnóstico, tratamento terapêutico e/ou profilático de infecção por influenza. Preferivelmente, o vírus influenza que causa a infecção por influenza pode ser tratado pelas moléculas de ligação da presente invenção, é vírus influenza subtipo H3N2. A presente invenção também diz respeito a uma composição farmacêutica que compreende a molécula de ligação de acordo com a invenção e um excipiente farmacêuticamente

aceitável.

Ainda, em uma outra forma de realização a invenção diz respeito ao uso da molécula de ligação de acordo com a invenção na preparação de um medicamento para o diagnóstico, profilaxia, e/ou
5 tratamento de uma infecção por vírus influenza. Tais infecções podem ocorrer em populações pequenas, mas também pode disseminar-se em torno do mundo em epidemias sazonais ou pior, em pandemias globais onde milhões de indivíduos estão em risco. A invenção fornece moléculas de ligação que podem neutralizar a infecção de cepas de influenza que causam tais epidemias sazonais, bem como as pandemias potenciais. Importantemente, a proteção e o tratamento podem ser previstos agora com as moléculas de ligação da presente invenção em relação a vários subtipos de influenza como foi divulgado que as moléculas de ligação da presente invenção são capazes de neutralizar vários subtipos de influenza do grupo filogenético 2, que abrange
10 os subtipos de H3, H7 e H10.

Em uma forma de realização preferida, as moléculas de ligação humanas de acordo com a invenção são caracterizadas em que as moléculas de ligação humanas são selecionadas do grupo que consiste de:

a) uma molécula de ligação que compreende uma região
20 CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 81, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 82 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 83, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 84, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 85 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a
25 sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 86,

b) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 87, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 88 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 89, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido

da SEQ ID N°: 90, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 91 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 92,

5 c) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 87, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 88 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 89, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 93, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 94 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a
10 sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 95,

d) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 87, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 88 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 89, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 96, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 97 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a
15 sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 98,

e) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 87, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 88 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 89, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 99, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 100 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a
20 sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 101,

25 f) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 87, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 88 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 89, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 102, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de

aminoácido da SEQ ID N°: 85 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 86,

g) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 103, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 104 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 105, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 106, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 107 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 108,

h) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 109, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 110 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 111, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 112, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 113 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 114,

i) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 115, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 116 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 117, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 118, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 119 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 120,

j) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 121, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 122 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 123, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 124, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 119 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a

sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 125,

5 k) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 126, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 127 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 128, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 129, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 130 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 131,

10 l) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 132, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 133 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 134, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 135, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 136 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 137,

15 m) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 138, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 139 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 140, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 141, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 142 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 143,

20 n) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 144, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 145 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 146, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 147, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 148 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 149,

o) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 150, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 151 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 152, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 153, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 154 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 155,

p) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 156, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 157 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 158, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 159, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 160 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 161,

q) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 162, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 163 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 164, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 165, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 166 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 167,

r) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 168, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 169 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 170, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 171, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 172 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 137,

s) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1

de cadeia pesada da SEQ ID N°: 173, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 174 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 175, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 176, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 177 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 178,

e

t) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 179, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 180 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 181, uma região de CDR1 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 182, uma região de CDR2 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 183 e uma região de CDR3 de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 184.

Em uma forma de realização específica as moléculas de ligação da invenção é selecionada do grupo que consiste de a molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 81, uma região CDR2 de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 82 e uma região de CDR3 de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 83; a molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 109, uma região CDR2 de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 110 e uma região de CDR3 de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 111; a molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 138, uma região CDR2 de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 139 e uma região de CDR3 de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 140; a molécula de ligação que compreende uma

região CDR1 de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 144, uma região CDR2 de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 145 e uma região de CDR3 de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 146; e a molécula de ligação que
5 compreende uma região CDR1 de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 173, uma região CDR2 de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 174 e uma região de CDR3 de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 175.

As regiões de CDR da moléculas de ligação da invenção são
10 mostradas na Tabela 1. As regiões de CDR estão de acordo com Kabat *et al.* (1991) como descrito nas Sequências de proteínas de Interesse Imunológico. Em uma forma de realização da presente invenção, as moléculas de ligação podem compreender uma, duas, três, quatro, cinco ou todas as seis regiões de CDR como divulgado neste. Preferivelmente, a molécula de ligação de acordo
15 com a presente invenção compreende pelo menos dois dos CDRs divulgados neste.

Ainda, em uma outra forma de realização, as moléculas de ligação de acordo com a invenção compreendem uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácido selecionadas do
20 grupo que consiste de SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 26, SEQ ID N°: 30, SEQ ID N°: 34, SEQ ID N°: 38, SEQ ID N°: 42, SEQ ID N°: 46, SEQ ID N°: 50, SEQ ID N°: 54, SEQ ID N°: 58, SEQ ID N°: 62, SEQ ID N°: 66, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 74 e SEQ ID N°: 78. Em uma forma de realização
25 adicional, as moléculas de ligação de acordo com a invenção compreendem uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácido selecionadas do grupo que consiste de SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 28, SEQ ID N°: 32, SEQ ID N°: 36, SEQ ID N°: 40, SEQ ID N°: 44,

SEQ ID N°: 48, SEQ ID N°: 52, SEQ ID N°: 56, SEQ ID N°: 60, SEQ ID N°: 64, SEQ ID N°: 68, SEQ ID N°: 72, SEQ ID N°: 76 e SEQ ID N°: 80.

Um outro aspecto da invenção inclui variantes funcionais das moléculas de ligação como definido aqui. As moléculas são consideradas serem variantes funcionais da molécula de ligação de acordo com a invenção, se as variantes forem capazes de competir para a ligação específica ao vírus influenza H3N2 ou um fragmento deste com as moléculas de ligação “precursoras” ou “referência”. Em outras palavras, quando as variantes funcionais ainda são capazes de ligar ao mesmo epítipo ou de sobreposição do vírus influenza H3N2 ou um fragmento destes. Por causa desta aplicação, “precursora” e “referência” serão usadas como sinônimos significando que a informação da molécula de referência ou precursora ou a molécula física por si só pode formar a base para a variação. Preferivelmente, as variantes funcionais são capazes de competir com a ligação específica a pelo menos duas (ou mais) cepas de vírus influenza H3N2 diferentes ou seus fragmentos que são especificamente ligados pelas moléculas de ligação de referência. Além disso, as moléculas são consideradas serem variantes funcionais da molécula de ligação de acordo com a invenção, se estas ainda tiverem atividade neutralizadora contra vírus influenza H3N2, preferivelmente contra as pelo menos duas (ou mais) cepas de vírus influenza H3N2 contra as quais a molécula de ligação precursora apresenta atividade neutralizadora. As variantes funcionais incluem, mas não limitam-se a derivados que são substancialmente similares em sequência estrutural primária, incluindo aquelas que têm modificações no receptor Fc ou outras regiões envolvidas com as funções atuadoras e/ou que contêm, por exemplo, modificações *in vitro* ou *in vivo*, produtos químicos e/ou bioquímicos, que não são encontrados na molécula de ligação precursora. Tais modificações incluem *inter alia* acetilação, acilação, ligação covalente de um nucleotídeo ou derivado de nucleotídeo, ligação covalente de um lipídeo ou derivado de

lipídeo, reticulação, formação de ligação de bissulfeto, glicosilação, hidroxilação, metilação, oxidação, pegilação, processamento proteolítico, fosforilação e outros.

Alternativamente, as variantes funcionais podem ser moléculas de ligação como definido na presente invenção que compreende uma sequência de aminoácido contendo substituições, inserções, anulações ou combinações destes de um ou mais aminoácidos comparados com as sequências de aminoácido das moléculas de ligação precursoras. Além disso, as variantes funcionais pode compreender trunicações da sequência de aminoácido em cada um ou ambos os terminais amino ou carboxila. As variantes funcionais de acordo com a invenção podem ter as mesmas afinidades de ligação ou diferentes mais altas ou mais baixas, em comparação com a molécula de ligação precursora mas ainda são capazes de ligar-se ao vírus influenza H3N2 ou a um fragmento destes. Por exemplo, as variantes funcionais de acordo com a invenção podem ter afinidades de ligação aumentadas ou diminuídas quanto ao vírus influenza H3N2 ou um fragmento deste em comparação com as moléculas de ligação precursoras. Preferivelmente, as sequências de aminoácido das regiões variáveis, que incluem mas não limitam-se a, regiões de estrutura, regiões hipervariáveis, em particular as regiões de CDR3, são modificadas. Em geral, as regiões variáveis de cadeia leve ou de cadeia pesada compreendem três regiões hipervariáveis, que compreendem três CDRs e regiões mais conservadas, as denominadas regiões de estrutura (FRs). As regiões hipervariáveis compreendem resíduos de aminoácidos de CDRs e resíduos de aminoácido e arcos hipervariáveis. As variantes funcionais pretendidas estão dentro do escopo da presente invenção têm pelo menos cerca de 50 % a cerca de 99 %, preferivelmente pelo menos cerca de 60 % a cerca de 99 %, mais preferivelmente pelo menos cerca de 70 % a cerca de 99 %, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 80 % a cerca de 99 %, mais

preferivelmente pelo menos cerca de 90 % a cerca de 99 %, em particular pelo menos cerca de 95 % a cerca de 99 % e, em particular, pelo menos cerca de 97 % a cerca de 99 % de homologia de sequência de aminoácido com as moléculas de ligação precursoras como definidas aqui. Os algoritmos de computador tais como *inter alia* Gap ou Bestfit conhecidos pela pessoa habilitada na técnica podem ser usados para alinhar otimamente as sequências de aminoácido a serem comparadas e para definir os resíduos de aminoácido similares ou idênticos. As variantes funcionais podem ser obtidas pela alteração das moléculas de ligação precursoras ou partes destas pelos métodos de biologia molecular gerais conhecidos na técnica que incluem, mas não limitam-se a, PCR propenso ao erro, mutagênese direcionada por oligonucleotídeo, mutagênese direcionada ao local e troca de cadeia pesada e/ou leve. Em uma forma de realização as variantes funcionais da invenção têm atividade neutralizadora contra vírus influenza H3N2. a atividade neutralizadora pode ser idêntica ou ser mais alta ou mais baixa em comparação com as moléculas de ligação precursoras. Daqui em diante, quando o termo molécula de ligação (humana) é usado, este também abrange variantes funcionais da molécula de ligação (humana).

Ainda, em um outro aspecto, a invenção inclui imunoconjugados, isto é, moléculas que compreendem pelo menos uma molécula de ligação como definido aqui e que ainda compreende pelo menos um rótulo, tal como *inter alia* uma porção/agente detectável. Também são consideradas na presente invenção misturas de imunoconjugados de acordo com a invenção ou misturas de pelo menos um imunoconjugado de acordo com a invenção e uma outra molécula, tal como um agente terapêutico ou uma outra molécula de ligação ou imunoconjugado. Em uma forma de realização adicional, os imunoconjugados da invenção podem compreender mais do que um rótulo. Estes rótulos podem ser os mesmos ou distintos um do outro e podem ser unidos/conjugados não covalentemente como moléculas de

ligação. Os rótulos também podem ser unidos/conjugados diretamente às moléculas de ligação humanas através da ligação covalente. Alternativamente, os rótulos podem ser unidos/conjugados às moléculas de ligação por meio de um ou mais compostos de ligação. As técnicas para conjugar rótulos às moléculas de ligação são bem conhecidos pelos técnicos habilitados.

Os rótulos dos imunocombinados da presente invenção podem ser agentes terapêuticos, mas estes também podem ser porções/agentes detectáveis. Os rótulos adequados na terapia e/ou prevenção podem ser toxinas ou partes funcionais destes, antibióticos, enzimas, outras moléculas de ligação que intensificam a fagocitose ou estímulo imune. Os imunocombinados que compreendem um agente detectável podem ser usados diagnosticamente para, por exemplo, estimar se um paciente foi infectado com uma cepa de vírus influenza H3N2 ou monitorar o desenvolvimento ou progressão de uma infecção por vírus influenza H3N2 como parte de um procedimento de teste clínico para, por exemplo, determinar a eficácia de um dado regime de tratamento. Entretanto, estes também podem ser usados para outros propósitos de detecção e/ou analíticos e/ou diagnósticos. As porções/agentes detectáveis incluem, mas não são limitados a, enzimas, grupos protéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, materiais radioativos, metais emissores de pósitron e íons metálicos paramagnéticos não reativos. Os rótulos usados para rotular as moléculas de ligação para propósitos de detecção e/ou analíticos e/ou diagnósticos dependem das técnicas de detecção/análise/diagnóstico específicas e/ou métodos usados, tais como *inter alia* tingimento imunocistoquímico de amostras (tecido), detecção de fluxo citométrico, detecção citométrica de laser por varredura, imunocombinados fluorescentes, ensaios imunossorventes ligados por enzima (ELISAs), radioimunocombinados (RIAs), bioensaios (por exemplo, ensaios de fagocitose), aplicações de Western blotting, etc. Os rótulos adequados para as técnicas de

detecção/análise/diagnóstico e/ou métodos conhecidos na técnica são bem conhecidos dentro da capacidade do técnico habilitado.

Além disso, as moléculas de ligação humanas ou imunoconjugados da invenção também podem ser ligados a suportes sólidos, que são particularmente úteis para os imunoenaios *in vitro* ou purificação de vírus influenza H3N2 ou um fragmento deste. Tais suportes sólidos devem ser porosos ou não porosos, planares ou não planares. As moléculas de ligação da presente invenção podem ser fundidas a sequências marcadoras, tais como um peptídeo para facilitar a purificação. Os exemplos incluem, mas não limitam-se ao rótulo de hexa-histidina, o rótulo de hemaglutinina (HA), o rótulo myc ou o rótulo flag. Alternativamente, um anticorpo pode ser conjugado a um segundo anticorpo para formar um heteroconjugado de anticorpo. Em um outro aspecto, as moléculas de ligação da invenção podem ser conjugadas/ligadas a um ou mais antígenos. Preferivelmente, estes antígenos são antígenos que são reconhecidos pelo sistema imune de um paciente ao qual o conjugado de molécula de ligação-antígeno é administrado. Os antígenos podem ser idênticos, mas também podem diferir um do outro. Os métodos de conjugação para a ligação de antígenos e moléculas de ligação são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não são limitados ao uso de agentes de reticulação. As moléculas de ligação da invenção ligar-se-ão ao vírus influenza H3N2 e os antígenos ligados às moléculas de ligação iniciarão um ataque de célula T poderoso no conjugado, que eventualmente levará à destruição do vírus influenza H3N2.

A seguir, para produzir imunoconjugados quimicamente por conjugação, direta ou indiretamente, por intermédio, por exemplo, um ligador, os imunoconjugados podem ser produzidos como proteínas de fusão que compreendem as moléculas de ligação da invenção e um rótulo adequado. As proteínas de fusão podem ser produzidas pelos métodos conhecidos na técnica, tais como, por exemplo, de maneira recombinante pela construção

das moléculas de ácido nucléico que compreendem sequências de nucleotídeo que codificam as moléculas de ligação em estrutura com as sequências de nucleotídeo que codificam os rótulos adequados e então que expressam as moléculas de ácido nucléico.

5 É um outro aspecto da presente invenção para fornecer a molécula de ácido nucléico que codifica pelo menos a molécula de ligação, variante funcional ou imunoconjugado de acordo com a invenção. Tais moléculas de ácido nucléico podem ser usadas como intermediários para os propósitos de clonagem, por exemplo, no processo de maturação por
10 afinidade como descrito acima. Em uma forma de realização preferida, as moléculas de ácido nucléicos são isoladas ou purificadas.

A pessoa habilitada estimará que as variantes funcionais destas moléculas de ácido nucléico também são pretendidas serem uma parte da presente invenção. As variantes funcionais são sequências de ácido nucléico
15 que podem ser diretamente traduzidas, usando-se o código genético padrão, para fornecer uma sequência de aminoácido idêntica àquela traduzida a partir das moléculas de ácido nucléico precursoras.

Preferivelmente, as moléculas de ácido nucléico codificam moléculas de ligação que compreende as regiões de CDR como descrito
20 acima. Em uma forma de realização adicional, as moléculas de ácido nucléico codificam moléculas de ligação que compreendem duas, três, quatro, cinco ou ainda todas as seis regiões de CDR das moléculas de ligação da invenção.

Em uma outra forma de realização, as moléculas de ácido nucléico codificam moléculas de ligação que compreendem uma cadeia
25 pesada que compreende as sequências de cadeia pesada variável como descrito acima. Em uma outra forma de realização, as moléculas de ácido nucléico codificam moléculas de ligação que compreendem uma cadeia leve que compreende as sequências de cadeia leve variáveis como descrito acima. As sequências de nucleotídeo e as sequências de aminoácido das regiões

variáveis de cadeia pesada e leve das moléculas de ligação da invenção são dadas abaixo.

É um outro aspecto da invenção fornecer vetores, isto é, construções de ácido nucléico, que compreendem uma ou mais moléculas de ácido nucléico de acordo com a presente invenção. Os vetores podem ser derivados de plasmídeos, tais como *inter alia* F, R1, RP1, Col, pBR322, TOL, Ti, etc; cosmídeos; fagos, tais como lambda, lambdóide, M13, Mu, P1, P22, Q β , T-par, T-ímpar, T2, T4, T7, etc; vírus vegetais. Os vetores podem ser usados para a clonagem e/ou para a expressão das moléculas de ligação da invenção e ainda devem ser usados para os propósitos de terapia genética. Os vetores que compreendem uma ou mais moléculas de ácido nucléico de acordo com a invenção operacionalmente ligada a uma ou mais moléculas de ácido nucléico reguladoras de expressão também são consideradas pela presente invenção. A escolha do vetor é dependente dos procedimentos recombinantes seguidos e do hospedeiro usado. A introdução de vetores nas células hospedeiras pode ser afetadas, *inter alia*, pela transfecção de fosfato de cálcio, infecção viral, transfecção mediada por DEAE-dextrano, transfecção de lipofectamina ou eletroporação. Os vetores podem replicar-se de maneira autônoma ou podem replicar-se junto com o cromossomo em que estes foram integrados. Preferivelmente, os vetores contêm um ou mais marcadores de seleção. A escolha dos marcadores pode depender das células hospedeiras de escolha, embora isto não seja crítico para a invenção como é bem conhecido pelas pessoas habilitadas na técnica. Estes incluem mas não limitam-se a, canamicina, neomicina, puromicina, higromicina, zeocina, gene de timidina cinase do vírus de hérpes simples (HSV-TK), gene de diidrofolato redutase de camundongo (dhfr). Os vetores que compreendem uma ou mais moléculas de ácido nucléico que codificam as moléculas de ligação humanas como descrito acima operacionalmente ligado a uma ou mais moléculas de ácido nucléico que codificam proteínas ou peptídeos que podem ser usados

para isolar as moléculas de ligação humanas também são cobertas pela invenção. Estas proteínas ou peptídeos incluem, mas não limitam-se a, glutational-S-transferase, proteína de ligação de maltose, poliistidina de ligação metálico, proteína fluorescente verde, luciferase e beta-galactosidase.

5 Os hospedeiros contendo uma ou mais cópias dos vetores mencionados acima são um objetivo adicional da presente invenção. Preferivelmente, os hospedeiros são as células hospedeiras. As células hospedeiras incluem, mas não limitam-se a, células de origem de mamífero, vegetal, inseto, fúngica e bacteriana. As células bacterianas incluem, mas não
10 limitam-se a, células de bactérias de Gram-positivo ou bactérias de Gram-negativo, tais como diversas espécies do gênero *Escherichia*, tal como *E. Coli* e *Pseudomonas*. No grupo de células fúngicas, preferivelmente, células de levedura são usadas. A expressão na levedura pode ser atingida usando-se cepas de levedura, tais como *inter alia* *Pichia pastoris*, *Saccharomyces*
15 *cerevisiae* e *Hansenula polymorpha*. Além disso, as células de inseto, tais como as células de *Drosophila* e Sf9 podem ser usadas como células hospedeiras. Além disso, as células hospedeiras podem ser células, tais como *inter alia*, células de lavouras vegetais, tais como plantas de floresta ou células de plantas que fornecem alimento e materiais brutos, tais como
20 materiais brutos, tais como plantas de cereal ou plantas medicinais ou células de ornamentais de lavouras de bulbo de flor. As plantas transformadas (transgênicas) ou células vegetais são produzidas por métodos, por exemplo, transferência de gene mediada por *Agrobacterium*, transformação de discos de folha, transformação de protoplasto pela transferência de DNA induzida por
25 polietileno glicol, eletroporação, sonificação, microinjeção ou transferência genética bolística. adicionalmente, um sistema de expressão adequado pode ser um sistema de baculovírus. Os sistemas de expressão que usam as células de mamífero tais como células de ovário de hamster chinês (CHO), células COS, células BHK, células NSO ou células de melanoma de Bowes são

preferidos na presente invenção. As células de mamífero fornecem proteínas expressadas com as modificações pós-tradução que são mas similares às moléculas naturais de origem de mamífero. Visto que a presente invenção lida com moléculas que foram administradas a seres humanos, um sistema de expressão completamente humano deve ser particularmente preferido. Portanto, ainda mais preferivelmente, as células hospedeiras são células humanas. Os exemplos de células humanas são, *inter alia*, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 e HEK293T. Nas formas de realização preferidas, as células produtoras humanas compreendem pelo menos uma parte funcional de uma sequência de ácido nucléico que codifica uma região de adenovírus E1 no formato expressível. ainda em formas de realização mais preferidas, as ditas células hospedeiras são derivadas de uma retina humana e imortalizadas com ácidos nucléicos que compreendem sequências E1 adenovirais E1, tais células 911 ou a linha celular depositada na European Collection of Cell Cultures (ECACC), CAMR, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Great Britain em 29 de fevereiro de 1996 sob o número 96022940 e comercializado sob a marca PER.C6[®] (PER.C6 é uma marca registrada da Crucell Holland B.V.). para os propósitos deste pedido “células PER.C6” referem-se a células depositadas sob o número 96022940 ou predecessor, passagens a montante ou a jusante bem como descendentes dos predecessores de células depositadas, bem como derivados de qualquer um dos precedentes. A produção de proteínas recombinantes nas células hospedeiras pode ser realizada de acordo com os métodos bem conhecidos na técnica. O uso das células comercializadas sob a marca PER.C6[®] como uma plataforma de produção para proteínas de foram descritas no WO 00/63403 cuja divulgação é incorporada neste por referência.

As moléculas de ligação podem ser preparadas por vários meios. Um método de produzir a molécula de ligação de acordo com a invenção é uma parte adicional da invenção. O método compreende as etapas de a) cultivar um hospedeiro de acordo com a invenção sob as condições

condutoras para a expressão da molécula de ligação e b) opcionalmente, recuperar a molécula de ligação expressada. As moléculas de ligação expressadas podem ser recuperadas do extrato isento de célula, mas preferivelmente estes são recuperados a partir do meio de cultura. O método
5 acima de produção também pode ser usado para fabricar variantes funcionais das moléculas de ligação e/ou imunocjugados da presente invenção. Os métodos para a recuperação de proteínas, tais como moléculas de ligação, dos extratos isentos de células ou meio de cultura são bem conhecidos pela pessoa habilitada na técnica. As moléculas de ligação, variantes funcionais e/ou
10 imunocjugados como obténivel pelo método descrito acima também são uma parte da presente invenção.

Alternativamente, seguindo à expressão nos hospedeiros, tal como células hospedeiras, as moléculas de ligação e os imunocjugados da invenção podem ser produzidos sinteticamente pelos sensibilizadores de
15 peptídeo convencionais ou em sistemas de tradução isentos de célula usando-se ácido nucléico de RNA derivado de moléculas de DNA de acordo com a invenção. As moléculas de ligação e os imunocjugados quando obténivel pelos métodos de produção sintéticos descritos acima ou sistemas de tradução isentos de célula também são uma parte da presente invenção.

20 Ainda, em uma outra forma de realização, moléculas de ligação da presente invenção também podem ser produzidas em mamíferos não humanos transgênicos, tais como *inter alia* coelhos, cabras ou vacas e secretado , por exemplo, no seu leite.

25 Ainda, em uma outra forma de realização alternativa, as moléculas de ligação de acordo com a presente invenção, preferivelmente as moléculas de ligação humanas ligam-se especificamente ao vírus influenza H3N2 ou um fragmento deste, pode ser gerado por mamíferos não humanos transgênicos, tais como, por exemplo, camundongos ou coelhos transgênicos, que expressam os genes de imunoglobulina humana. Preferivelmente, os

mamíferos não humanos transgênicos têm um genoma que compreende um transgene de cadeia pesada humano e um transgene de cadeia leve humano que codifica todos ou uma porção das moléculas de ligação humanas como descrito acima. Os mamíferos não humanos transgênicos podem ser imunizados com uma preparação purificada ou enriquecida de vírus influenza H3N2 ou um fragmento deste. Os protocolos para a imunização de mamíferos não humanos são bem estabelecidos na técnica. Ver *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Editado por: E. Harlow, D. Lane (1998), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York and *Current Protocols in Immunology*, Editado por: J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober (2001), John Wiley & Sons Inc., New York, cujas divulgações são incorporadas neste por referência. Os protocolos de imunização incluem imunizações múltiplas, com ou sem adjuvantes, tais como adjuvante completo de Freund e adjuvante incompleto de Freund, mas também pode incluir imunizações de DNA nu. Em uma outra forma de realização, as moléculas de ligação humanas são produzidas por células B, plasma e/ou células de memória derivadas dos animais transgênicos. Ainda, em uma outra forma de realização, as moléculas de ligação humanas são produzidas por hibridomas, que são preparados pela fusão de células B obtidas a partir de mamíferos não humanos transgênicos descritos acima para as células imortalizadas. As células B, células de plasma e hibridomas como obténível a partir dos mamíferos não humanos transgênicos descritos acima e as moléculas de ligação humanas como obténível a partir dos mamíferos não humanos transgênicos descritos acima, células B, plasma e/ou células de memória e hibridomas também são uma parte da presente invenção.

Em um aspecto adicional, a invenção fornece um método de identificação da molécula de ligação, tal como uma molécula de ligação humana, por exemplo, um anticorpo monoclonal humano ou fragmento deste, especificamente ligação ao vírus influenza H3N2 ou moléculas de ácido

nucléico que codifica tais moléculas de ligação e compreendem as etapas de:

(a) contactar uma coleção de moléculas de ligação na superfície das embalagens genéticas aplicáveis com vírus influenza H3N2 ou um fragmento deste sob condições úteis a ligação, (b) seleção de pelo menos uma vez para

5 uma ligação de embalagem genética replicável ao vírus influenza H3N2 ou um fragmento deste, (c) separação e recuperação da ligação de embalagem genética replicável ao vírus influenza H3N2 ou um fragmento deste a partir das embalagens genéticas aplicáveis que não ligam-se ao vírus influenza H3N2 ou um fragmento deste. Uma embalagem genética replicável como

10 usado neste pode ser procariótico ou eucariótico e incluem células, esporos, leveduras, bactéria, vírus, (bacterio)fago, ribossomos e polissomos. Uma embalagem genética replicável preferida é um fago. As moléculas de ligação, tal como, por exemplo, Fvs de cadeia simples, são apresentados na embalagem genética replicável, isto é estes são ligados a um grupo ou

15 molécula localizada em uma superfície exterior da embalagem genética replicável. A embalagem genética replicável é uma unidade avaliável que compreende a molécula de ligação a ser avaliada ligada a uma molécula de ácido nucléico que codifica uma molécula de ligação. A molécula de ácido nucléico deve ser replicável *in vivo* (por exemplo, como um vetor) ou *in vitro*

20 (por exemplo, por PCR, transcrição e tradução). A replicação *in vivo* pode ser autônoma (como para uma célula), com a assistência de fatores hospedeiros (como para um vírus) ou com a assistência de tanto o vírus hospedeiro quanto o auxiliar (como para um fagomídeo). As embalagens genéticas aplicáveis apresentam uma coleção de moléculas de ligação que são formadas pela

25 introdução das moléculas de ácidos nucléicos que codifica as moléculas de ligação exógenas a serem apresentadas nos genomas das embalagens genéticas aplicáveis para formar as proteínas de fusão com proteínas endógenas que são normalmente expressadas a partir da superfície exterior das embalagens genéticas aplicáveis. A expressão das proteínas de fusão,

transporte à superfície externa e resulta a montagem na apresentação das moléculas de ligação exógenas a partir da superfície exterior das embalagens genéticas aplicáveis.

As etapas de seleção nos métodos de acordo com a presente invenção podem ser realizadas com vírus H3N2 de influenza que estão vivos e ainda infectivos ou inativados. A inativação de vírus influenza H3N2 pode ser realizada pelos métodos de inativação viral bem conhecido ao técnico habilitado tal como *tratamento inter alia* com formalina, β -propiolactona (BPL), mertiolato, e/ou luz ultravioleta. Os métodos para testar, se os vírus influenza H3N2 ainda estão vivos, infectivos e/ou viáveis ou parcialmente ou completamente inativados são bem conhecidos à pessoa habilitada na técnica. Os vírus influenza H3N2 usados no método acima não necessita estar na forma purificada, por exemplo, pode estar presente no soro e/ou sangue de um indivíduo infectado. Os vírus influenza H3N2 usados também podem ser isolados de cultura celular em um meio adequado.

Em uma forma de realização os vírus influenza H3N2 é uma suspensão quando contactado com as embalagens genéticas aplicáveis. Alternativamente, estes também podem ser ligados a um carregador quando o contato acontece. Em uma forma de realização uma primeira seleção adicional pode acontecer contra uma cepa do vírus influenza H3N2. Alternativamente, o primeiro e ciclos de seleção adicional podem ser realizados contra as cepas do vírus influenza H3N2 diferentes. Alternativamente, as etapas de seleção podem ser realizadas na presença de um fragmento de vírus influenza H3N2 tal como, por exemplo, preparações da membrana celular, proteínas H3N2 recombinantes ou polipeptídeos, proteínas de fusão que compreendem as proteínas H3N2 ou polipeptídeos, células que expressam as proteínas H3N2 recombinantes ou polipeptídeos e outros. Partes extracelularmente expostas destas proteínas ou polipeptídeos também podem ser usadas como material de seleção. Os fragmentos de vírus

influenza H3N2 podem ser imobilizado a um material adequado antes do uso ou pode ser usado na suspensão. Em uma forma de realização a seleção pode ser realizada nos fragmentos diferentes de vírus influenza H3N2 ou fragmentos de cepas de vírus influenza H3N2 diferentes. Observando as
5 combinações de seleção adequadas são bem dentro da capacidade do técnico habilitado. As seleções podem ser realizadas pelos ELISA ou FACS.

Ainda em um aspecto adicional, a invenção fornece um método de obter uma molécula de ligação especificamente ligação a uma cepa do vírus influenza H3N2 ou fragmento deste ou uma molécula de ácido
10 nucléico que codifica uma tal molécula de ligação, em que o método compreende as etapas de a) realização dos métodos descritos acima da identificação das moléculas de ligação e b) isolamento da embalagem genética recuperada replicável da molécula de ligação e/ou a molécula de
15 ácido nucléico que codifica uma molécula de ligação. A coleção das moléculas de ligação na superfície das embalagens genéticas aplicáveis pode ser uma coleção de scFvs ou Fabs. Uma vez um novo scFv ou Fab foi estabelecido ou identificado com o método de identificação mencionado acima das moléculas de ligação ou moléculas de ácido nucléico que codificam
20 uma moléculas de ligação, o DNA que codifica o scFv ou Fab pode ser isolado a partir da bactéria ou fago e combinado com as técnicas biológicas moleculares padrão para fabricar as construções que codificam scFvs, scFvs bivalentes, Fabs ou imunoglobulinas humanas completas de uma especificidade desejada (por exemplo, IgG, IgA ou IgM). Estas construções podem ser transfectadas nas linhas celulares adequadas e anticorpos
25 monoclonais humanos completos podem ser eventualmente produzidos (ver Huls *et al.*, 1999; Boel *et al.*, 2000).

Como mencionado antes a embalagem genética replicável preferida é um fago. Os métodos de apresentação de fago para a identificação e obtenção das moléculas de ligação (humano), por exemplo, anticorpos

monoclonais (humano), são métodos bem estabelecidos conhecidos aquela pessoa habilitada na técnica. Estes são, por exemplo, descritos no Número de Patente U.S. 5.696.108; Burton and Barbas, 1994; de Kruif *et al.*, 1995b; and Apresentação de fago: A Laboratory Manual. Edited by: CF Barbas, DR
5 Burton, JK Scott and GJ Silverman (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Todas estas referências são com isso incorporado neste em sua totalidade. Para a construção das bibliotecas de apresentação de fago, coleções de genes de região variável de cadeia leve e pesada de anticorpo monoclonal humano são expressadas na superfície de
10 bacteriófago, preferivelmente bacteriófago filamentosos, partículas, em, por exemplo, Fv de cadeia simples (scFv) ou no formato Fab (ver de Kruif *et al.*, 1995b). Amplas bibliotecas de fagos que expressam o fragmento de anticorpo tipicamente contêm mais do que $1,0 \times 10^9$ de especificidades de anticorpo e pode ser montados das regiões V de imunoglobulina expressadas nos
15 linfócitos B de indivíduos imunizados ou não imunizados. Em uma forma de realização específica da invenção a biblioteca de fago das moléculas de ligação, preferivelmente biblioteca de fago scFv, é preparada de RNA isolados de células obtidas a partir do paciente que foram vacinados contra o vírus influenza, recentemente vacinado contra um patógeno não relacionado,
20 recentemente sofrem de uma infecção do vírus influenza H3N2 ou de um indivíduo saudável. O RNA pode ser isolado da medula óssea *inter alia* ou sangue periférico, preferivelmente linfócitos do sangue periférico ou células B isoladas ou ainda as subpopulações das células B tal como células B de memória, identificadas como células B CD24+/CD27+. O paciente pode ser
25 um animal, preferivelmente um humano. Em uma forma de realização preferida as bibliotecas podem ser reunidas a partir das regiões V de imunoglobulina expressadas por células B de memória IgG, identificadas como células IgM+/CD24+/CD27+.

Alternativamente, as bibliotecas de apresentação de fago

podem ser construídas de regiões variáveis de imunoglobulina que foram parcialmente reunidos *in vitro* para introduzir a diversidade de anticorpo adicional na biblioteca (bibliotecas semi-sintéticas). Por exemplo, as regiões variáveis reunidas *in vitro* contém extensões de DNA sinteticamente produzidos, aleatórios ou parcialmente aleatórios nas regiões das moléculas que são importantes para a especificidade de anticorpos, por exemplo, regiões CDR. Os anticorpos de fago específicos para os vírus influenza H3N2 podem ser selecionados da biblioteca pela exposição do vírus ou fragmento deste a uma biblioteca de fago para permitir a ligação dos fagos que expressam os fragmentos de anticorpo específicos para o vírus ou fragmento deste. Os fagos não ligados são removidos pela lavagem e fagos de ligação eluídos para a infecção da bactéria *E.coli* e propagação subsequente. Os ciclos múltiplos de seleção e propagação são usualmente requeridos para enriquecer suficientemente para a ligação dos fagos especificamente ao vírus ou fragmento deste. Se desejado, antes da exposição da biblioteca de fago ao vírus ou fragmento deste da biblioteca de fago primeiro pode ser subtraído pela exposição da biblioteca de fago ao material não alvo tal como vírus ou fragmentos deste da cepa diferente, isto é não vírus influenza H3N2. Este vírus subtrator ou fragmentos destes podem ser ligados a uma fase sólida ou podem ser na suspensão. Os fagos também podem ser selecionados para a ligação aos antígenos do complexo tal como misturas de complexo de proteínas H3N2 ou (poli)peptídeos opcionalmente suplementados com outro material. As células hospedeiras que expressam uma ou mais proteínas ou (poli)peptídeos de vírus influenza H3N2 também podem ser usados para os propósitos de seleção. Um método de apresentação de fago usando estas células hospedeiras podem ser estendidas e melhoradas pela subtração dos ligadores não relevantes durante a avaliação da adição de um excesso das células hospedeiras que não compreendem as moléculas alvos ou moléculas não alvos que são similares, mas não idêntica, ao alvo e portanto fortemente

intensificando a oportunidade de observar as moléculas de ligação relevante. É claro, a subtração pode ser realizada antes, durante ou após a avaliação com o vírus ou fragmentos destes. O processo é referido como o processo MABSTRACT[®] (MABSTRACT[®] é uma marca comercial registrada de
5 Crucell Holland B.V., ver também Número de Patente U.S. 6.265.150 que é incorporado neste por referência).

Já em outro aspecto a invenção fornece um método de obter uma molécula de ligação potencialmente tendo atividade neutralizadora contra o vírus influenza H3N2, em que o método compreende as etapas de (a)
10 realizar o método de obter uma molécula de ligação especificamente ligação ao vírus influenza H3N2 ou um fragmento deste ou uma molécula de ácido nucléico que codifica tal a molécula de ligação como descrito acima e (b) verificar se uma molécula de ligação isolada tem atividade neutralizadora contra o vírus, preferivelmente contra pelo menos uma ou mais cepas do vírus
15 influenza H3N2 selecionadas do grupo que consiste de A/Hong Kong/1/68, A/Johannesburg/33/94, A/Panama/2007/99, A/Wisconsin/67/2005 e A/Hiroshima/52/2005, preferivelmente todas as cepas de H3N2, em particular todas as cepas H3N2 conhecidas e futuras. Os ensaios para a verificação se uma molécula de ligação tem atividade neutralizadora são bem conhecidas na
20 técnica (ver WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, Geneva: World Health Organisation, 2005 version 2002.5).

Em um aspecto adicional a invenção pertence a uma molécula de ligação humana tendo atividade neutralizadora contra pelo menos vírus influenza A que compreende HA do subtipo H3, obtido por um dos métodos
25 como descrito acima.

Ainda em um aspecto adicional, a invenção fornece as composições que compreendem pelo menos a molécula de ligação preferivelmente um anticorpo monoclonal humano de acordo com a invenção, pelo menos uma variante funcional deste, pelo menos um imunocombinado de

acordo com a invenção e/ou uma combinação deste. Além disso, as composições podem compreender moléculas de estabilização *inter alia*, tal como albumina ou polietileno glicol, ou sais. Preferivelmente, os sais usados são sais que retém a atividade biológica desejada das moléculas de ligação e não prejudicam quaisquer efeitos toxicológico indesejado. Se necessário, as moléculas de ligação humanas da invenção podem ser revestidas em ou em um material para proteger estes da ação dos ácidos ou outras naturais ou não naturais que podem inativar as moléculas de ligação.

Ainda em um aspecto adicional, a invenção fornece as composições que compreendem pelo menos a molécula de ácido nucléico como definido na presente invenção. As composições podem compreender soluções aquosas tal como soluções aquosas contendo sais (por exemplo, NaCl ou sais como descrito acima), detergentes (por exemplo, SDS) e/ou outros componentes adequados.

Além disso, a presente invenção diz respeito às composições farmacêuticas que compreende pelo menos a molécula de ligação tal como um anticorpo monoclonal humano da invenção (ou fragmento funcional ou variante deste), pelo menos um imunocjugado de acordo com a invenção, pelo menos uma composição de acordo com a invenção, ou combinações destes. A composição farmacêutica da invenção ainda compreende pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável. Os excipientes farmacêuticamente aceitáveis são bem conhecidos à pessoa habilitada. A composição farmacêutica de acordo com a invenção ainda pode compreender pelo menos um outro agente terapêutico. Os agentes adequados também são bem conhecidos ao técnico habilitado.

Em uma forma de realização preferida a composição farmacêutica de acordo com a invenção compreende pelo menos uma molécula de ligação adicional, isto é a composição farmacêutica pode ser um coquetel ou mistura das moléculas de ligação. A composição farmacêutica

pode compreender pelo menos duas moléculas de ligação de acordo com a invenção, ou pelo menos uma molécula de ligação de acordo com a invenção e pelo menos ainda uma ligação de vírus influenza e/ou neutralização da molécula. Em outra forma de realização a molécula de ligação adicional pode ser formulada pela administração sequencial ou separado simultâneo.

Em uma forma de realização as composições farmacêuticas podem compreender duas ou mais moléculas de ligação que tem neutralização da atividade contra vírus influenza A que compreende HA do subtipo H3, tal como H3N2. Em uma forma de realização, as moléculas de ligação exibem atividade de neutralização sinérgica, quando usado em combinação. Em outras palavras, as composições podem compreender pelo menos duas moléculas de ligação tendo atividade neutralizadora, caracterizada em que as moléculas de ligação atuam sinérgicamente na neutralização dos vírus influenza H3N2. Como usado neste, o termo “sinérgico” significa que o efeito combinado das moléculas de ligação quando usado em combinação é maior do que seus efeitos aditivos quando usado individualmente. As moléculas de ligação sinérgicamente atuam e pode ligar as estruturas diferentes no mesmo ou fragmentos distintos de vírus influenza H3N2. Uma maneira de calcular a sinergia é por significar o índice de combinação. O conceito do índice de combinação (CI) foi descrito por Chou and Talalay (1984). As composições pode, por exemplo, compreender uma molécula de ligação tendo atividade neutralizadora e um não neutraliza a molécula de ligação específica por H3N2. A neutralização e não neutralização das moléculas de ligação específicas para H3N2 também podem atuar sinérgicamente na neutralização do vírus influenza H3N2.

Em uma forma de realização, a composição farmacêutica pode compreender pelo menos dois vírus influenza neutralizando as moléculas de ligação, em que pelo menos uma molécula de ligação é capaz de neutralizar um ou mais subtipos de vírus influenza do grupo filogenético 1 e em que pelo

menos uma molécula de ligação é capaz de neutralizar um ou mais subtipos do vírus influenza do grupo filogenético 2.

Em uma forma de realização, a composição farmacêutica pode compreender pelo menos uma molécula de ligação de acordo com a invenção e pelo menos um vírus influenza adicional neutralizando a molécula de ligação.

Em outra forma de realização, os vírus influenza adicionais neutralizando a molécula de ligação preferivelmente é capaz da ligação e neutraliza um vírus influenza de um subtipo diferente, preferivelmente um vírus influenza que compreende HA de H1, tal como H1N1, e/ou HA do subtipo H5, tal como H5N1, tal como as moléculas de ligação como divulgado em WO 2008/028946. Ainda mais preferivelmente a dita molécula de ligação adicional é uma molécula de ligação de neutralização cruzada contra (todas) os subtipos de vírus influenza do grupo filogenético 1, incluindo H1, H2, H5, H9. Em uma forma de realização preferida, a molécula de ligação adicional é uma molécula de ligação identificada como CR6261 em WO 2008/028946, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende aminoácidos 1-121 da sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 186, ou uma variante funcional deste, e/ou uma região variável de cadeia leve que compreende aminoácidos 1-112 da SEQ ID N°: 188. Já em outra forma de realização a molécula de ligação compreende uma cadeia leve e pesada que compreende as sequências de aminoácidos da SEQ ID N°: 186 e SEQ ID N°: 188, respectivamente. As moléculas de ligação na composição farmacêutica deste modo preferivelmente são capazes de reagir com vírus influenza dos subtipos diferentes. As moléculas de ligação devem ser de afinidade alta e deve ter uma especificidade ampla. Preferivelmente, ambas moléculas de ligação são moléculas de neutralização cruzada em que cada vírus influenza neutraliza os subtipos diferentes. Além disso, preferivelmente estes neutralizam como muitas cepas de cada um do subtipo de vírus

influenza diferente como possível.

Uma composição farmacêutica de acordo com a invenção ainda pode compreender pelo menos um outro agente terapêutico, profilático e/ou diagnóstico. Preferivelmente, a composição farmacêutica compreende pelo menos um outro agente profilático e/ou terapêutico. Preferivelmente, os ditos agentes terapêuticos adicionais e/ou profiláticos são agentes capazes de prevenir e/ou tratar uma infecção do vírus influenza H3N2 e/ou uma condição resultando de uma tal infecção. Os agentes terapêuticos e/ou profiláticos incluem, mas não são limitados a, agentes anti-virais. Tais agentes podem ser moléculas de ligação, moléculas menores, compostos orgânicos ou inorgânicos, enzimas, sequências de polinucleotídeos, peptídeos anti-virais, etc. Outros agentes que são correntemente usados para tratar os pacientes infectados com vírus influenza H3N2 são inibidores M2 (por exemplo, inibidores de amantidina, rimantadina) e/ou neuraminidase (por exemplo, zanamivir, oseltamivir). Estes podem ser usados em combinação com uma molécula de ligação da invenção. “Em combinação” neste significa simultaneamente, como formulações separadas, ou como uma formulação combinada simples, ou de acordo com um regime de administração sequencial como as formulações separadas, em qualquer ordem. Os agentes capazes de evitar e/ou tratar uma infecção com vírus influenza H3N2 e/ou uma condição resultante de uma tal infecção que são na fase experimental também deve ser usado como outros agentes terapêuticos e/ou profiláticos úteis na presente invenção.

As moléculas de ligação ou composições farmacêuticas da invenção podem ser testadas nos sistemas de modelo animal adequado antes do uso em humanos. Tais sistemas de modelo animal incluem, mas não são limitados a, camundongo, furão e macaco.

Tipicamente, as composições farmacêuticas devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenagem. As moléculas de

ligação, imunoconjugados, moléculas de ácidos nucleicos ou composições da presente invenção podem ser na forma em pó para a reconstituição no excipiente farmacologicamente aceitável apropriado antes ou no tempo de liberação. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis 5 estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem à vácuo e secagem por congelamento (liofilização) que produziu um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional de uma solução filtrada previamente estéril deste.

Alternativamente, as moléculas de ligação, 10 imunoconjugados, moléculas de ácidos nucleicos ou composições da presente invenção pode ser na solução e o excipiente farmacologicamente aceitável apropriado pode ser adicionado e/ou misturado antes ou no tempo de liberação para fornecer uma forma injetável de dosagem unitária. Preferivelmente, o excipiente farmacologicamente aceitável usado na presente 15 invenção é adequado a concentração de medicamento alto, pode manter a fluidez própria e, se necessário, pode atrasar a absorção.

A escolha da via ótima de administração das composições farmacêuticas serão influenciada por diversos fatores incluindo as propriedades físico-químico das moléculas ativas dentro das composições, a 20 urgência da situação clínica e a conexão das concentrações de plasma das moléculas ativas ao efeito terapêutico desejado. Por exemplo, se necessário, as moléculas de ligação da invenção podem ser preparadas com os carregadores que evitará contra a liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastos transdérmicos e 25 sistemas de liberação microencapsulados. Os polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados *inter alia*, tal como acetato de etileno vinil, polianidretos, ácidos poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido poliláctico. Além disso, este pode ser necessário para revestir uma molécula de ligação com ou co-administrar as moléculas de ligação com, um material

ou composto que evita a inativação das moléculas de ligação humanas. Por exemplo, as moléculas de ligação podem ser administradas a um paciente em um carregador apropriado, por exemplo, lipossomos ou um diluente.

5 As vias de administração podem ser divididas em duas categorias principais, administração oral e parenteral. A via de administração preferida é intravenosa ou por inalação.

10 As formas de dosagem orais podem ser formuladas *inter alia* como tabletes, pastilhas, pastilhas expectorantes, suspensões aquosas ou oleosas, pós dispersíveis ou grânulos, emulsões, cápsulas duras, cápsulas de gelatina macias, xaropes ou elixirs, pílulas, drágeas, líquidos, géis, ou pastas. Estas formulações podem conter os excipientes farmacêuticos incluindo, mas não limitado a, diluentes inertes, agentes de granulação e desintegrantes, agentes de ligação, agentes lubrificantes, conservantes, agentes de coloração, flavorizantes ou adoçantes, óleos vegetais ou minerais, agentes umectantes e
15 agentes espessantes.

As composições farmacêuticas da presente invenção também podem ser formuladas pela administração parenteral. As formulações para a administração parenteral pode ser *inter alia* na forma de injeção não tóxica estéril isotônica não aquosa ou aquosa ou soluções de infusão ou suspensões.
20 As soluções ou suspensões podem compreender agentes que são não tóxicos aos recipientes nas dosagens e concentrações utilizadas tal como 1,3-butanodiol, solução de Ringer, solução de Hank, solução de cloreto de sódio isotônico, óleos, ácidos graxos, agentes anestésicos locais, conservantes, tampões, viscosidade ou agentes que aumentam a solubilidade, antioxidantes
25 solúveis em água, antioxidantes solúveis em óleo e agentes quelantes metálicos.

Em um aspecto adicional, as moléculas de ligação tal como anticorpos monoclonais humanos (fragmentos funcionais e variantes destes), imunoconjugados, composições, ou composições farmacêuticas da invenção

podem ser usados como um medicamento. Deste modo, um método de diagnóstico, tratamento e/ou prevenção de uma infecção do vírus influenza H3N2 usando uma molécula de ligação, imunoconjugados, composições, ou composições farmacêuticas da invenção é outra parte da presente invenção.

5 As moléculas mencionadas acima podem ser usadas *inter alia* no diagnóstico, profilaxia, tratamento ou combinação deste, de uma infecção do vírus influenza H3N2. Estes são adequados para o tratamento de ainda pacientes não tratados que sofrem de uma infecção do vírus influenza H3N2 e pacientes que foram ou não são tratados por uma infecção do vírus influenza H3N2.

10 As moléculas ou composições mencionadas acima pode ser utilizado em conjunção com outras moléculas úteis no diagnóstico, profilaxia e/ou tratamento. Estes podem ser usados *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Por exemplo, as moléculas de ligação tal como anticorpos monoclonais humanos (ou variantes funcionais destes), imunoconjugados, composições ou
15 composições farmacêuticas da invenção podem ser co-administradas com uma vacina contra o vírus influenza H3N2 (se disponível). Alternativamente, a vacina também pode ser administrado antes ou após a administração das moléculas da invenção. Em vez da vacina, os agentes anti-virais também podem ser utilizados em conjunção com as moléculas de ligação da presente
20 invenção. Os agentes anti-virais adequados são mencionados acima.

As moléculas são tipicamente formuladas nas composições e composições farmacêuticas da invenção em uma quantidade terapeuticamente ou diagnosticamente efetiva. Alternativamente, este pode ser formulado e administrado separadamente. Por exemplo as outras moléculas tal como os
25 agentes anti-virais podem ser aplicados sistemicamente, enquanto uma molécula de ligação da invenção pode ser aplicada intravenosamente.

O tratamento pode ser alvejado nos grupos de pacientes que são susceptíveis a infecção H3N2. Tais grupos de paciente incluem, mas não são limitados a, por exemplo, a idade avançada (por exemplo, ≥ 50 anos de

idade, ≥ 60 anos de idade e preferivelmente ≥ 65 anos de idade), a juventude (por exemplo, ≤ 5 anos de idade, ≤ 1 ano de idade), pacientes hospitalizados e pacientes que foram tratados com um composto anti-viral mas tem mostrado uma resposta anti-viral inadequada.

5 Os regimes de dosagens podem ser ajustados para fornecer a ótima resposta desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica). Uma faixa de dosagem adequada pode ser, por exemplo, 0,1-100 mg/kg de peso corporal, preferivelmente 1-50 mg/kg de peso corporal, preferivelmente 0,5-15 mg/kg de peso corporal. Além disso, por exemplo, um bolo simples pode ser administrado, diversas dosagens divididas podem ser administradas em 10 tempo ou a dosagem pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica. As moléculas e composições de acordo com a presente invenção são preferivelmente estéreis. Os métodos para retribuir esta molécula e composições estéreis são bem conhecidos na técnica. As outras moléculas úteis no diagnóstico, profilaxia 15 e/ou tratamento podem ser administrados em um regime de dosagem similar como proposto para as moléculas de ligação da invenção. Se as outras moléculas são administradas separadamente, estas podem ser administradas a um paciente antes de (por exemplo, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 7 dias, 2 semanas, 4 semanas ou 6 semanas anteriores), concomitantemente com, ou subsequente a (por exemplo, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 7 dias, 2 semanas, 4 semanas ou 6 semanas posteriores) a administração de uma ou mais das moléculas de ligação humanas ou composições farmacêuticas da invenção. O regime de dosagem exato é usualmente curto ou durante os 25

ter uma porte de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco tendo um tampa perfurada pela agulha de injeção hipodérmica). O kit ainda pode compreender mais recipientes que compreendem um tampão farmacologicamente aceitável. Ainda pode incluir
5 outros materiais desejados a partir do comercial e ponto de vista do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas, meio de cultura por um ou mais dos hospedeiros adequados e, possivelmente, ainda pelo menos um outro agente terapêutico, profilático ou diagnóstico. Associado com os kits podem ser instruções habitualmente incluído nas embalagens
10 comerciais de produtos terapêuticos, profiláticos ou diagnósticos, que contém informação de cerca de, por exemplo, as indicações, uso, dosagem, fabricação, administração, contra-indicações e/ou advertências que diz respeito ao uso de tais produtos terapêuticos, profiláticos ou diagnósticos.

As moléculas de ligação de acordo com a presente invenção
15 também podem ser vantajosamente usadas como um agente diagnóstico em um método *in vitro* para a detecção do vírus influenza de subtipo 2 do grupo filogenético. A invenção deste modo ainda pertence ao método de detecção do vírus influenza de subtipo 2 do grupo filogenético em uma amostra, em que o método compreende as etapas de (a) contactar uma amostra com uma
20 quantidade diagnosticamente efetiva da molécula de ligação (fragmentos funcionais e variantes destes) ou um imunocombinado de acordo com a invenção e (b) determinar se a molécula de ligação ou imunocombinado especificamente liga-se a molécula da amostra. A amostra pode ser uma amostra biológica incluindo, mas não limitado um sangue, soro, fezes,
25 expectoração, aspirados nasofaríngeos, lavagens bronquiais, urina, tecido ou outro material biológico de pacientes infectados (potencialmente), ou uma amostra não biológica tal como água, bebida, etc. Os pacientes infectados (potencialmente) podem ser pacientes humanos, mas também animais que são suspeitos como carregadores de vírus influenza de subtipo 2 do grupo

filogenético 2 e deve ser testado pela presença do vírus usando as moléculas de ligação humana ou imunoconjugados da invenção. A amostra primeiro pode ser manipulada para fabricar mais adequados para o método de detecção. A manipulação significa o tratamento *inter alia* da amostra suspeita por
5 conter e/ou contendo o vírus em uma tal maneira que o vírus desintegrará nos componentes antigênicos tal como proteínas, (poli)peptídeos ou outros fragmentos antigênicos. Preferivelmente, as moléculas de ligação humanas ou imunoconjugados da invenção são contactados com uma amostra sob condições que permite a formação de um complexo imunológico entre as
10 moléculas de ligação humanas e o vírus ou componentes antigênicos destes que podem estar presentes em uma amostra. A formação de um complexo imunológico, se qualquer, indicando a presença do vírus em uma amostra, é então detectado e medido por meios adequados. Tais métodos incluem, *inter alia*, imunoenaios de ligação heterogêneos e homogêneos, tal como radio-
15 imunoenaios (RIA), ELISA, imunofluorescência, imunistoquímica, FACS, BIACORE e análise Western blot.

As técnicas de ensaio preferidas, especialmente para a avaliação clínica de ampla escala do soro de paciente e sangue e produtos derivados de sangue são as técnicas ELISA e Western blot. Os testes ELISA
20 são particularmente preferidos. Para uso como reagentes nestes ensaios, as moléculas de ligação ou imunoconjugados da invenção são convenientemente ligados a superfície interna dos reservatórios microtituladores. As moléculas de ligação ou imunoconjugados da invenção podem ser diretamente ligados ao reservatório microtitulador. Entretanto, a ligação máxima das moléculas de
25 ligação ou imunoconjugados da invenção aos reservatórios devem ser acompanhados pelo pré-tratamento dos reservatórios com polilisina antes da adição das moléculas de ligação ou imunoconjugados da invenção. Além disso, as moléculas de ligação ou imunoconjugados da invenção podem ser covalentemente ligados por meios conhecidos aos reservatórios. Geralmente,

as moléculas de ligação ou imunoconjugados são usados entre 0,01 a 100 µg/ml por revestimento, embora as quantidades maiores bem como menores também podem ser usadas. As amostras são então adicionadas aos reservatórios revestidas com as moléculas de ligação ou imunoconjugados da invenção.

Além disso, as moléculas de ligação da invenção podem ser usadas para identificar as estruturas de ligação específicas de vírus influenza H3N2. As estruturas de ligação podem ser epítomos nas proteínas e/ou polipeptídeos. Estes podem ser lineares, mas também estruturais e/ou conformacionais. Em uma forma de realização, as estruturas de ligação podem ser analisadas por meio da análise PEPSCAN (ver *inter alia* WO 84/03564, WO 93/09872, Sloodstra *et al.*, 1996). Alternativamente, uma biblioteca de peptídeo aleatório que compreende os peptídeos de uma proteína de vírus influenza H3N2 pode ser avaliado pelos peptídeos capazes da ligação as moléculas de ligação da invenção. As estruturas de ligação/peptídeos/epítomos observados podem ser usados como vacinas e para o diagnóstico das infecções do vírus influenza H3N2. nos caso de fragmentos outros do que proteínas e/ou polipeptídeos são ligados pelas moléculas de ligação, estruturas de ligação podem ser identificados por meio de espectrometria de massa, cromatografia líquida de desempenho alto e ressonância magnética nuclear.

Em um aspecto adicional, a invenção fornece um método de avaliação da molécula de ligação (ou um fragmento funcional ou variante deste) para a ligação específica ao mesmo epítomo de vírus influenza H3N2, como o epítomo ligado por uma molécula de ligação humana da invenção, em que o método compreende as etapas de (a) contactar uma molécula de ligação a ser avaliada, a molécula de ligação da invenção e vírus influenza H3N2 ou um fragmento deste, (b) medir se a molécula de ligação a ser avaliada é capaz de competir para a especificamente ligação ao vírus influenza H3N2 ou um

fragmento deste com a molécula de ligação da invenção. Em uma etapa adicional pode ser determinada, se as moléculas de ligação avaliadas que são capazes de competir para a ligação especificamente ao vírus influenza H3N2 ou um fragmento deste tem a neutralização da atividade. A molécula de ligação que é capaz de competir para a ligação especificamente ao vírus influenza H3N2 ou um fragmento deste com a molécula de ligação da invenção é outra parte da presente invenção. No método de avaliação descrito acima, “ligação especificamente ao mesmo epítipo” também considera a ligação específica ao mesmo epítipo substancialmente ou essencialmente como o epítipo ligado pela molécula de ligação da invenção. A capacidade de bloquear, ou competir com, a ligação das moléculas de ligação da invenção ao vírus influenza H3N2 tipicamente indicam que a molécula de ligação a ser avaliado liga-se a um epítipo ou local de ligação no vírus influenza H3N2 que estruturalmente sobrepõe com o local de ligação no vírus influenza H3N2 que é imuno especificamente reconhecido pelas moléculas de ligação da invenção. Alternativamente, este pode indicar que a molécula de ligação a ser avaliada liga-se a um epítipo ou local de ligação que é suficientemente próximo ao local de ligação imuno especificamente reconhecido pelas moléculas de ligação da invenção para inibir estericamente ou de outra maneira a ligação das moléculas de ligação da invenção ao vírus influenza H3N2.

Em geral, a inibição competitiva é medida por meios de um ensaio, em que uma composição de antígeno, isto é uma composição que compreende vírus influenza H3N2 ou fragmentos destes, é misturado com referências das moléculas de ligação, isto é as moléculas de ligação da invenção e moléculas de ligação a serem avaliadas. Usualmente, as moléculas de ligação a serem avaliadas estão presentes em excesso. Os protocolos com base em ELISAs e Western blotting são adequados para uso em tais estudos de competição simples. Pelo uso de espécies ou anticorpos secundários de

isotipo uma pessoa será capaz de detectar a referência da ligação das moléculas de ligação, a ligação de que será reduzida pela presença da molécula de ligação a ser avaliada que reconhece substancialmente o mesmo epítopo. Em conduta, o estudo de competição da molécula de ligação entre a

5 referência da molécula de ligação e qualquer molécula de ligação a ser avaliada (sem restrição das espécies ou isotipo), um pode primeiro rotular a referência da molécula de ligação com um rótulo detectável, tal como, por exemplo, biotina, um enzimático, um radioativo ou outro rótulo para capacitar a identificação subsequente. As moléculas de ligação identificadas pelos

10 ensaios de competição (“moléculas de ligação competitivas” ou “moléculas de ligação reativas cruzadas”) incluem, mas não são limitados a, anticorpos, fragmentos de anticorpo e outros agentes de ligação que ligam-se a um epítopo ou local de ligação ligado por referência da molécula de ligação, isto é a molécula de ligação da invenção, bem como anticorpos, fragmentos de

15 anticorpos e outros agentes de ligação que ligam-se a um epítopo ou local de ligação suficientemente próximo a um epítopo ligado pela referência da molécula de ligação para a ligação competitiva entre as moléculas de ligação a serem avaliadas e a referência da molécula de ligação ocorrem. Preferivelmente, as moléculas de ligação competitivas da invenção, quando

20 presente em excesso, inibirá a ligação específica da referência da molécula de ligação às espécies alvos selecionados por pelo menos 10 %, preferivelmente por pelo menos 25 %, mais preferivelmente por pelo menos 50 % e mais preferivelmente por pelo menos 75 % a 90 % ou ainda mais. A identificação de uma ou mais moléculas de ligação competitivas que ligam-se a cerca de,

25 substancialmente, essencialmente ou no mesmo epítopo das moléculas de ligação da invenção é um assunto técnico direto. Como a identificação das moléculas de ligação competitivas é determinada em comparação a uma referência da molécula de ligação, isto é a molécula de ligação da invenção, será entendido que atualmente determina o epítopo no qual a referência da

molécula de ligação e a molécula de ligação competitiva não liga-se em qualquer maneira requerido a fim de identificar uma molécula de ligação competitiva que ligam-se ao mesmo ou substancialmente o mesmo epítipo como a referência da molécula de ligação. A invenção ainda é ilustrada nos seguintes exemplos e figuras. Os exemplos não são pretendidos limitar dentro do escopo da invenção em qualquer maneira.

EXEMPLOS

Exemplo 1 Construção de bibliotecas de apresentação de fago scFv usando RNA extraído de células B de memória

10 O sangue periférico foi coletado a partir dos doadores saudáveis normais por venopunção nos tubos de amostras de anti-coagulação EDTA. As bibliotecas de apresentação de fago scFv foram obtidas como descritos no WO 2008/028946, que é incorporado por referência neste. As células B de memória (CD24+/CD27+) foram separadas a partir de células B
15 simples (CD24+/CD27-) e células T de memória (CD24-/CD27+) e na próxima etapa, células B de memória IgM (IgM+) foram separadas da mudança das células B de memória (IgM-) usando a expressão IgM. O RNA foi isolado das células B de memória IgM e cDNA preparado.

Um método de amplificação de PCR de dois ciclos foi
20 aplicado usando o iniciador apresentado, mostrado nas Tabelas 1 e 2 para isolar a imunoglobulina VH e regiões VL a partir do repertório doador respectivo.

A amplificação do primeiro ciclo no cDNA respectivo usando o iniciador apresentado mencionado na Tabela 1 produziu 7, 6 e 9 produtos de
25 cerca de 650 pares de base para respectivamente regiões VH, Vcapa e Vlambda. Para a amplificação da região VH de célula B de memória IgM do iniciador constante OCM foi usado em combinação com OH1 a OH7. o programa de ciclo térmico para as amplificações de primeiro ciclo foi: 2 minutos 96°C (etapa de desnaturação), 30 ciclos de 30 segundos 96°C/ 30

segundos 55°C/ 60 segundos 72°C, 10 minutos 72°C alongamento final e refrigeração a 4°C. Os produtos foram carregados e isolados de um gel de agarose 1 % usando as colunas de extração em gel (Qiagen) e eluído em 50 µl de 1 mM de Tris-HCl pH 8,0. Dez por cento dos produtos de primeiro ciclo (5
5 µl) foi submetido a amplificação de segundo ciclo usando os iniciadores mencionados na Tabela 2. Estes inibidores foram estendidos com locais de restrição capazes da clonagem direcional das regiões VL e VH respectivas no vetor de apresentação de fago PDV-C06. O programa PCR para as amplificações de segundo ciclo foi como seguem: 2 minutos 96°C (etapa de
10 desnaturação), 30 ciclos de 30 segundos 96°C/ 30 segundos 60°C/ 60 segundos 72°C, 10 minutos 72°C alongamento final e refrigeração 4°C. Os produtos de segundo ciclo (~350 pares de base) foram primeiro unidos de acordo com a ocorrência natural de segmentos J observados nos produtos do gene de imunoglobulina, resultando em 7, 6 e 9 grupos para respectivamente
15 as regiões variáveis VH, Vcapa e Vlambda (ver Tabelas 3 e 4). Para obter uma distribuição normalizada das sequências de imunoglobulina na biblioteca imune os grupos de cadeias leves 6 Vcapa e 9 Vlambda foram misturados de acordo com as porcentagem mencionadas na Tabela 3. Este grupo VL final simples (3 µg) foi digerido durante a noite com enzimas de restrição Sall e
20 NotI, carregado e isolado de um gel de agarose a 1,5 % (~350 pares de base) usando colunas de extração em gel Qiagen e ligado em vetor Sall-NotI cut PDV-C06 (~5000 pares de base) como seguem: 10 µl de vetor PDV-C06 (50 ng/µl), 7 µl de inserção VL (10 ng/µl), 5 µl de tampão de ligação 10X (NEB), 2,5 de T4 DNA Ligase (400 U/µl) (NEB), 25,5 µl de água ultrapura (vetor
25 para inserir a razão foi 1:2). A ligação foi realizada durante a noite em um banho de água de 16°C. Próximo, o volume foi duplicado com água, extraído com um volume igual de fenol-clorofórmio-isoamilálcool (75:24:1) (Invitrogen) seguido pela extração de clorofórmio (Merck) e precipitado com 1 µl de Pellet Paint (Novogen), 10 µl de acetato de sódio (3 M de pH 5,0) e 100

μl de isopropanol por 2 horas a -20°C. A amostra obtida foi subsequentemente centrifugada a 20,000 xg por 30 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi lavado com 70 % de etanol e centrifugado por 10 minutos a 20,000 xg em temperatura ambiente. O etanol foi removido pela aspiração a vácuo e o grânulo foi secado em ar por diversos minutos e então dissolvido em 50 μl de tampão contendo 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0. 1 μl de mistura de ligação foi usada pela transformação de 40 μl de TG-1 células eletro-competentes (Stratagene) em um cadinho de eletroporação de 0,1 cm resfriado (Biorad) usando um aparelho Genepulser II (Biorad) apresentado a 1,7 kV, 200 Ohm, 25 μF (tempo constante ~4,5 msec). Diretamente após o pulso, as bactérias foram retiradas a partir do cadinho com 1000 μl do meio SOC (Invitrogen) contendo 5 % de glicose (p/v) (Sigma) a 37°C e transferido a um tubo de cultura de fundo redondo de 15 ml. Outro 500 μl de glicose/SOC foi usado para retirar a bactéria residual a partir do cadinho e foi adicionado ao tubo de cultura. As bactérias foram recuperadas pela cultura exatamente por uma hora a 37°C em uma incubadora agitadora a 220 rpm. As bactérias transformadas foram colocadas em amplos discos de petri quadrados de 240 mm (NUNC) contendo 200 ml de ágar 2TY (16 g/l bacto-triptona, 10 g/l de extrato de bacto-levedura, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de ágar, pH 7,0) suplementado com 50 μg/ml de ampicilina e 5 % de glicose (p/v) (Sigma). A diluição 1 a 1000 foi colocada para a contagem de propósitos em 15 cm discos de petri contendo o mesmo meio. Este procedimento de transformação foi repetido sequencialmente vinte vezes e a biblioteca completa foi colocada em um total de trinta discos de petri quadrados amplos e desenvolvidos durante a noite em um forno de cultura de 37°C. Tipicamente, cerca de 1×10^7 cfu foram obtidos usando o protocolo acima. A biblioteca de cadeia leve VL de intermediário foi coletado a partir das placas pela raspagem branda na bactéria no meio 10 ml 2TY por placa. A massa celular foi determinada pela medição OD600 e duas vezes 500 OD da bactéria foi usada para a preparação

de DNA de plasmídeo maxi usando duas colunas P500 maxiprep (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

Análogos as regiões variáveis VL, os produtos VH-JH de segundo ciclo foram primeiro misturados juntos para obter a distribuição de uso de segmento J normal (ver Tabela 4), resultando em 7 subgrupos VH denominados PH1 a PH7. Os grupos foram misturados para adquirir uma distribuição da sequência normalizada usando as porcentagens descritas na Tabela 4, obtendo uma fração VH que foi digerida com enzimas de restrição SfiI e XhoI e ligadas na biblioteca intermediária SfiI-XhoI cut PDV-VL obtida como descrito acima. A apresentação da ligação, método de purificação, transformação subsequente de TG1 e coleta de bactéria foi exatamente como descrito pela biblioteca intermediária VL (ver acima). A biblioteca final (aproximadamente 5×10^6 cfu) foi checada pela frequência de inserção com uma colônia PCR usando uma série iniciadora flanqueando as regiões VH-VL inseridas. Mais do que 95 % das colônias mostrou uma inserção de comprimento correto (ver Tabela 5). Os produtos PCR de colônia foram usados para a análise de sequência de DNA subsequente para checar a variação da sequência e para avaliar a porcentagem das colônias que mostram um ORF completo. Este foi tipicamente acima 70 % (ver Tabela 5). A frequência das mutações nos genes V também foi analisada. Fora das 50 sequências, 47 (94 %) não foram configuração da linha de germinativa indicativa de um processo de maturação e consiste com o fenótipo de memória das células B usadas como uma fonte RNA para a biblioteca. Finalmente, a biblioteca foi resgatada e amplificada pelo uso de fagos auxiliares CT (ver WO 02/103012) e foi usado pela seleção de anticorpo de fago pelos métodos de *panning* como descrito abaixo.

Exemplo 2

Seleção de fagos que realizam os fragmentos Fv de cadeia simples contra subtipos de H3 e H7 de Influenza A e Influenza B.

Os fragmentos de anticorpo foram selecionados usando bibliotecas de anticorpo de apresentação de fago construído essencialmente como descrito acima e tecnologia de apresentação de fago geral e tecnologia MABSTRACT[®] essencialmente como descrito no Número de Patente U.S. 6.265.150 e no WO 98/15833 (ambos os quais são incorporados por referência neste). Além disso, os métodos e fagos auxiliares como descritos no WO 02/103012 (que é incorporado por referência neste) foram usados na presente invenção.

A seleção foi realizada contra hemaglutinina recombinante (HA) de subtipo H3 e H7 de influenza A (A/Wisconsin/67/2005) (A/Netherlands/219/2003) ou influenza B (B/Ohio/01/2005). Os antígenos HA foram diluídos em PBS (5,0 µg/ml), adicionado aos tubos MaxiSorp[™] Nunc-Immuno (Nunc) e incubados durante a noite a 4°C em uma roda de rotação. Os imunotubos foram esvaziados e lavados três vezes no tampão de bloco (2 % de leite em pó desnatado (ELK) em PBS). Subsequentemente, os imunotubos foram enchidos completamente com o tampão de bloco e incubados por 1 a 2 horas em temperatura ambiente. As alíquotas de biblioteca de apresentação de fago (500-1000 µl, $0,5 \times 10^{13}$ – 1×10^{13} cfu, amplificado usando o fago auxiliar CT (ver WO 02/103012)) foram bloqueados no tampão de bloqueamento suplementado com 10 % de soro bovino fetal não inativado por calor e 2 % de soro de camundongo por 1-2 horas em temperatura ambiente. A biblioteca de fago bloqueada foi adicionada aos imunotubos, incubado por 2 horas em temperatura ambiente e lavado com tampão de lavagem (0,05 % (v/v) Tween-20 em PBS) para remover os fagos não ligados. Os fagos ligados foram eluídos a partir do antígeno respectivo pela incubação com 1 ml de 100 mM de trietilamina (TEA) por 10 minutos em temperatura ambiente. Subsequentemente, os fagos eluídos foram misturados com 0,5 ml de 1 M de Tris-HCl pH 7,5 para neutralizar o pH. Esta mistura foi usada pra infectar 5 ml de uma cultura XL1-

Blue *E.coli* que foi desenvolvido a 37°C a um OD 600 nm de aproximadamente 0,3. Os fagos foram deixados infectar a bactéria XL1-Blue por 30 minutos a 37°C. Então, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 3000 xg em temperatura ambiente e o grânulo bacteriano foi recolocado em suspensão em 0,5 ml de meio de extrato de levedura 2-trypton (2TY). A suspensão bacteriana obtida foi dividida em duas placas de ágar 2TY suplementado com tetraciclina, ampicilina e glicose. Após a incubação durante a noite das placas a 37° C, as colônias foram *sucateado* a partir das placas e usadas para preparar uma biblioteca de fago enriquecida, essencialmente como descrito por De Kruif *et al.* (1995a) e WO 02/103012. Brevemente, as bactérias raspadas foram usadas para inocular o meio 2TY contendo ampicilina, tetraciclina e glicose e desenvolvimento em uma temperatura de 37° C a um OD 600 nm de ~0,3. Os fagos auxiliares CT foram adicionados e deixados infectar pela bactéria após no qual o meio foi mudado ao 2TY contendo ampicilina, tetraciclina e canamicina. A incubação foi continuada durante a noite a 30° C. O próximo dia, as bactérias foram removidas a partir do meio 2TY pela centrifugação após no qual os fagos no meio foram precipitados usando o polietileno glicol (PEG) 6000/NaCl. Finalmente, os fagos foram dissolvidos em 2 ml de PBS com 1 % de albumina de soro bovino (BSA), esterilizado por filtro e usado para o próximo ciclo de seleção. O segundo ciclo de seleção é realizado no mesmo subtipo HA ou em HA do subtipo diferente.

Os dois ciclos consecutivos de seleções foram realizados antes do isolamento dos anticorpos de fago de cadeia simples individual. Após o segundo ciclo de seleção, as colônias *E.coli* individuais foram usadas para preparar os anticorpos de fagos monoclonais. Essencialmente, as colônias individuais foram desenvolvidas na fase log no formato de placa de 96 reservatório e infectado com os fagos auxiliares VCS-M13 após o qual a produção de anticorpo de fago foi deixada proceder durante a noite. Os

sobrenadantes contendo os anticorpos de fago foram usados diretamente em ELISA para a ligação aos antígenos HA. Alternativamente, os anticorpos de fago foram precipitados por PEG/NaCl e esterilizados por filtro tanto para a análise elisa quanto citometria de fluxo.

5 Exemplo 3

Validação dos anticorpos de fago de cadeia simples específica por HA

Os sobrenadantes selecionados contendo anticorpos de fago de cadeia simples que foram obtidos nas avaliações descritas acima foram
10 avalidadas em ELISA para a especificidade, isto é a ligação aos antígenos HA diferentes. Para este propósito, o baculovírus expressado recombinante H3 (A/Wisconsin/67/2005), H7 (A/Netherlands/219/2003) e B (B/Ohio/01/2005) HA's (Protein Sciences, CT, USA) foram revestidos as placas MaxisorpTM ELISA. Após revestimento, as placas foram lavadas três vezes com PBS
15 contendo 0,1 % de v/v Tween-20 e bloqueada em PBS contendo 3 % de BSA ou 2 % de ELK por 1 hora em temperatura ambiente. Os anticorpos de fago de cadeia simples selecionado foram incubados por 1 hora em um volume igual de PBS contendo 4 % de ELK para obter os anticorpos de fagos bloqueados. As placas foram esvaziadas, lavadas três vezes com PBS/0,1 %
20 de Tween-20 e os anticorpos de fago de cadeia simples bloqueados foram adicionados aos reservatórios. A incubação foi deixada proceder por uma hora, as placas foram lavadas com PBS/0,1 % de Tween-20 e anticorpos de fagos ligados foram detectados (usando a medição OD 492 nm) usando um anticorpo anti-M13 conjugado a peroxidase. Como um controle, o
25 procedimento foi realizado simultaneamente sem o anticorpo de fago de cadeia simples e com um anticorpo de fago de cadeia simples de controle negativo não relacionado. A partir das seleções nos antígenos HA diferentes com as bibliotecas de célula B de memória IgM, 6 anticorpos de fago de cadeia simples únicos específicos tanto para o H3 HA recombinante quanto

H7 HA foram obtidos (SC08-001, SC08-003, SC08-006, SC08-014, SC08-017 e SC08-018). Além disso, 2 anticorpos de fago de cadeia simples únicos específicos para o H3 HA recombinante (SC08-015 e SC08-016) e 5 para o H7 HA recombinante (SC08-007, SC08-009, SC08-010, SC08-011 e SC08-013) foram isolados. Ver tabela 6.

Alternativamente, o precipitado PEG/NaCl- e anticorpos de fago esterilizados por filtro foram usados para validar a ligação elisa e especificidade. Para este propósito, a influenza A H1 recombinante de bacilovírus expressado (A/New Caledonia/20/1999), H3 (A/Wisconsin/67/2005), H5 (A/Vietnam/1203/2004), H7 (A/Netherlands/219/2003) e influenza B (B/Ohio/01/2005, B/Malaysia/2506/2004, B/Jilin/219/2003) HA's (Protein Sciences, CT, USA) foram revestidas as placas Maxisorp™ ELISA. Após revestimento, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,1 % v/v Tween-20 e bloqueado em PBS contendo 3 % de BSA ou 2 % de ELK por 1 hora em temperatura ambiente. Os anticorpos de fago de cadeia simples selecionados foram incubados por 1 hora em um volume igual de PBS contendo 4 % de ELK para obter anticorpos de fago bloqueados. As placas foram esvaziadas, lavadas três vezes com PBS/0,1 % de Tween-20 e os anticorpos de fago de cadeia simples bloqueada foram adicionados aos reservatórios. A incubação foi deixada proceder por uma hora, as placas foram lavadas com PBS/0,1 % de Tween-20 e anticorpos de fago ligados foram detectados (usando mediação OD 492 nm) usando um anticorpo anti-M13 conjugado a peroxidase. Como um controle, o procedimento foi realizado simultaneamente sem anticorpo de fago de cadeia simples e com um anticorpo de fago de cadeia simples de controle negativo. A partir das seleções nos antígenos HA diferentes com as bibliotecas de célula B de memória IgM, 2 anticorpos de fago de cadeia simples únicos específicos pelo H1, H3 e H7 HA recombinantes foram obtidos (SC08-001 e SC08-014). Além disso, 6 anticorpos de fago de cadeia simples únicos específicos para o

H3 HA recombinante (SC08-003, SC08-006, SC08-015, SC08-016, SC08-017 e SC08-018) e 5 para H7 HA recombinante (SC08-007, SC08-009, SC08-010, SC08-011 e SC08-013) foram isolados. Ver tabela 7.

Alternativamente, anticorpos de fago esterilizados por filtro e precipitado por PEG/NaCl foram usados para validar a ligação e especificidade pela análise FACS. Para este propósito, subtipos H1 de influenza A recombinante de comprimento total (A/New Caledonia/20/1999), H3 (A/Wisconsin/67/2005), H5(TV), H7 (A/Netherlands/219/2003) e influenza B (B/Ohio/01/2005) HA's foram expressados na superfície das células PER.C6. As células foram incubadas com anticorpos de fago cadeia simples por 1 hora seguido por três etapas de lavagem com PBS+0,1 % de BSA. Os fagos ligados foram detectados usando anticorpo M13 conjugado por FITC. A partir das seleções nos antígenos HA diferentes com as bibliotecas de célula B de memória IgM, um anticorpo de fago de cadeia simples específico para os subtipos H1, H3 e H7 HA de influenza A foi isolado (SC08-001). Além disso, 6 anticorpos de fago de cadeia simples únicos específicos para o H3 HA (SC08-003, SC08-006, SC08-015, SC08-016, SC08-017 e SC08-018), 4 anticorpos de fago de cadeia simples únicos específicos para o H7 HA (SC08-007, SC08-010, SC08-011 e SC08-013) foram isolados. Ver tabela 8. Destes, seis anticorpos de fago (SC08-001, SC08-003, SC08-015, SC08-016, SC08-017, SC08-018) foram usados para a construção de imunoglobulinas humanas totais para a caracterização adicional (ver Exemplo 5).

Exemplo 4

Seleção e validação de clones de células B imortalizados específicos pela influenza A (H3N2) HA

Além disso, a apresentação de fago, as moléculas de ligação da presente invenção também podem ser isoladas por outros métodos, por exemplo, usando células B imortalizadas, como descrito no, por exemplo, WO 2007067046. As células de memória IgM imortalizadas (CD19+/CD27+,

IgD+), derivadas de doadores vacinados, foram tingidos com APC rotulado por H3 HA e célula simples sortida na cultura de diluição limitante. Após a recuperação e expansão celular os sobrenadantes das células sortidas H3 HA foram medidas pela fase sólida ELISA pela imunoreatividade H1, H3 e H7.

5 Subsequentemente, as células B específicas alvos foram caracterizadas pela atividade de ligação e neutralização. As células B foram clonadas pela diluição limitante para produzir clones simples. Os clones foram semeados nas placas de cultura e as células cultivadas por 14 dias. Os sobrenadantes dos clones foram avaliados pela produção de anticorpos
10 monoclonais anti-HA que ligam-se as 293 células transfectadas por HA que expressam H1, H3, H5 e H7 derivado de HA. Como um controle para um tingimento específico ou básico, as 293 células não transferidas foram usadas.

A fim de determinar se os sobrenadantes de clone celular de célula B selecionado contendo os anticorpos IgM ou IgG que foram obtidos
15 nas avaliações descritas acima foram capazes de bloquear a infecção da influenza A (H3N2), um ensaio de neutralização do vírus *in vitro* (VNA) foi realizado. O VNA foi realizado nas células MDCK (ATCC CCL-34). As células MDCK foram cultivadas no meio celular de cultura MDCK (meio MEM suplementado com antibióticos, 20 mM de HEPES e 0,15 % de bicarbonato de sódio (p/v) (meio MEM completo), suplementado com 10 %
20 de soro bovino fetal (v/v)). A cepa H3N2 (A/Wisconsin/67/2005), que foi usada no ensaio foi diluído a um titulador de $5,7 \times 10^3$ de TCID₅₀/ml (50 % de dosagem infectiva de cultura de tecido por ml), com o titulador calculado de acordo com um método de Spearman e Karber. As preparações IgG ou
25 IgM foram seriamente 2 vezes diluídas (1:2 - 1:64) no meio MEM completo nos recipientes quadruplicados. 25 µl da diluição IgG respectiva foi misturada com 25 µl da suspensão do vírus (100 TCID₅₀/25 µl) e incubado por uma hora a 37°C. A suspensão foi então transferida na quadruplicação nas placas de 96 reservatórios contendo culturas MDCK confluentes em 50 µl de meio

MEM completo. Antes do uso, as células MDCK foram semeadas nas células 3×10^4 por reservatório no meio da cultura celular MDCK, desenvolvimento até as células serem atingidas por confluência, lavadas com 300-350 μ l de PBS, pH 7,4 e finalmente 50 μ l do meio MEM completo foi adicionado a cada reservatório. As células inoculadas foram cultivadas por 3-4 dias a 37°C e diariamente observada para o desenvolvimento do efeito citopatogênico (CPE). O CPE foi comparado ao controle positivo.

Dos sobrenadantes 187 IgG testados, 43 foram observados para neutralizar a cepa H3N2 (A/Wisconsin/67/2005) usada neste ensaio. Destes, 14 foram usados para as imunoglobulinas de construção de humana IgG como descrito no exemplo 5.

Exemplo 5

Construção de moléculas de imunoglobulina totalmente humana (anticorpos monoclonais humanos) a partir dos Fvs selecionados da cadeia simples e clones de célula B

A partir do DNA de plasmídeo dos clones de anticorpos de fago (scFv) de cadeia simples específica selecionada foi obtido e nucleotídeo e as sequências de aminoácidos foram determinadas de acordo com as técnicas padrão. As regiões variáveis de cadeia leve e pesada dos scFvs foram clonadas diretamente pela digestão de restrição para a expressão nos vetores de expressão IgG pIg-C911-HCgama1 (ver SEQ ID N°: 189), pIG-C909-Ccapa (ver SEQ ID N°: 190), ou pIg-C910-Clambda (ver SEQ ID N°: 191). As regiões variáveis de cadeia leve e pesada dos clones de célula B foram amplificados por PCR e clonados diretamente pela digestão de restrição para a expressão nos vetores de expressão IgG pIg-C911-HCgama1 (ver SEQ ID N°: 190), pIG-C909-Ccapa (ver SEQ ID N°: 191), ou pIg-C910-Clambda (ver SEQ ID N°: 192). A identidade do gene VH e VL (ver Tomlinson IM et al. V-BASE Sequence Directory. Cambridge United Kingdom: MRC Centre for Protein Engineering (1997)) dos scFvs foram determinadas (ver Tabela 9).

As sequências de nucleotídeos para todas as construções foram verificadas de acordo com as técnicas padrão conhecidas ao técnico habilitado. As construções de expressão resultante que codifica a cadeia leve e pesada IgG1 humana foram transientemente expressadas em combinação nas células 293T e sobrenadantes contendo anticorpos IgG1 humanos foram obtidos e produzidos usando procedimentos de purificação padrão. Os anticorpos IgG1 humanos foram titulados em uma faixa de concentração de entre 10 e 0,003 µg/ml contra antígeno H3, H7 ou B (dados não mostrados). Um anticorpo não relacionado foi incluído como um anticorpo de controle.

A sequência de aminoácido dos CDRs da cadeia leve e pesada das moléculas de imunoglobulina selecionadas é dada na Tabela 9. A sequência de nucleotídeo e sequência de aminoácido das regiões variáveis de cadeia leve e pesada são dadas abaixo. As imunoglobulinas compreendem a região constante de cadeia leve e pesada de CR6261, como dado abaixo.

Exemplo 6

A neutralização *in vitro* de vírus influenza pelos IgGs de ligação H3N2 (ensaio de neutralização do vírus)

A fim de determinar se os IgGs selecionados foram capazes de bloquear a infecção da influenza A (H3N2), um ensaio de neutralização *in vitro* do vírus (VNA) foi realizado. O VNA foi realizado nas células MDCK (ATCC CCL-34). As células MDCK foram cultivadas no meio de cultura celular MDCK (meio MEM suplementado com antibióticos, 20 mM de HEPES e 0,15 % de bicarbonato de sódio (p/v) (meio MEM completo), suplementado com 10 % de soro bovino fetal (v/v)). A cepa H3N2 (A/Wisconsin/67/2005) que foi usada no ensaio foi diluído a um titulador de $5,7 \times 10^3$ de TCID₅₀/ml (50 % de dosagem infectiva de cultura de tecido por ml), com o titulador calculado de acordo com a método de Spearman e Karber. As preparações IgG (200 µg/ml) foram seriamente 2 vezes diluídas (1:2 - 1:512) em meio MEM completo nos recipientes duplicados. 25 µl da diluição IgG respectiva

foi misturada com 25 µl da suspensão do vírus (100 TCID₅₀/25 µl) e incubada por uma hora a 37°C. A suspensão foi então transferida na quadruplicação nas placas de 96 reservatórios contendo culturas MDCK confluentes em 50 µl de meio MEM completo. Antes do uso, as células MDCK foram semeadas nas células 3×10^4 por reservatório em meio de cultura celular MDCK, desenvolvido até as células foram atingidas a confluência, lavadas com 300-350 µl de PBS, pH 7,4 e finalmente 50 µl de meio MEM completo foi adicionado a cada reservatório. As células inoculadas foram cultivadas por 3-4 dias a 37°C e diariamente observada para o desenvolvimento do efeito citopatogênico (CPE). CPE foi comparado ao controle positivo.

Os anticorpos anti-H3 HA e/ou anti-H7 HA humanos do Exemplo 5 foram submetidos ao VNA descrito acima. Destes anticorpos, todos os anticorpos, exceto CR8040, CR8052 e CR8069, neutralizados a cepa A/Wisconsin/67/2005 H3N2. As concentrações (em µg/ml) no qual estes anticorpos protegem as culturas MDCK contra CPE são dados na Tabela 11.

Exemplo 7

Reatividade de ligação cruzada de anti-H3N2 IgGs

Os anticorpos IgG que neutralizam H3N2 descritos acima foram validados em ELISA pela especificidade de ligação, isto é ligação aos antígenos HA diferentes. Para este propósito, o bacilovírus expressado H1 recombinante (A/New Caledonia/20/1999), H3 (A/Wisconsin/67/2005, A/New York/55/2004, A/Wyoming/3/2003) e H7 (A/Netherlands/219/2003) HA's (Protein Sciences, CT, USA) foram revestidas as placas MaxisorpTM ELISA. Após revestimento, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,1 % de v/v Tween-20 e bloqueado em PBS contendo 3 % de BSA ou 2 % de ELK por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram esvaziadas, lavadas três vezes com PBS/0,1 % de Tween-20 e os anticorpos IgG foram adicionados aos reservatórios. A incubação foi deixada proceder

por uma hora, as placas foram lavadas com PBS/0,1 % de Tween-20 e anticorpos ligados foram detectados (usando a medição OD 492 nm) usando um anticorpo anti-humano IgG conjugado a peroxidase. Como um controle, um IgG não relacionado CR4098 foi usado.

5 A partir dos anticorpos de neutralização H3N2 selecionados, CR8001 mostra a ligação cruzada de heterosubtípico em todos os HA's recombinantes testados, CR8020, CR8021, CR8041, CR8043 e CR8057 mostram a ligação cruzada heterosubtípica em todos os 3 H3 HA's testados bem como o H7 HA. CR8003, CR8015, CR8016, CR8017, CR8018, CR8038,
10 CR8039, CR8040, CR8049, CR8050, CR8052 e CR8069 mostram a ligação cruzada em todos os 3 H3 HA's testados. Um anticorpo, CR8019, mostra a ligação apenas 2 de H3 HA's. Ver tabela 12.

Adicionalmente, os anticorpos de neutralização H3N2 selecionados foram usados para testar ligação heterosubtípica pela análise
15 FACS. Para este propósito, os subtipos H1 de influenza A recombinante de comprimento total (A/New Caledonia/20/1999), H3 (A/Wisconsin/67/2005) e H7 (A/Netherlands/219/2003) HA's foram expressados na superfície das células PER.C6. As células foram incubadas com anticorpos IgG por 1 hora seguido por três etapas de lavagem com PBS+0,1 % de BSA. Os anticorpos
20 ligados foram detectados usando anticorpo anti-humano conjugado por PE. Como um controle, as células PER.C6 não transfectadas foram usados.

A partir dos anticorpos de neutralização H3N2, CR8001 mostra a atividade cruzada de ligação aos subtipos H1, H3 e H7 HA de influenza A mas não células PER.C6 de tipo selvagem. Além disso, CR8020 e
25 CR8041 mostram a forte ligação tanto de H3 quanto H7 HA. CR8043 e CR8057 mostram a forte ligação ao H3 HA e fraca ligação ao H7 HA. CR8055 mostrou níveis inferiores de tingimento básico nas células PER.C6. Os 13 anticorpos remanescentes mostram a ligação as células H3 transfectadas apenas. Ver tabela 12.

Exemplo 8

Atividade de neutralização cruzada de anti-H3N2 IgGs

A fim de determinar se os IgGs selecionados foram capazes de bloquear as cepas de influenza A múltiplas, ensaios de neutralização do vírus *in vitro* adicionais (VNA) foram realizadas. O VNA foi realizado nas células MDCK (ATCC CCL-34). As células MDCK foram cultivadas no meio de cultura celular MDCK (meio MEM suplementado com antibióticos, 20 mM de HEPES e 0,15 % de bicarbonato de sódio (p/v) (meio MEM completo), suplementado com 10 % de soro bovino fetal (v/v)). As cepas H1N1 (A/New Caledonia/20/1999 A/Brisbane/59/2007 e A/Solomon Islands/IVR-145), H3N2 (A/Hong Kong/1/68, A/Johannesburg/33/94, A/Panama/2000/1999, A/Hiroshima/52/2005 and A/Wisconsin/67/2005), H7N3 (A/Mallard/Netherlands/12/2000) e H10 (A/Chick/Germany/N/49) que foram usadas no ensaio foram todas diluídas em um titulador de $5,7 \times 10^3$ de TCID₅₀/ml (50 % de dosagem infectiva de cultura de tecido por ml), com o titulador calculado de acordo com a método de Spearman e Karber. As preparações IgG (80 µg/ml) foram seriamente 2 vezes diluídas (1:2 - 1:512) em meio MEM completo nos recipientes duplicados. 25 µl da diluição IgG respectiva foi misturada com 25 µl da suspensão do vírus (100 TCID₅₀/25 µl) e incubada por uma hora a 37°C. A suspensão foi então transferida na quadruplicação nas placas de 96 reservatórios contendo culturas MDCK confluentes em 50 µl de meio MEM completo. Antes do uso, as células MDCK foram semeadas nas células 3×10^4 por reservatório em meio de cultura celular MDCK, desenvolvidas até as células atingiram confluência, lavadas com 300-350 µl de PBS, pH 7,4 e finalmente 50 µl de meio MEM completo foi adicionado a cada reservatório. As células inoculadas foram cultivadas por 3-4 dias a 37°C e diariamente observada para o desenvolvimento do efeito citopatogênico (CPE). CPE foi comparado ao controle positivo.

A partir do painel de anticorpos de neutralização H3N2, CR8020 e CR8041 mostram atividade de neutralização cruzada heterotípica para todos os vírus de subtipos H3, H7 e H10 de influenza A testados mas não vírus H1. Além disso, CR8043 mostram a neutralização cruzada em todas as cepas de vírus H3 e H10 testadas. CR8039, CR8041, CR8043 e CR8057 mostram a neutralização cruzada de todas as cepas de vírus H3 testados. Os 13 anticorpos adicionais mostram a neutralização cruzada a mais do que 1 das cepas de vírus H3 testadas. Ver tabela 13.

Exemplo 9

Anticorpos anti-H3N2 ligam-se a conformação de pré-fusão de HA

A fim de determinar se os IgGs selecionados foram capazes da ligação da conformação pré ou pós fusão da molécula HA, um experimento da mudança de pH *in vitro* foi realizado.

Para este propósito, o subtipo H3 de influenza A recombinante de comprimento total (A/Wisconsin/67/2005) HA foi expressado na superfície das células PER.C6. Para ensaiar para a reatividade específica nas conformações HA estruturais diferentes, 3×10^5 células foram tratadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de trypsin-EDTA em DMEM por 30 minutos em temperatura ambiente, lavadas e incubadas por 5 minutos no PBS acidificado (pH 4,9), lavadas e então incubadas por 20 minutos na presença de 20 mM de DTT em temperatura ambiente. As células foram unidas em cada etapa e células aderentes não tratadas foram recolocadas em suspensão em 0,05 % de EDTA. As frações celulares de cada tratamento foram incubadas com anti-H3N2 IgGs CR8001, CR8020, CR8041, CR8043 e CR8057 por 30 minutos. As células foram então incubadas por 30 minutos com anti-IgG conjugado por ficoeritrina (Southern Biotech). As células tingidas foram analisadas usando um FACS Calibur com software CELLQuest Pro (Becton Dickinson). A ligação FACS de IgG1 a superfície H3 rHA expressada foi medida após o

tratamento sequencial com tripsina (barras listradas), pH 4,9 de meio tamponado (barras brancas sólidas) e DTT (barras cruzadas) e expressadas como ligação de porcentagem ao rHA não tratado (barras pretas sólidas). Ver Figura 2.

5 Os anticorpos CR8001, CR8020, CR8041 e CR8043 todos mostram uma diminuição marcada na ligação após a especificidade indicando a mudança de pH por um epítipo presente apenas antes do pH inferior induzido pela mudança conformacional da molécula HA. O anticorpo CR8057 mostrou uma diminuição na ligação apenas após o tratamento DTT
10 indicando a especificidade para um epítipo independente de conformação disponível apenas HA1 é presente.

Exemplo 10

Anticorpo anti-H3N2 CR8041 evita a clivagem de HA0

A fim de determinar se os IgGs selecionados foram capazes de
15 proteger a molécula HA a partir da clivagem de protease, um ensaio de susceptibilidade de protease *in vitro* foi realizado.

Para este propósito, 7,5 µg de subtipo H3 de influenza A solúvel recombinante (A/Wisconsin/67/2005) HA (Protein Sciences, CT, USA) foi submetido ao pH diferente (4,9, 5,3 e 8,0) tratamentos por 1 hora a 37°C.
20 Após incubação, as reações foram neutralizadas. As amostras foram digeridas durante a noite com 0,5 µg de tripsina na presença e ausência de 7,5 µg de fragmentos Fab CR8041 ou CR8057. As reações foram extinguidas pela adição de tampão de carregamento SDS. 3µl de agente de redução Nupage (Invitrogen) foi adicionado a cada amostra. As amostras foram realizadas em
25 um gel 4-12 % de BisTris em tampão 1 x MOPS. Os grupos de proteínas foram visualizados pelo tingimento azul coloidal (ver Figura 3). Na ausência de fragmentos Fab, a molécula H3 HA é prontamente convertida a sua forma de pós-fusão susceptível de protease no pH 4,9 ou 5,3, mas não em pH 8,0. Na presença de fragmento Fab CR8057 a degradação de H3 HA e deste modo

a mudança conformacional no pH 4,9 não é inibidor. Em constraste, a presença de Fab CR8041 não apenas evita a mudança conformacional H3 HA e degradação em pH baixo, mas também a clivagem independente de pH de HA0 em HA1 e HA2. estes pontos de resultados em direção a um epítopo para CR8041 em, ou próximo do local de clivagem. Os experimentos de competição (resultados não mostrados) com o painel de anticorpo anti-H3N2 indicam um epítopo de sobreposição e um mecanismo de trabalho similar para os anticorpos CR8001, CR8020 e CR8043.

Exemplo 11

10 Mecanismo de ação das moléculas de ligação da invenção

A glicoproteína HA é um trímero em que cada monômero consiste de dois bissulfetos – glicopolipeptídeos ligados (nomeados HA1 e HA2) que são produzidos durante a infecção pela clivagem proteolítica de um precursor (HA0). A clivagem é necessária pela infectividade de vírus visto que é requerido para iniciar o HA para a fusão de membrana, para permitir a mudança conformacional.

A ativação da molécula iniciada ocorre em pH inferior nos endossomos, entre pH5 e pH6 e requer as mudanças extensivas nas estrutura HA. A estrutura 3-dimensional dos conformacionais de pré-fusão não clivada (I), pré-fusão clivada (II) e pós-fusão HA (III) são esquematicamente mostrados na Figura 4.

In vitro, as mudanças conformacionais da molécula HA podem ser imitados usando as células mamíferas expressadas de superfície HA. Primeiro, a clivagem proteolítica pode ser disparada pela adição de tripsina às células. Segundo, a mudança conformacional pré- a pós-fusão pode ser atingida pela diminuição do pH. Adicionalmente, a parte HA1 da molécula pode ser removida pela adição de um agente de redução semelhante ao DTT. Nesta maneira e pela adição dos anticorpos nos estágios específicos é possível para investigar em qual estágio o anticorpo interfere com o processo de

infecção. Até aqui, as células PER.C6® foram transfectadas com uma construção de expressão H3 HA que abriga HA de A/Wisconsin/67/2005 e submetido aos tratamentos diferentes como descrito no exemplo 10.

5 Para este experimento, as células foram primeiro incubadas com anti-H3 mAbs antes da clivagem de tripsina e subsequentemente tratado como descrito acima (ver Figura 5).

A ligação de anti-H3 mAbs foi detectado com anticorpo anti-humano conjugado por PE de acordo com os protocolos padrões. Os sinais de fluorescência foram medidos pela análise FACS. As 'células apenas' significa 10 o sinal obtido após a ligação mAb as células não tratadas e foi apresentada a 100 %. Como pode ser visto na Figura 5, os mAbs ainda são ligados ao HA seguindo aos tratamentos diferentes. Visto que foi mostrado no exemplo 10 acima que o H3 mAbs CR8020, CR8041 e CR8043 apenas liga-se ao estado de pré-fusão (isto é antes da mudança conformacional devido ao pH inferior), 15 foi concluído que a ligação do anticorpo de fato inibe a clivagem de tripsina (ver também exemplo 10), pelo menos *in vitro* e deste modo também as etapas subsequentes levando a mudança conformacional e fusão. O anticorpo CR8057 que liga-se a parte HA1 da molécula HA próximo ao local de ligação receptor é capaz da ligação ao HA após a mudança conformacional e, como 20 esperado, é perdido quando a parte HA1 é removida seguindo o rompimento das ligações de bissulfeto entre os domínios HA1 e HA2 pelo tratamento DTT.

A inibição da clivagem de tripsina foi subsequentemente confirmado em um experimento *in vitro* diferente. Primeiro, um experimento 25 de curso de tempo foi feito para determinar como H3 HA longo deve ser incubado com tripsina para atingir a própria clivagem de HA0 em HA1 e HA2. Até aqui, H3 HA solúvel recombinante (A/Wisconsin/67/2005; Protein Sciences, CT, USA) foi incubado em 4 mM de tampão de Tris.HCl em pH 8,0 contendo 6,7 µg/ml de Tripsina e 1 % de N-dodecil-β-demaltosid. A digestão

de tripsina foi interrompido em diversos pontos de tempo pela adição de 1 % de BSA. As amostras foram realizadas no gel de SDS-page (reduzido) e *blotted* de acordo com os métodos padrão. Os grupos HA0, HA1 e HA2 foram detectados usando um anticorpo policlonal anti-H3HA de coelho (Protein Sciences, CT, USA). Figura 6 mostra que 2 horas de incubação é bastante por clivagem próxima completo evidenciado pela aparência dos grupos HA1 e HA2 no gel de redução. Próximo, o H3 HA solúvel recombinante foi incubado com CR8020, CR8041, CR8043 ou CR8057 e subsequentemente submetido a clivagem de tripsina a pH 8,0. A digestão de tripsina foi novamente interrompida em diversos pontos de tempo pela adição de 1 % de BSA. As amostras foram realizadas em SDS-page (reduzido) e *blotted*. Os grupos HA0, HA1 e HA2 foram detectados usando um anticorpo policlonal anti-H3. Os resultados mostram que todos os três mAbs CR8020, CR8041 e CR8043 evitam a clivagem de tripsina *in vitro* visto que a incubação da ligação H3 HA ao anticorpo com os resultados de tripsina na proteção da forma HA0 de HA no gel (Figura 7). Em contraste, incubação de H3 HA com um mAb de controle (CR8057) nas mesmas condições resultam no desaparecimento do grupo HA0. Este experimento confirma que os dados debatidos no exemplo 10 por CR8041 e estende-se esta observação aos anticorpos CR8020 e CR8043. As moléculas de ligação da invenção deste modo evitam pelo menos a clivagem de tripsina da molécula HA0, pelo menos *in vitro*. É, entretanto, notado que este não exclui os efeitos inibidores adicionais também são mediados pelos CR8020, CR8041 e CR8043 mAbs que são mais a jusante no processo de infecção e resulta na interferência com a mudança conformacional induzido por pH e/ou processo de fusão.

Para investigar se este deve ser o caso do experimento debatido acima foi repetido mas agora o anticorpo CR8043, ou o anticorpo CR8057 como um controle, adicionado as células que expressam H3 HA apenas após a clivagem de tripsina. Seguindo a incubação das células foram

subsequentemente incubadas no tampão inferior de pH como descrito no exemplo 10 e tratado com DTT como descrito. Se o mecanismo de ação deve ser restrito a inibição da clivagem de tripsina é esperado que o mAb CR8043 perde a ligação após o tratamento de pH visto que temos estabelecidos no exemplo 10 que os anticorpos não ligam-se à conformação pós-fusão de HA. Em contraste, como pode ser visto da Figura 8, a ligação de mAb CR8043 ainda é detectado após a exposição ao pH inferior e tratamento DTT subsequente indicando que a mudança conformacional induzida por pH também é inibido por CR8043, pelo menos *in vitro*. CR8057 que foi mostrado ligar-se à região HA1 de HA comporta-se como esperado e não mais detectável quando a parte HA1 é perdida seguindo o tratamento DTT.

Para investigar se os anticorpos CR8020 e CR8041 também são capazes de bloquear a mudança conformacional induzida por pH de HA, os experimentos debatidos acima foram repetidos. Agora os anticorpos CR8020, CR8041 e CR8043, ou o anticorpo CR8057 como um controle, foram adicionados as células que expressam o subtipo A/Hong Kong/1/1968, A/Hong Kong/24/1985 ou A/Wisconsin/67/2005 H3 HA após todos os tratamentos descritos acima, antes da incubação do pH inferior ou antes da clivagem de tripsina.

Como mostrado precocemente por A/Wisconsin/67/2005 H3 HA, os anticorpos CR8020, CR8041 e CR8043 reconhecem um epítipo presente apenas antes do tratamento do pH inferior. Este epítipo é conservado nos três HAs usados neste experimento como pode ser visto na fig 9c.

Se o mecanismo de ação deve ser restrito a inibição da clivagem de tripsina é esperada que os mAbs CR8020, CR8041 e CR8043 perdem a ligação de HA já clivado após o tratamento de pH visto que temos estabelecidos no exemplo 10 que os anticorpos não ligam-se a conformação pós-fusão de HA. Em contraste, como pode ser visto da Figura 9b, a ligação mAb ainda é detectada após a exposição ao pH inferior e tratamento DTT

subsequente em todos os três H3 HAs diferentes indicando que a mudança conformacional induzida por pH também é inibida por CR8020, CR8041 e CR8043, pelo menos *in vitro*. CR8057 que foi mostrado ligar-se à região HA1 altamente variável de HA, não mostrou a ligação ao A/Hong Kong/1/1968 e A/Hong Kong/24/1985 HAs.

Exemplo 12

Mutantes de fuga gerados *in vitro* indicam que a posição do epítopo coincide com uma sequência conservada em H3 HA

Para investigar no qual a região em HA CR8020, CR8041 e CR8043 ligam-se este e foi experimentado para gerar os mutantes de fuga nas culturas *in vitro*. Os vírus A/Hong Kong/1/1968 foram passados nas culturas celulares MDCK na presença de quantidades limitantes de anticorpos monoclonais. Primeiro, foi determinado que a concentração do anticorpo resultou em uma redução de 3 log da infecção do vírus seguindo a inoculação das células MDCK com 100 de unidades TCID₅₀ misturadas com quantidades diferentes de anticorpo monoclonal e incubação por 3 dias. Esta concentração de anticorpo foi adicionado ao material usado na inoculação nas passagens em séries e após cada passagem do vírus, a placa foi titulada na ausência e presença de quantidades diferentes de anticorpo para determinar se os vírus ainda são sensíveis a neutralização mediada por anticorpo. Este procedimento foi seguido para cada um dos mAbs CR8020, CR8041 e CR8043. A partir de cada um dos vírus de fuga de cultura devem ser isolados ao ensaio de placa e, de dois isolados de cada, RNA viral foi extraído e usado para determinar a sequência HA. Os aminoácidos mutados observados foram como seguem:

CR8020: D19N e Q27L em ambas placas analisadas;

CR8041: G33E em duas placas;

CR8043: R25M em um e Q34R na outra placa.

Todos os três anticorpos monoclonais mostram as mutações de

fuga em um domínio similar na parte HA2 da região de tronco HA adjacente ao peptídeo de fusão. A comparação da sequência de aminoácidos de vírus H3N2 presente nos bancos de dados de influenza NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/select.cgi>) nesta região 5 revela uma conservação notável da sequência. A Tabela 14 descreve a variação da sequência na região HA2 entre os aminoácidos W14 e K39 com as mutações de fuga observadas iluminadas. N = número de cepas tendo uma sequência específica. Além disso, um ano de isolamento (anos) é indicado bem como as cepas testadas positivas nos experimentos de neutralização com os anticorpos H3 (Pa = A/Panama/2000/1999; Wis = A/Wisconsin/67/2005; 10 Hs = A/Hiroshima/52/2005; HK = A/HongKong/1/1968). Do vírus 1363 H3 presente nos bancos de dados que contém a sequência HA2 mencionada a maioria (81 %) tem as sequências que estão presentes nas cepas do vírus que foram mostradas serem neutralizadas. Das sequências remanescentes tem 15 mais aminoácidos que podem ser considerados mudanças conservadas. Para as outras mutações um teste de neutralização funcional será necessário para estabelecer se as mudanças afetam a funcionalidade do anticorpo. Importantemente, três mudanças de aminoácidos que vieram do experimento do vírus de fuga (R25, G33 e Q34) não ocorre nas sequências de influenza 20 naturais e as outras duas mutações aparecem apenas em combinação (D19 e Q27), uma combinação que também não está presente nas sequências naturais. Este deve significar que as mutações têm uma influência negativa na aptidão do vírus. Embora, é concluído que os anticorpos interagem com um epítipo em HA2 que é altamente conservado entre o vírus do subtipo H3 25 confirmando que a capacidade de neutralização ampla dos anticorpos monoclonais.

Exemplo 13

Preparação de anticorpos monoclonais para os experimentos in vivo

Para capacitar a caracterização e validação subsequente dos IgGs como anticorpos terapêuticos potenciais *in vivo*, estes necessitam ser fabricados e purificados em quantidades suficientes. Os IgGs foram produzidos nas células PER.C6[®] em uma bolsa 25 L Wave- e a cultura foi coletada. A partir da coleta clarificada, IgG foi purificado usando a cromatografia de afinidade de proteína A e uma etapa de troca de tampão. O conteúdo do monômero de IgG trocado pelo tampão purificado é ~99 % tanto antes quanto depois da filtração estéril de 0,2 µm. Os ensaios de neutralização do vírus *in vitro* adicionais (VNA) foram realizados com as preparações de anticorpo diferentes obtidos, como descrito acima. Os resultados são mostrados na tabela 15.

Exemplo 14

Atividade profilática de anticorpos monoclonais IgG humanos contra desafio H3N2 letal *in vivo*

Os MAbs CR8020, CR8041 e CR8043 foram testados pela eficácia profilática em um modelo de desafio de metal de camundongo com vírus influenza A/HK/1/68-MA20 (H3N2) nos camundongos 129X1/SvJ fêmeas (Jackson Labs) (MA = camundongo adaptado). O vírus A/HK/1/68-MA20 foi obtido de Prof. POR EXEMPLO Brown, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada; Brown, E. G. et al. (2001). O vírus foi passado uma vez nos ovos de galinha embrionários antes do uso nos experimentos de camundongos. Todos os camundongos foram aclimatizados e mantidos por um período de pelo menos 4 dias antes do início do experimento.

Os MAbs foram dosados a 30, 10, 3 e 1 mg/kg intravenosamente na veia da cauda (veia coccígea) no dia -1 antes do desafio, assumindo um peso médio de 18 g por camundongo e um volume de dosagem fixa de 0,2 mL. Os camundongos (n = 8 por grupo) foram então desafiados no dia 0 com 25 LD₅₀ do vírus A/HK/1/68-MA20 (H3N2) pela inoculação intranasal. A dosagem atual do vírus administrado foi estimado pela titulação

por poucas réplicas de amostra a partir do material usado na inoculação após a inoculação dos animais foi considerado. Os tituladores do vírus (TCID₅₀/mL) do material usado na inoculação foram determinadas nas células MDCK. Os resultados não mostram que a inativação do vírus não tem intencionalmente ocorrido durante a preparação ou administração do material usado na inoculação. Os sinais clínicos e pesos corporais foram determinados diariamente do dia-1 antes do desafio até o final do estudo no dia 21. Os sinais clínicos foram armazenados com um sistema de contagem (0 = nenhum sinal clínico; 1 = revestimento bruto; 2 = revestimento bruto, menos reativo, passivo durante o manuseio; 3 = revestimento bruto, enrolado, respiração elaborada, passivo durante o manuseio; 4 = revestimento bruto, enrolado, respiração elaborada, não voltam ao estômago quando deixado na sua parte posterior). Em uma fonte de 4 animais foi submetido à eutanásia. Para analisar os níveis de mAb plasma no dia 0 e determinar a presença de hemaglutinação que inibe os anticorpos (HI) no dia 21, as amostras sanguíneas foram retiradas de todos os camundongos no D0, justo antes do desafio e na pós-infecção D21.

Os mAbs foram testados nos 2 experimentos separados. Em cada experimento um grupo de anticorpo de controle negativo (CR3014) foi quando junto, dosado a 30 mg/kg. O MAb CR8020 foi testado no primeiro experimento, os mAbs CR8041 e CR8043 no segundo.

Todos os camundongos foram ativos e parecem saudáveis sem mostrar os sinais da doença durante o período de aclimatização. A Fig. 10 mostra as taxas de sobrevivência dos camundongos, seguindo a administração mAb. Uma relação de resposta dosagem clara foi observada, com todos os grupos dosados com CR8020, CR8041 ou CR8043 a 30, 10 ou 3 mg/kg mostrando 100 % de sobrevivência, considerando 1 mg/kg de CR8020 25 % dos camundongos que sobreviveram e nenhum dos camundongos que sobreviveram nos grupos 1 mg/kg CR8041 e CR8043. Os dois grupos mAb

de controle 0 % de sobrevivência. No primeiro experimento, a administração de mAb CR8020 resultou em uma diferença estatisticamente significativa no tempo de sobrevivência em todas as quatro concentrações testadas, comparadas ao grupo de controle ($p < 0,005$; Log Rank Test). No segundo experimento, administração de mAbs CR8041 e CR8043 também resultou em uma diferença estatisticamente significativa no tempo de sobrevivência em todas as quatro concentrações testadas, comparados aos grupos de controle ($p < 0,001$ para ambos mAbs; Log Rank Test).

Na Figura 11 a mudança de peso corporal médio dos camundongos durante o período de estudo do 21 dia seguindo a administração mAb é mostrado. Semelhante com as taxas de sobrevivência, existe uma conexão inversa clara entre a perda de peso e dosagem de anticorpo usado. Quando a concentração de anticorpo foi aumentada, a perda de peso diminuída: os camundongos nos grupos dosados com CR8020, CR8041 ou CR8043 a 30, 10 ou 3 mg/kg mostrou um aumento no peso corporal médio de aproximadamente 10-15 % do dia 0 -dia 21, consistente com ganho de peso relacionado a idade, considerando nos grupos 1 mg/kg e os grupos mAb de controle do peso corporal médio dos camundongos diminuídos no período de estudo.

As mudanças de peso corporal foram analisadas em mais detalhes com área sob a análise de curva (AUC). Para o propósito desta análise, o último observou o peso corporal foi realizado em direção ao dia 21 se um camundongo morre ou / foi submetido a eutanásia seguindo o estudo. Brevemente, o peso por camundongo no dia 0 foi usado como valor de linha de base e mudança de peso do dia 0 a dia 21 foi determinado relativo a linha de base. O AUC foi definido como a adição da área acima e a área abaixo da linha de base. Os valores AUC médios de grupos de dosagem mAb foram comparados com os grupos de controle respectivos usando análise da diferença com ajuste de Dunnet para as comparações múltiplas (Tabela 16).

A análise mostrou que o AUC médio de grupos 3, 10 e 30 mg/kg de CR8020, CR8041 e CR8043 diferenciados estatisticamente significativa ($P < 0,001$) daquele dos grupos de controle correspondentes (Tabela 16). Ambos para o CR8041- bem como para os grupos de dosagem
5 CR8043 1 mg/kg de uma diferença estatisticamente significativa foi observada quando comparado ao grupo de controle ($p = 0,004$ e $p < 0,001$ respectivamente). Entretanto, devido aos dois camundongos de sobrevivência no grupo de dosagem CR8020 1 mg/kg uma aumento na variação de peso corporal foi observado e portanto nenhuma diferença significativa estatística
10 deve ser demonstrado quando comparado ao grupo de controle.

A análise adicional foi realizada para investigar uma resposta de dosagem na redução da perda de peso em comparação com os valores AUC médios por concentração de anticorpo para cada anticorpo usando análise da diferença com o ajuste de Tukey para as comparações múltiplas
15 (Tabela 16). Tanto os mAbs CR8020 quanto CR8041 a perda de peso corporal no grupo 1 mg/kg é estatisticamente significativa maior ($p < 0,001$) do que nos grupos respectivos 3 mg/kg, em que não existe nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos 3, 10 e 30 mg/kg ($p > 0,05$). Para ambos mAb CR8043 a perda de peso no grupo 1 mg/kg foi estatisticamente
20 significativa maior do que no grupo 3 mg/kg ($p < 0,001$) e aquele do grupo 3 mg/kg foi significativamente maior do que aquele do grupo 10 mg/kg ($p < 0,001$). O AUC médio dos grupos 10 e 30 mg/kg de CR8043 não significativamente diferem ($p = 0,997$).

As contagens clínicas médias dos camundongos são descritos
25 na Fig. 12. Os camundongos dosados com CR8020, CR8041 ou CR8043 a 30 e 10 mg/kg não mostra qualquer sinal clínico, como indicado por uma contagem clínica média de 0 em toda parte do período de estudo de 21 dia de 2 estudos. O MAb 8020 também não mostrou contagem clínica no grupo de dosagem 3 mg/kg, considerando nos grupos de dosagem 3 mg/kg de mAb

8041 e 8043 aumenta na contagem clínica foram observadas a uma contagem média de 1 e 3 respectivamente. Nos grupos de dosagem 1 mg/kg de todos os três mAbs, as contagens clínicas foram aumentadas atingindo uma contagem média de 4 em todos os grupos. Os camundongos observados com a contagem clínica 4 foram submetidos a eutanásia no mesmo dia. Os 2 camundongos de sobrevivência no grupo de dosagem CR8020 1 mg/kg tornou-se doente no dia 7 do estudo e mostrou uma contagem clínica máxima de 1 e 3 respectivamente. Ambos os camundongos completamente recuperados. Dos grupos de dosagem CR8041 e CR8043 3 mg/kg o perfil da perda de peso corporal mostra um modelo similar como o perfil de contagem clínico.

Estes resultados mostram que pelo menos três anticorpos anti-H3N2 humanos, identificados e desenvolvidos como divulgados neste (CR8020, CR8041 e CR8043) são cada um separadamente capazes de fornecer a proteção contra uma dosagem letal de influenza H3N2 *in vivo*. Uma conexão de resposta-dosagem clara entre a quantidade de cada anticorpo administrado e taxa de sobrevivência foi observada. Os resultados mostram que o anticorpo anti-H3N2 IgG CR8041 e 8043 foram capazes de evitar a manifestação clínica da infecção H3N2 nos camundongos quando administrado um dia antes da infecção em uma dosagem de 10 mg/kg ou mais. O MAb CR8020 foi capaz de evitar a manifestação clínica da infecção H3N2 nos camundongos quando administrado um dia antes da infecção em uma dosagem de 3 mg/kg ou mais.

Exemplo 15

Atividade protetora e terapêutica dos anticorpos monoclonais IgG humanos contra desafio H3N2 letal *in vivo*

Um estudo foi realizado para testar o efeito terapêutico dos anticorpos monoclonais como divulgado neste, exemplificado por CR8020, em um modelo pós-infecção, contra um desafio de vírus influenza H3N2 A/HK/1/68-MA20 letal *in vivo*.

Os camundongos ($n = 10$ por grupo) foram dosados com mAb CR8020 a 15 mg/kg intravenosamente na veia de cauda (veia coccígena) no dia -1 antes do desafio (grupo 1; controle de profilaxia positiva) ou no dia 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 após o desafio (grupos 2-7), assumindo um peso médio de 18 g por camundongo e um volume de dosagem fixa de 0,2 mL. O grupo 8 recebeu o mAb de controle negativo CR3014 (15 mg/kg) no dia 1 após o desafio. Os camundongos foram desafiados no dia 0 com o vírus 25 LD₅₀ (2,8 log TCID₅₀) A/HK/1/68-MA20 (H3N2) pela inoculação intranasal. A batelada de vírus e o tipo e idade dos camundongos foram os mesmos como usado no exemplo 14. Os sinais clínicos e pesos corporais foram determinados diariamente do dia-1 antes do desafio até o final do estudo no dia 21.

A Figura 13A mostra as taxas de sobrevivência dos camundongos, seguindo a administração intravenosa de mAb CR8020 (15 mg/kg em todos os grupos) ou mAb de controle (15 mg/kg). Quando 15 mg/kg mAb CR8020 foi administrado no pré-desafio do dia 1 ou dias 1 ou 2 pós-desafio, todos os animais que sobrevivem ao desafio viral, considerando a taxa de sobrevivência no grupo mAb de controle foi 0 %. Quando 15 mg/kg de mAb CR8020 foi administrado no dia 3 ou 4 após o desafio, 50 % e 10 % de sobrevivência foi observado, respectivamente. O tempo de sobrevivência de cada um destes grupos foi estatisticamente diferente comparado ao grupo de controle (grupo dia 3: $p < 0,001$ e grupo dia 4 $p = 0,002$; Log Rank Test). Os grupos testados com 15 mg/kg CR8020 no dia 5 ou 6 mostrou uma taxa de sobrevivência de 0 %. Não existe a diferença estatisticamente significativa no tempo de sobrevivência do dia 5 ou 6 grupos tratados comparados ao grupo de controle ($p = 0,648$ e $p = 0,342$, respectivamente; Log Rank Test).

Na figura 13B a mudança do peso corporal médio relativo ao dia 0 dos camundongos durante o período de estudo do 21 dia é mostrado. Semelhante com as taxas de sobrevivência, existe uma conexão clara entre a

perda de peso e tempo da administração de 15 mg/kg mAb CR8020: quando o tratamento com 15 mg/kg mAb CR8020 é administrado nos últimos pontos de tempo, a perda de peso aumentada.

5 As mudanças do peso corporal foram estatisticamente analisadas em mais detalhes usando área sob a análise da curva (AUC) (Tabela 17). Para a área sob a análise de curva o último peso corporal observado foi realizado em direção do dia 21 se um camundongo morreu / e foi submetido a eutanásia durante o seguimento do estudo. Brevemente, o peso por camundongo no dia 0 foi usado como valor de linha de base e
10 mudança de peso do dia 0 ao dia 21 foi determinado relativo a linha de base. O AUC foi definido como a adição da área cima e a curva abaixo da linha de base.

As contagens clínicas médias dos camundongos são descritos na figura 13C. Dos camundongos tratados com 15 mg/kg CR8020 no dia -1
15 pré-desafio, todos que sobrevivem e nenhum mostrou quaisquer sinais clínicos durante o período de observação. Os camundongos tratados com 15 mg/kg CR8020 no dia 1 pós-desafio mostrou uma sobrevivência de 100 %, entretanto, 4 fora dos 10 animais mostraram sinais clínicos, atingindo uma contagem clínica máxima entre 1 e 3. Dos animais tratados com 15 mg/kg
20 CR8020 no dia 2 pós-desafio todos sobreviveram. Entretanto, 9 fora de 10 animais mostraram sinais clínicos atingindo uma contagem clínica máxima de 2 ou 3. Os animais tratados com 15 mg/kg CR8020 no dia 3 pós-desafio mostrou uma sobrevivência de 50 %. Dos sobreviventes (n = 5), todos os animais mostraram sinais clínicos com uma contagem clínica máxima de 3.
25 Dos animais tratados com 15 mg/kg CR8020 no dia 4 pós-desafio todos mas um camundongo morto. A sobrevivência do camundongo mostrou os sinais clínicos atingindo uma contagem clínica máxima de 2. Todos os camundongos que sobreviveram através das ramificações de tratamento foram isentos dos sintomas no dia 21.

As contagens clínicas foram analisadas usando o procedimento GENMOD (SAS) para ajustar um modelo para as medições repetidas com camundongos como paciente e dados medidos em uma escala ordinal (Tabela 18). Visto que as curvas tem modelos diferentes do “dia” variável foi entrado como uma classe variável neste modelo. A partir dos grupos testados com 15 mg/kg mAb CR8020 no dia -1 antes do desafio e dia 1 e 2 pós-desafio em que 100 % dos camundongos que sobrevivem, a contagem clínica média foi significativamente diferente do grupo mAb de controle durante mais do período de estudo de 21 dias ($p \leq 0,001$ para todos os 3 grupos). A partir dos grupos testados com 15 mg/kg mAb CR8020 no dia 3 ou dia 4 pós-desafio em que respectivamente 50 % e 10 % dos camundongos que sobreviveram, a contagem clínica média também foi significativamente diferente a partir do grupo mAb de controle durante mais do período de estudo de 21 dias ($p < 0,05$ para ambos os grupos). A partir dos grupos testados com 15 mg/kg mAb CR8020 no dia 5 ou dia 6 pós-desafio a contagem clínica média foi significativamente diferente a partir do grupo mAb de controle no dia 3 apenas ($p \leq 0,001$). Esta diferença, embora estatisticamente significativa, não é considerado relevante.

Em conclusão, a terapia com 15 mg/kg de mAb CR8020 fornece 100 % de proteção até o dia 2 após o desafio em um modelo de camundongo H3N2 letal. Quando administrado no dia 3 ou dia 4 após o desafio, tratamento com 15 mg/kg mAb CR8020 fornece a proteção parcial. Quando administrado no dia 5 ou dia 6 após o desafio nenhum efeito protetor de 15 mg/kg mAb CR8020 foi observado no modelo de camundongo H3N2 letal.

Estes resultados mostram que um tratamento de pós-infecção com um anticorpo monoclonal direcionado contra vírus influenza H3N2, como divulgado neste e exemplificado pelo anticorpo CR8020, pode salvar os pacientes mamíferos, como mostrado neste em camundongos, após o desafio

com uma dosagem letal do vírus influenza H3N2. Ainda em um último estágio, isto é 4 dias pós-infecção, o anticorpo é capaz de proteger parcialmente os camundongos a partir da infecção letal com vírus influenza H3N2. Surpreendentemente, no dia 21 pós-infecção, a sobrevivência de todos os animais tratados por anticorpo atingiram os níveis de peso corporal normal e não mostram quaisquer sinais clínicos remanescentes.

Exemplo 16

Atividade profilática de anticorpos monoclonais IgG humanos contra desafio H7N7 letal in vivo

Um estudo foi realizado para testar o efeito profilático dos anticorpos monoclonais como divulgado neste, exemplificado por CR8020, contra um desafio letal com vírus influenza H7N7 in vivo. O MAb CR8020 foi testado pela eficácia profilática em um modelo de desafio de metal de camundongo com o vírus de camundongo adaptado influenza A/Chicken/Netherlands/621557/2003 (H7N7) (Central Veterinary Institute (CVI), Lelystad, The Netherlands). O vírus A/CH/NL/621557/03 (H7N7) foi adaptado aos camundongos após 3 passagens de pulmão-a-pulmão. O vírus de passagem 3 de camundongo adaptado H7N7 foi propagado nos ovos de galinha embriônicos no laboratório CVI's. Todos os camundongos (Balb/c, fêmeas, idade de 6-8 semanas, n = 8 por grupo) foram aclimatizados e mantidos por um período de pelo menos 4 dias antes do início do experimento. MAb CR8020 foi dosado a 30, 10, 3 ou 1 mg/kg intravenosamente na veia da cauda (veia coccígea) no dia -1 antes do desafio, assumindo um peso médio de 18 g por camundongo e um volume de dosagem fixo de 0,2 mL. Um grupo de controle foi tirado junto dosado com 30 mg/kg de controle negativo mAb CR3014. Os camundongos foram então desafiados no dia 0 com o vírus 25 LD₅₀ A/CH/NL/621557/03 (H7N7) pela inoculação intranasal. A dosagem atual do vírus administrado foi estimado pela titulação de poucas amostras replicadas a partir do material usado na

inoculação remanescente após a inoculação dos animais ser completa. Os tituladores de vírus (TCID₅₀/mL) do material usado na inoculação foram determinadas nas células MDCK. Os sinais clínicos e pesos corporais foram determinados diariamente de dia-1 antes do desafio até o final do estudo no dia 21 na mesma maneira como descrito no exemplo 14. Para analisar os níveis de plasma mAb no dia 0 e determinar a presença de anticorpos de inibição de hemaglutinação (HI) no dia 21, amostras sanguíneas foram tiradas de todos os camundongos no D0, justo antes do desafio e em pós-infecção D21.

10 Todos os camundongos foram ativos e parecem saudáveis sem mostrar os sinais da doença durante o período de aclimatização. A Fig. 14A mostra as taxas de sobrevivência dos camundongos, seguindo a administração mAb. Os camundongos dosados com 1 mg/kg mAb CR8020 ou mais mostrou uma taxa de sobrevivência de 100 %, considerando no grupo mAb de controle 0 % de sobrevivência.

15 Na figura 14B a mudança do peso corporal médio dos camundongos durante o período do estudo do 21 dia seguindo a administração mAb é mostrado. Nos grupos mAb CR8020 3, 10 e 30 mg/kg dos camundongos não perderam peso no período de estudo de 21 dia, considerando o mAb CR8020 1 mg/kg e controle de grupos mAb de perda de peso foi observado, com a média do peso corporal dos camundongos no grupo mAb CR8020 1 mg/kg recuperando o nível da linha de base no dia 21. As mudanças de peso corporal foram analisadas em mais detalhes com área sob a análise da curva (AUC) (Tabela 19). Para a área sob a análise da curva o último observou o peso corporal foi realizado em direção ao dia 21 se um camundongo morre / foi submetido a eutanásia durante o seguimento do estudo. Brevemente, o peso do camundongo no dia 0 foi usado como valor de linha de base e mudança de peso do dia 0 ao dia 21 foi determinado relativo a linha de base. O AUC foi definido como a adição da área acima e a área

abaixo da linha de base.

Existe uma conexão inversa clara entre a perda de peso e dosagem do anticorpo usado. Quando a concentração de anticorpo foi aumentado, a perda de peso diminuída. A diferença média na perda de peso, como comparado ao controle mAb, foi de 47,44, 79,75, 86,71 e 80,48 g*dia nos grupos mAb CR8020 1, 3, 10 e 30 mg/kg, respectivamente. Todas as diferenças foram estatisticamente significantes ($p < 0,001$).

As contagens clínicas médias dos camundongos são descritas na Fig. 14C. All, exceto um ou dois, animais dentro de cada grupo mostrou os sinais clínicos (contagem = 1) no dia 1 pós-desafio. Este é provavelmente não relacionado ao desafio viral, visto que a um grupo não desafiado levado junto no estudo mostrou um efeito similar no dia 1 (dados não mostrados).

Dos camundongos tratados com 3, 10 ou 30 mg/kg mAb CR8020 no dia -1 pré-desafio, todos sobreviveram e nenhum dos animais mostraram quaisquer sinais clínicos durante o período de observação (do dia 2 a pós-infecção do dia 21). Os camundongos tratados com 1 mg/kg mAb CR8020 no dia -1 pré-desafio, mostrou uma 100 % taxa de sobrevivência, mas 8 fora de 8 camundongos mostraram os sinais clínicos atingindo uma contagem clínica máxima de 3.

Estes resultados mostram que o anticorpo anti-H3N2 humano CR8020, identificado e desenvolvido como divulgado neste (CR8020) é capaz de fornecer a proteção heterosubtípica contra a dosagem letal de influenza H7N7 *in vivo*. Quando administrado um dia antes da infecção em uma dosagem de 3 mg/kg ou mais, mAb CR8020 foi capaz de evitar completamente a manifestação clínica de infecção H7N7 em camundongos. Em uma dosagem de 1 mg/kg CR8020 administrado um dia antes da infecção, todos os camundongos sobrevivem o desafio letal e a perda do peso corporal e os sinais clínicos totalmente observados resolvem no final do período de estudo de 21 dia.

Um segundo estudo foi realizado para avaliar e comparar a eficácia profilática de mAb CR8020, CR8041 e CR8043 no modelo de camundongo H7N7. MAb CR8020, CR8041 e CR8043 (produzido nas células PER.C6[®]) foram testados pela eficácia profilática no modelo de desafio letal de camundongo com o vírus influenza A/Chicken/Netherlands/621557/2003 (H7N7) adaptado ao camundongo (Central Veterinary Institute (CVI), Lelystad, The Netherlands. Brevemente, todos os camundongos (Balb/c, fêmeas, idade 6-8 semanas, n = 8 por grupo) foram aclimatizados e mantidos por um período de pelo menos 4 dias antes do início do experimento. O MAb CR8020 foi dosado a 10, 3 ou 1 mg/kg intravenosamente na veia da cauda (veia coccígea) no dia -1 antes do desafio, assume um peso médio de 18 g por camundongo e um volume de dosagem fixa de 0,2 mL. Os Mabs CR8041 e CR8043 foram dosados na mesma maneira a 30, 10, 3 ou 1 mg/kg. Um grupo de controle foi, quando junto, dosado com 30 mg/kg de controle negativo mAb CR3014. Após a administração mAb, os camundongos foram desafiados no dia 0 com 25 LD₅₀ camundongo adaptado ao vírus A/CH/NL/621557/03 (H7N7) pela inoculação intranasal. Os sinais clínicos e pesos corporais foram determinados diariamente a partir do dia-1 antes do desafio até o final do estudo no dia 21.

Na Fig. 15 as taxas de sobrevivência, a mudança de peso corporal % e as contagens clínicas dos camundongos são descritos, seguindo a administração profilática de mAbs. Como mostrado na Fig.15A, 100 % de sobrevivência foi observado nos grupos que recebem 3 ou 10 mg/kg CR8020, 10 ou 30 mg/kg CR8041 e no grupo que recebe 30 mg/kg CR8043. No grupo mAb de controle a taxa de sobrevivência foi de 0 %. A administração profilática de CR8020 todos os três níveis de dosagem e CR8041 todos os quatro níveis de dosagem fornece um melhoramento estatisticamente significativo de tempo de sobrevivência, comparado ao grupo de controle mAb (classificação log, $p < 0,002$). A administração profilática de 1 mg/kg de

CR8043 não resulta em um melhoramento estatisticamente significativo de tempo de sobrevivência, comparado ao grupo de controle mAb (classificação log, $p = 0,692$). O aumento da dosagem CR8043 ao 3 mg/kg ou mais, resultou em um melhoramento estatisticamente significativo de tempo de sobrevivência, comparado ao grupo de controle mAb (classificação log, $p \leq 0,034$).

Em uma pós-análise hoc, o tempo de sobrevivência foi comparado aos grupos de dosagem inferior de mAbs CR8020, CR8041 e CR8043. A administração profilática de 1 mg/kg CR8020 resultou em um melhoramento estatisticamente significativo de tempo de sobrevivência, comparado a 1 mg/kg de CR8041 e 1 mg/kg de CR8043 (classificação log, respectivamente $p = 0,029$ e $p < 0,001$). Além disso, a administração profilática de 1 mg/kg CR8041 resultou em um melhoramento estatisticamente significativo de tempo de sobrevivência quando comparado ao 1 mg/kg CR8043 (classificação log, $p = 0,004$).

Na Fig. 15B a mudança do peso corporal médio dos camundongos durante o período de estudo no dia 21 seguindo a administração profilática dos mAbs é mostrado. Nos grupos mAb CR8020 e mAb CR8041 1 mg/kg diversas perdas de peso foram observadas comparáveis aquele do grupo de controle mAb. Nos grupos de dosagem maiores de mAb CR8020 e CR8041, perda de peso durante o estudo no dia 21 foi limitado ou ausente. Nos grupos dosados com mAb CR8043 diversas perdas de peso foi observado em todos os grupos, com o peso corporal médio dos grupos dosados a 30 mg/kg de recuperação quase ao nível de linha de base no dia 21. As mudanças de peso corporal foram analisadas em mais detalhes com área sob a análise da curva (AUC) (Tabela 21). Existe uma conexão inversa clara entre a perda de peso e dosagem de anticorpo usado. Quando a concentração de anticorpo foi aumentado, a perda de peso diminuída. Com 1 mg/kg de CR8020 não existe redução estatisticamente significativa na perda de peso comparado ao grupo de

controle ($p = 0,356$). O aumento da dosagem a 3 ou 10 mg/kg resultou em uma redução estatisticamente significativa na perda de peso, comparado ao grupo de controle ($p < 0,001$ em ambos casos). Com 1 mg/kg de CR8041 não existe redução estatisticamente significativa na perda de peso comparado ao grupo de controle ($p = 1$).

O aumento da dosagem a 3, 10 ou 30 mg/kg CR8041 resultou em uma redução estatisticamente significativa na perda de peso, comparado ao grupo de controle ($p < 0,001$ em todos os 3 casos). Com 1, 3 ou 10 mg/kg de CR8043 não existe redução estatisticamente significativa na perda de peso comparado ao grupo de controle ($p = 0,997, 0,510$ e $0,992$ respectivamente). O aumento da dosagem a 30 mg/kg resultou em uma redução estatisticamente significativa na perda de peso, comparado ao grupo de controle ($p < 0,001$). Em uma análise adicional o AUC médio de dados de mudança de peso corporal, mAbs CR8020, CR8041 e CR8043 foram comparados usando uma análise univariada da diferença com e dosagens incluídas no modelo como fatores fixos. Visto que a uma dosagem de 30 mg/kg de CR8020 não foi incluído no estudo, a comparação foi limitada as dosagens de anticorpos de 1, 3 e 10 mg/kg. As diferenças entre os anticorpos foram estimados pelo uso dos meios marginais com ajuste Sidak para as comparações múltiplas. Nas três dosagens de anticorpo considerado, tratamento com CR8020 resultou em uma redução melhorada estatisticamente significativa de perda de peso comparada ao CR8041 e CR8043 (diferença média nos meios marginais de 23,73 e 68,29 g*dia, respectivamente $p = 0,013$ e $p < 0,001$). Além disso, o tratamento com CR8041 resultou em uma redução melhorada estatisticamente significativa da perda de peso quando comparado ao CR8043 (diferença nos meios marginais de 44,56 g*dia, $p < 0,001$).

As contagens clínicas médias dos camundongos são descritos na Fig15C. Todos os camundongos, exceto um no dia 0 (3 mg/kg grupo CR8020) mostraram sinais clínicos (contagem = 1, revestimento bruto) do

dia 0 ao dia 3. Este aumento não foi observado no período de aclimatização e no dia -1. A causa desta contagem clínica aumentada não é precisamente clara. Dos grupos testados com 3 ou 10 mg/kg mAb CR8020 no dia -1 pré-desafio, a contagem clínica média retornou ao 0 no dia 9 pós-desafio, considerando no grupo de controle da contagem clínica média atingiu 4 no dia 8, com todos os camundongos mortos ou submetidos a eutanásia no dia 9. O grupo CR8020 1 mg/kg mostrou uma contagem clínica média de 3 do dia 4-13, retornando a contagem 0 no dia 15. Dos grupos testados com 3, 10 ou 30 mg/kg mAb CR8041 no dia -1 pré-desafio, a contagem clínica média retornada ao 0 no dia 9, 10 ou 12 pós-desafio, respectivamente. O grupo CR8041 1 mg/kg atingiu uma contagem clínica média de 4 no dia 10 após o desafio. Dos grupos testados com 1, 3 ou 10 mg/kg CR8043 da contagem clínica média atingiu 4 no dia 9, 9 ou 12, respectivamente, considerando uma contagem clínica média do grupo 30 mg/kg CR8043 atingiu 3 do dia 6—13 e retornou ao 0 no dia 14.

Os resultados acima claramente mostram que os anticorpos anti-H3N2 humanos CR8020, CR8041 e CR8043 são capazes de fornecer a proteção heterosubtípica contra uma dosagem letal de influenza H7N7 in vivo. O Mab CR8020 foi observado ser o mais potente dos três mAbs contra o vírus influenza A/CH/NL/621557/03 (H7N7) adaptado ao camundongo, com base no resultado da pós-análise hoc de tempo de sobrevivência e mudança de peso corporal. Em uma dosagem de 3 ou 10 mg/kg mAb CR8020 administrado um dia antes da infecção 100 % dos camundongos que sobrevivem ao desafio letal e manifestação clínica da infecção H7N7 foi fortemente reduzida. Em uma dosagem de 1 mg/kg CR8020 administrada um dia antes da infecção, 75 % dos camundongos que sobrevivem ao desafio letal neste experimento e os sinais clínicos dos camundongos que sobrevivem resultou completamente no período de estudo do dia 15 ao dia 21.

Exemplo 17

Atividade terapêutica de anticorpos IgG humanos monoclonais contra o desafio de H7N7 letal in vivo

Este estudo foi realizado para estimar a eficácia terapêutica e a janela de mAb CR8020 no modelo H7N7. MAb CR8020 (produzido em células PER.C6[®] cells) foi testado quanto à eficácia terapêutica no modelo letal de desafio de camundongo com o vírus influenza A/Chicken/Netherlands/621557/2003 (H7N7) adaptado ao camundongo (Central Veterinary Institute (CVI), Lelystad, The Netherlands). Brevemente, todos os camundongos (Balb/c, fêmea, idade de 6 a 8 semanas, n = 8 por grupo) foram aclimatados e mantidos por um período de pelo menos 4 dias antes do início do experimento. MAb CR8020 foi dosado em 15 mg/kg intravenosamente na veia da cauda (veia coccígea) no dia -1 antes do desafio, (grupo 1; controle positivo de profilaxia) ou no dia 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 após o desafio (grupos 2 a 7), assumindo um peso médio de 18 g por camundongo e um volume de dose fixo de 0,2 mL. O grupo 8 recebeu mAb controle negativo CR3014 (15 mg/kg) no dia 1 após o desafio. Os camundongos foram desafiados no dia 0 com vírus 25 LD₅₀ A/CH/NL/621557/03 (H7N7) adaptado ao camundongo pela inoculação intranasal. Os sinais clínicos e os pesos corporais foram determinados diariamente a partir do dia -1 antes do desafio até o final do estudo no dia 21.

A Figura 16A mostra as taxas de sobrevivência dos camundongos, seguindo a administração intravenosa de mAb CR8020 (15 mg/kg em todos os grupos) ou control mAb (15 mg/kg). Quando 15 mg/kg de mAb CR8020 foi administrado no dia 1 pré-desafio ou dias 1 ou 3 pós-desafio, todos os animais que sobreviveram ao desafio viral, visto que em nenhum grupo mAb de controle, a taxa de sobrevivência foi de 0 %. Quando 15 mg/kg de mAb CR8020 foi administrado nos dias 2 e 4, respectivamente 87,5 % e 50 % de sobrevivência foi observado. O tempo de sobrevivência destes grupos foi de maneira estatisticamente significante diferente daquele

do grupo mAb de controle ($p = 0,002$ e $p = 0,014$, respectivamente). Os grupos testados com 15 mg/kg de CR8020 no dia 5 e 6 experimentaram a taxa de sobrevivência de 0 % e não tiveram diferença estatisticamente significativa no tempo de sobrevivência destes grupos em comparação com o grupo mAb controle ($p = 0,837$ e $p = 0,876$, respectivamente).

Na figura 16B, a mudança de peso corporal média com relação ao dia 0 dos camundongos durante o dia 21 do período de estudo é mostrada. Em geral, a perda de peso corporal média aumenta quando o mAb CR8020 é administrado no último ponto de tempo seguindo o desafio. Entretanto, as curvas de peso corporal médias do mAb CR8020, os grupos de tratamento dos dias 2 e 3 cruzam no dia 10, devido ao único camundongo que não sobrevive no grupo de tratamento do dia 2. A área sob a análise da curva das mudanças de peso corporal mostram uma transição acentuada na perda de peso média entre os tratamentos nos dias -1 ao dia 3 em comparação com o tratamento nos dias 4 a 6 (Tabela 22). Tratamento com 15 mg/kg de CR8020 no dia -1 pré-desafio ou dia 1, 2 ou 3 pós-desafio resultou em uma redução estatisticamente significativa na perda de peso comparado ao grupo de controle ($p < 0,001$ para todos os 4 grupos). Tratamento com 15 mg/kg de CR8020 nos dias 4, 5 ou dia 6 não resultou em uma redução estatisticamente significativa na perda de peso comparado ao grupo de controle ($p = 0,566$, $p = 0,979$ e $p = 0,858$, respectivamente).

Os registros clínicos médios dos camundongos são descritos na figura 16C. Dos animais tratados com 15 mg/kg de CR8020 no dia -1 pré-desafio, todos sobreviveram e nenhum dos animais mostrou quaisquer sinais clínicos durante o período de observação. Os animais tratados no dia 1 pós-desafio mostraram uma sobrevivência de 100 %, entretanto, 7 de 8 animais mostraram sinais clínicos atingindo uma contagem clínica máxima de 1. O 8º animal atingiu uma contagem clínica máxima de 3. Dos animais tratados no dia 2 pós-desafio todos, menos um animal sobreviveram. Os

animais sobreviventes (7 de 8) apresentaram sinais clínicos atingindo uma contagem clínica máxima de 1 (n = 4) ou 3 (n = 3). Os animais tratados no dia 3 pós-desafio mostraram uma sobrevivência de 100 % e todos os animais mostraram sinais clínicos com a contagem clínica máxima de 3. dos animais tratados no dia 4 pós-desafio, 50 % sobreviveram ao desafio letal. Os animais sobreviventes mostraram sinais clínicos atingindo uma contagem clínica máxima de 3. Os animais tratados no dia 5 ou 6 pós-desafio não sobreviveram. Os registros clínicos foram analisados usando-se usando o procedimento GENMOD (SAS) para adaptar um modelo a medições repetidas com camundongos como o indivíduo e os dados medidos em uma escala ordinal (Tabela 23). dos grupos testados com 15 mg/kg mAb CR8020 no dia -1 antes do desafio e dia 1, 2, 3 ou 4 pós-desafio, o registro clínico médio foi de significância estatisticamente diferente do grupo de controle mAb durante a maior parte do período de estudo dia 21 (dia 8 a 21; $p \leq 0,038$ para todos os 4 grupos). Dos grupos tratados com 15 mg/kg de mAb CR8020 no dia 5 pós-desafio o registro clínico médio foi significativamente diferente do grupo mAb de controle no dia 8 apenas ($p \leq 0,001$). Esta diferença, embora estatisticamente significativa não é considerada relevante. O registro clínico médio do grupo de tratamento do dia 6 de 15 mg/kg de mAb CR8020 não foi estatisticamente diferente do grupo de controle.

Este estudo mostra claramente que a terapia com 15 mg/kg de mAb CR8020 fornece de 87,5 a 100 % de proteção quando administrado até o dia 3 após o desafio em um modelo de camundongo H7N7 letal. Quando administrado no dia 4 após o desafio, tratamento com 15 mg/kg de mAb CR8020 fornece proteção parcial. Quando administrado no dia 5 ou dia 6 após o desafio no efeito protetor de 15 mg/kg mAb CR8020 foi observado no modelo de camundongo H7N7 letal. Em outras palavras, quando administrado 4 dias ou mais antes da morte, o CR8020 forneceu proteção neste modelo de camundongo letal.

Exemplo 18

Coquetel de anticorpos monoclonais que eficientemente neutraliza os subtipos de influenza múltipla a partir do grupo filogenéticos 1 e 2.

5 A vacina influenza sazonal cada ano consiste de duas preparações diferentes induzindo a imunidade das cepas de influenza A, um representativo para o subtipo H1 de circulação e um representativo para a cepa H3 de circulação. A razão subjacente é que as cepas de influenza a partir do subtipo H1 e H3 são, deste modo, diferentes de modo que as vacinas preparadas do tipo não induzem a proteção contra o outro subtipo. De maneira ideal, uma preparação monoclonal de anticorpo amplamente protetor para tratar a influenza deve ser efetiva contra as cepas de influenza a partir de ambos grupos filogenéticos 1 (H1) e grupo 2 (H3). Entretanto, novamente devido as diferenças das sequências entre as moléculas HA tal anticorpo simples é difícil de encontrar. Por exemplo, o anticorpo Fab28 descrito no WO 2009/115972 liga-se e neutraliza os subtipos H1 muito melhores do que os vírus do subtipo H3 provavelmente devido a conservação menor do epítipo entre os vírus do grupo 1 e grupo 2 comparado aos vírus dentro de um grupo filogenético. Para atingir o objetivo de um produto simples efetivo contra os subtipos de influenza múltiplos a partir de ambos grupos filogenéticos um pode deste modo ter que combinar dois ou mais anticorpos diferentes em um coquetel. A fim de ser bem sucedido tal preparação deve consistir de anticorpos que não interfere com cada outro.

25 Anticorpos que eficientemente neutralizam os vírus de subtipos H1, H5 e H9 foram descritos no WO2008/028946, com anticorpos CR6261 e CR6323 como exemplos típicos. A região de ligação (epítipo) de CR6261 foi elucidada em detalhe usando co-cristalização das moléculas H1 ou H5 HA e CR6261 (ver também banco de dados PDB entra em 3GBM e 3GBM no <http://www.pdb.org> e Ekiert et al., 2009). Para investigar se os

anticorpos monoclonais da presente invenção podem ser usados em combinação com os anticorpos CR6261 previamente descritos este foi testado se os anticorpos foram capazes de ligar-se tanto nos grupos filogenéticos 1 quanto 2. Isto é, experimentos de ligação Elisa e FACS foram feitos como descrito no Exemplo 7 usando as moléculas HA de subtipos H1 e H5 bem como os subtipos H3 e H7 com CR6261, CR6323, CR8001, CR8020, CR8041 e CR8043. Os resultados são resumidos na tabela 20 e mostram que os anticorpos que amplamente neutralizam os vírus do grupo 1 não ligam-se aos vírus do grupo 2 e vice versa. Visto que os anticorpos não interferem com cada outro e este pode ser esperado que a potência de neutralização dos anticorpos contra os subtipos respectivos será mantido resultando na neutralização eficiente dos subtipos tanto do grupo 1 quanto 2.

Portanto um coquetel que compreende CR6261 e/ou CR6323 por um lado e CR8020, CR8041, e/ou CR8043 por outro lado será ativo contra o vírus de pelo menos tanto os subtipos H1 quanto H3. Deste modo, a proteção eficiente é possível aos subtipos de influenza dos grupos filogenéticos 1 e 2 usando uma preparação.

Exemplo 19.

Cinéticos de ligação das moléculas de ligação.

As afinidades de fragmentos Fab clivados por papaína de CR8020 e CR8043 foram medidos usando o sistema Octet RED e biossensores de estreptavidina de ForteBio. Os antígenos de hemaglutinina de influenza do subtipo H3s A/Wisconsin/67/2005 (Protein Science) e A/Brisbane/10/2007 (Protein Science) foram biotinilados para a imobilização aos biossensores de estreptavidina (ForteBio). Os experimentos de ligação Fab foram repetidos 5 vezes usando uma faixa de concentração entre 2,3 a 150 nM e 0,16-30 nM por CR8020 e CR8043, respectivamente, no tampão cinético (ForteBio, 18.5032). A apresentação experimental pelas medições de afinidade no Octet foi como segue: a imobilização da hemaglutinina

biotinilada aos biossensores de estreptavidina por 1800 segundos seguido pela associação dos Fabs diluídos em série CR8020 e CR8043 por 1200 segundos e dissociação subsequente no tampão cinético por 1800 segundos. Os dados de ligação foram analisados com o software de análise Octet usando o modelo 1:1.

A afinidade constante (valor K_d) das moléculas de ligação para HA do subtipo H3 são mostrados na tabela 24.

Tabela 1: primeira série ampliações de Vkappa, Vlambda e VH

| Nome do iniciador | Sequência de polinucleotídeo de iniciador | SEQ ID N°: |
|-------------------|---|------------|
| OK1 (HuVK1B) | GAC ATC CAG WTG ACC CAG TCT CC | 192 |
| OK2 (HuVK2) | GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC | 193 |
| OK3 (HuVK2B2) | GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CC | 194 |
| OK4 (HuVK3B) | GAA ATT GTG WTG ACR CAG TCT CC | 195 |
| OK5 (HuVK5) | GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC | 196 |
| OK6 (HuVK6) | GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC | 197 |
| OCK (HuCK) | ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT CTT | 198 |
| OL1 (HuVL1A)* | CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CC | 199 |
| OL1 (HuVL1B)* | CAG TCT GTG YTG ACG CAG CCG CC | 200 |
| OL1 (HuVL1C)* | CAG TCT GTC GTG ACG CAG CCG CC | 201 |
| OL2 (HuVL2B) | CAG TCT GCC CTG ACT CAG CC | 202 |
| OL3 (HuVL3A) | TCC TAT GWG CTG ACT CAG CCA CC | 203 |
| OL4 (HuVL3B) | TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC | 204 |
| OL5 (HuVL4B) | CAG CYT GTG CTG ACT CAA TC | 205 |
| OL6 (HuVL5) | CAG GCT GTG CTG ACT CAG CCG TC | 206 |
| OL7 (HuVL6) | AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA | 207 |
| OL8 (HuVL7/8) | CAG RCT GTG GTG ACY CAG GAG CC | 208 |
| OL9 (HuVL9)# | CWG CCT GTG CTG ACT CAG CCM CC | 209 |
| OL9 (HuVL10)# | CAG GCA GGG CTG ACT CAG | 210 |
| OCL (HuCL2)X | TGA ACA TTC TGT AGG GGC CAC TG | 211 |
| OCL (HuCL7)X | AGA GCA TTC TGC AGG GGC CAC TG | 212 |
| OH1 (HuVH1B7A)+ | CAG RTG CAG CTG GTG CAR TCT GG | 213 |
| OH1 (HuVH1C)+ | SAG GTC CAG CTG GTR CAG TCT GG | 214 |
| OH2 (HuVH2B) | CAG RTC ACC TTG AAG GAG TCT GG | 215 |
| OH3 (HuVH3A) | GAG GTG CAG CTG GTG GAG | 216 |
| OH4 (HuVH3C) | GAG GTG CAG CTG GTG GAG WCY GG | 217 |
| OH5 (HuVH4B) | CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG | 218 |
| OH6 (HuVH4C) | CAG STG CAG CTG CAG GAG TCS GG | 219 |
| OH7 (HuVH6A) | CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG | 220 |
| OCM (HuClgM) | TGG AAG AGG CAC GTT CTT TTC TTT | 221 |

* Mistura em taxa 1:1:1

Mistura em taxa 1:i

X Mistura em taxa 1:1

+ Mistura em taxa 1:1

Tabela 2: Segunda série Amplificações de Vkappa, Vlambda e VH

| Nome do iniciador | Sequência de polinucleotídeo de iniciador | SEQ ID NO |
|--------------------|--|-----------|
| OK1S (HuVK1B-SAL) | TGA GCA CAC AGG TCG ACG GAC ATC CAG WTG ACC CAG TCT CC | 222 |
| OK2S (HuVK2-SAL) | TGA GCA CAC AGG TCG ACG GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC | 223 |
| OK3S (HuVK2B2-SAL) | TGA GCA CAC AGG TCG ACG GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CC | 224 |
| OK4S (HuVK3B-SAL) | TGA GCA CAC AGG TCG ACG GAA ATT GTG WTG ACR CAG TCT CC | 225 |
| OK5S (HuVK5-SAL) | TGA GCA CAC AGG TCG ACG GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC | 226 |
| OK6S (HuVK6-SAL) | TGA GCA CAC AGG TCG ACG GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC | 227 |

| Nome do iniciador | Sequência de polinucleotídeo de iniciador | SEQ ID NO |
|--------------------|---|-----------|
| OJK1 (HuJK1-NOT) | GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT TTC CAC CIT GGT CCC | 228 |
| OJK2 (HuJK2-NOT) | GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC | 229 |
| OJK3 (HuJK3-NOT) | GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC | 230 |
| OJK4 (HuJK4-NOT) | GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC | 231 |
| OJK5 (HuJK5-NOT) | GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC | 232 |
| OL1S (HuVL1A-SAL)* | TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CC | 233 |
| OL1S (HuVL1B-SAL)* | TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG TCT GTG YTG ACG CAG CCG CC | 234 |
| OL1S (HuVL1C-SAL)* | TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG TCT GTC GTG ACG CAG CCG CC | 235 |
| OL2S (HuVL2B-SAL) | TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG TCT GCC CTG ACT CAG CC | 236 |
| OL3S (HuVL3A-SAL) | TGA GCA CAC AGG TCG ACG TCC TAT GWG CTG ACT CAG CCA CC | 237 |
| OL4S (HuVL3B-SAL) | TGA GCA CAC AGG TCG ACG TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC | 238 |
| OL5S (HuVL4B-SAL) | TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG CYT GTG CTG ACT CAA TC | 239 |
| OL6S (HuVL5-SAL) | TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG GCT GTG CTG ACT CAG CCG TC | 240 |
| OL7S (HuVL6-SAL) | TGA GCA CAC AGG TCG ACG AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA | 241 |
| OL8S (HuVL7/8-SAL) | TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG RCT GTG GTG ACY CAG GAG CC | 242 |
| OL9S (HuVL9-SAL)# | TGA GCA CAC AGG TCG ACG CWG CCT GTG CTG ACT CAG CCM CC | 243 |
| OL9S (HuVL10-SAL)# | TGA GCA CAC AGG TCG ACG CAG GCA GGG CTG ACT CAG | 244 |
| OJL1 (HuJL1-NOT) | GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACC TAG GAC GGT GAC CTT GGT CCC | 245 |
| OJL2 (HuJL2/3-NOT) | GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC | 246 |
| OJL3 (HuJL7-NOT) | GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACC GAG GAC GGT CAG CTG GGT GCC | 247 |
| OH1S (HuVH1B-SFI)+ | GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG RTG CAG CTG GTG CAR TCT GG | 248 |
| OH1S (HuVH1C-SFI)+ | GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC SAG GTC CAG CTG GTR CAG TCT GG | 249 |
| OH2S (HuVH2B-SFI) | GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG RTC ACC TTG AAG GAG TCT GG | 250 |
| OH3S (HuVH3A-SFI) | GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG | 251 |
| OH4S (HuVH3C-SFI) | GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG WCY GG | 252 |
| OH5S (HuVH4B-SFI) | GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG | 253 |
| OH6S (HuVH4C-SFI) | GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG STG CAG CTG CAG GAG TCS GG | 254 |
| OH7S (HuVH6A-SFI) | GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG | 255 |
| OJH1 (HuJH1/2-XHO) | GAG TCA TTC TCG ACT CGA GAC RGT GAC CAG GGT GCC | 256 |
| OJH2 (HuJH3-XHO) | GAG TCA TTC TCG ACT CGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC | 257 |
| OJH3 (HuJH4/5-XHO) | GAG TCA TTC TCG ACT CGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC | 258 |
| OJH4 (HuJH6-XHO) | GAG TCA TTC TCG ACT CGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC | 259 |

* Mistura em taxa 1:1:1

Mistura em taxa 1:1

+ Mistura em taxa 1:1

Tabela 3. Segunda série Resumo da amplificação de regiões VL

| Padrão | 5' iniciador | 3' iniciador | Produto | Dividido em PK/PL(%) | Grupo | Dividido em VL (%) |
|--------|--------------|--------------|---------|----------------------|-------|--------------------|
| K1 | OK1S | OJK1 | K1J1 | 25 | PK1 | 30 |
| | OK1S | OJK2 | K1J2 | 25 | | |
| | OK1S | OJK3 | K1J3 | 10 | | |
| | OK1S | OJK4 | K1J4 | 25 | | |
| | OK1S | OJK5 | K1J5 | 15 | | |
| K2 | OK2S | OJK1 | K2J1 | 25 | PK2 | 4 |
| | OK2S | OJK2 | K2J2 | 25 | | |
| | OK2S | OJK3 | K2J3 | 10 | | |
| | OK2S | OJK4 | K2J4 | 25 | | |
| | OK2S | OJK5 | K2J5 | 15 | | |
| K3 | OK3S | OJK1 | K3J1 | 25 | PK3 | 1 |
| | OK3S | OJK2 | K3J2 | 25 | | |
| | OK3S | OJK3 | K3J3 | 10 | | |
| | OK3S | OJK4 | K3J4 | 25 | | |
| | OK3S | OJK5 | K3J5 | 15 | | |
| K4 | OK4S | OJK1 | K4J1 | 25 | PK4 | 19 |
| | OK4S | OJK2 | K4J2 | 25 | | |
| | OK4S | OJK3 | K4J3 | 10 | | |
| | OK4S | OJK4 | K4J4 | 25 | | |
| | OK4S | OJK5 | K4J5 | 15 | | |
| K5 | OK5S | OJK1 | K5J1 | 25 | PK5 | 1 |
| | OK5S | OJK2 | K5J2 | 25 | | |
| | OK5S | OJK3 | K5J3 | 10 | | |
| | OK5S | OJK4 | K5J4 | 25 | | |
| | OK5S | OJK5 | K5J5 | 15 | | |
| K6 | OK6S | OJK1 | K6J1 | 25 | PK6 | 5 |
| | OK6S | OJK2 | K6J2 | 25 | | |
| | OK6S | OJK3 | K6J3 | 10 | | |
| | OK6S | OJK4 | K6J4 | 25 | | |
| | OK6S | OJK5 | K6J5 | 15 | | |
| L1 | OL1S | OJL1 | L1J1 | 30 | PL1 | 14 |
| | OL1S | OJL2 | L1J2 | 60 | | |
| | OL1S | OJL3 | L1J3 | 10 | | |
| L2 | OL2S | OJL1 | L2J1 | 30 | PL2 | 10 |
| | OL2S | OJL2 | L2J2 | 60 | | |
| | OL2S | OJL3 | L2J3 | 10 | | |
| L3 | OL3S | OJL1 | L3J1 | 30 | PL3 | 10 |
| | OL3S | OJL2 | L3J2 | 60 | | |
| | OL3S | OJL3 | L3J3 | 10 | | |
| L4 | OL4S | OJL1 | L4J1 | 30 | PL4 | 1 |
| | OL4S | OJL2 | L4J2 | 60 | | |
| | OL4S | OJL3 | L4J3 | 10 | | |
| L5 | OL5S | OJL1 | L5J1 | 30 | PL5 | 1 |
| | OL5S | OJL2 | L5J2 | 60 | | |
| | OL5S | OJL3 | L5J3 | 10 | | |
| L6 | OL6S | OJL1 | L6J1 | 30 | PL6 | 1 |
| | OL6S | OJL2 | L6J2 | 60 | | |
| | OL6S | OJL3 | L6J3 | 10 | | |
| L7 | OL7S | OJL1 | L7J1 | 30 | PL7 | 1 |
| | OL7S | OJL2 | L7J2 | 60 | | |
| | OL7S | OJL3 | L7J3 | 10 | | |
| L8 | OL8S | OJL1 | L8J1 | 30 | PL8 | 1 |
| | OL8S | OJL2 | L8J2 | 60 | | |
| | OL8S | OJL3 | L8J3 | 10 | | |
| L9 | OL9S | OJL1 | L9J1 | 30 | PL9 | 1 |
| | OL9S | OJL2 | L9J2 | 60 | | |
| | OL9S | OJL3 | L9J3 | 10 | | |
| | | | | | VL | 100 % |

Tabela 4. Segunda série resumo da amplificação de regiões VH

| Padrão | 5' iniciador | 3' iniciador | Produto | Dividido em PK/PL (%) | Grupo | Dividido em VH (%) |
|--------|--------------|--------------|---------|-----------------------|-------|--------------------|
| H1 | OH1S | OJH1 | H1J1 | 10 | PH1 | 25 |
| | OH1S | OJH2 | H1J2 | 10 | | |
| | OH1S | OJH3 | H1J3 | 60 | | |
| | OH1S | OJH4 | H1J4 | 20 | | |
| H2 | OH2S | OJH1 | H2J1 | 10 | PH2 | 2 |
| | OH2S | OJH2 | H2J2 | 10 | | |
| | OH2S | OJH3 | H2J3 | 60 | | |
| | OH2S | OJH4 | H2J4 | 20 | | |
| H3 | OH3S | OJH1 | H3J1 | 10 | PH3 | 25 |
| | OH3S | OJH2 | H3J2 | 10 | | |
| | OH3S | OJH3 | H3J3 | 60 | | |
| | OH3S | OJH4 | H3J4 | 20 | | |
| H4 | OH4S | OJH1 | H4J1 | 10 | PH4 | 25 |
| | OH4S | OJH2 | H4J2 | 10 | | |
| | OH4S | OJH3 | H4J3 | 60 | | |
| | OH4S | OJH4 | H4J4 | 20 | | |
| H5 | OH5S | OJH1 | H5J1 | 10 | PH5 | 2 |
| | OH5S | OJH2 | H5J2 | 10 | | |
| | OH5S | OJH3 | H5J3 | 60 | | |
| | OH5S | OJH4 | H5J4 | 20 | | |
| H6 | OH6S | OJH1 | H6J1 | 10 | PH6 | 20 |
| | OH6S | OJH2 | H6J2 | 10 | | |
| | OH6S | OJH3 | H6J3 | 60 | | |
| | OH6S | OJH4 | H6J4 | 20 | | |
| H7 | OH7S | OJH1 | H7J1 | 10 | PH7 | 1 |
| | OH7S | OJH2 | H7J2 | 10 | | |
| | OH7S | OJH3 | H7J3 | 60 | | |
| | OH7S | OJH4 | H7J4 | 20 | | |
| | | | | | VH | 100 % |

Tabela 5: Características das bibliotecas de célula B de memória de IgM individual.

| bibliotecas de memória de IgM | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------------|-----|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Doador | Células | | | Bibliotecas | | |
| | Total (x10 ⁶) | PBL | % de células B de memória | Tamanho (x10 ⁶) | % de frequência de inserção | % de ORF % de Unique |
| Indivíduo 1 | | | | 3 | 96 | 74 98 |
| Indivíduo 2 | 72,5 | | 1,7 | 5 | 98 | 79 98 |
| Indivíduo 3 | 67,5 | | 1,4 | 3 | 96 | 79 98 |
| Indivíduo 4 | 132,5 | | 2,3 | 6 | 98 | 69 99 |

Tabela 6: Atividade de ligação cruzada de anticorpos de fago de cadeia simples a moléculas HA de subtipos HA diferentes como medido por ELISA (titulador de ELISA; OD 492 nm). X= não determinado; H3= HA do subtipo H3; H7= HA do subtipo H7; HB= HA de vírus influenza B.

| SC # | H3 | H7 | HB |
|----------|-------|-------|----|
| sc08-001 | 0,885 | 2,451 | x |
| sc08-003 | 1,320 | 0,222 | x |
| sc08-006 | 0,511 | 0,227 | x |
| sc08-007 | 0,074 | 2,365 | x |
| sc08-009 | 0,095 | 1,130 | x |
| sc08-010 | 0,165 | 1,242 | x |
| sc08-011 | 0,090 | 1,802 | x |
| sc08-013 | 0,078 | 1,400 | x |
| sc08-014 | 0,239 | 0,834 | x |
| sc08-015 | 0,727 | 0,165 | x |

| IgG# | Loca IVh | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | Local VI | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
|--------|----------|---------------|--------------------------|-------------------------------|----------|---------------------------|---------------|--------------------|
| CR8015 | 3-7 | SYWMS (87) | NMKQDGSEKYY VDSVKG (88) | GSCDDSWT GCHDAFDI (89) | 2-14 | GGDNIGR KSVH (93) | DNSDRPS (94) | HVWGSS RDHYV (95) |
| CR8016 | 3-7 | SYWMS (87) | NMKQDGSEKYY VDSVKG (88) | GSCDDSWT GCHDAFDI (89) | 1-13 | TGSSNIG AGYDVH (96) | GNN (97)RPS | QSYDSSL SVYV (98) |
| CR8017 | 3-7 | SYWMS (87) | NMKQDGSEKYY VDSVKG (88) | GSCDDSWT GCHDAFDI (89) | 2-13 | QGDSLRS YYAS (99) | AKTNRPS (100) | NSRDSSG NHVV (101) |
| CR8018 | 3-7 | SYWMS (87) | NMKQDGSEKYY VDSVKG (88) | GSCDDSWT GCHDAFDI (89) | 1-4 | TGTSSDVG GYNYVS (102) | EVSHRPS (85) | SSYTGEG PLGV (86) |
| CR8019 | 3-23 | TSAMS (103) | GISGSGATYYA GSVKG (104) | DTSLFEYDT SGFTAPGNA FDI (105) | O12 | RASQSISG YLN (106) | GASTLQS (107) | QTYTSP PYA (108) |
| CR8020 | 1-18 | RFGVS (109) | WISAYNGDTYY AQKFA (110) | EPPLFYSSW SLDN (111) | A27 | ARASQSVS MNYLA (112) | GASRRAT (113) | QQYGTSP RT (114) |
| CR8021 | 3-23 | AYAMN (115) | AIGGGGGSTYYA DSVKG (116) | GRDWTGGY FFDS (117) | B3 | KSSQSIFY SSNNKNY LT (118) | WASTRES (119) | QQYYSIP YT (120) |
| CR8038 | 3-23 | GYAMS (121) | DIGGGGGTYYA DSVKG (122) | SSSWDRAY FFDS (123) | B3 | KSSQSVLY SSIHKNYL A (124) | WASTRES (119) | QQYRSP PT (125) |
| CR8039 | 4-59 | SYWWS (126) | YIYYRGGTSYNP SLKS (127) | KDWGSAAG SVWYFDL (128) | 1-2 | TGTSSDVG GYNYVS (129) | EVSKRPS (130) | SSYAGSN NLI (131) |
| CR8040 | 3-33 | SYGMH (132) | FIWYDGSNKHY ADSMKG (133) | DGGYSTWE WYFDL (134) | A26 | RASQGIGS NLH (135) | YASQSIT (136) | HQSSSLP LT (137) |
| CR8041 | 1-18 | SFGLS (138) | WISAYNGEIKYA QKFQG (139) | EPPLFYSSW SLDF (140) | A27 | ARASQSVS SNYLA (141) | GASRRAT (142) | QQYDSSP RT (143) |
| CR8043 | 1-03 | AYSMH (144) | WINTAIGNTQYS QKFQD (145) | GASWDARG WSGY (146) | B3 | KSSQSVFS SSTNKNYL A (147) | WSSTRES (148) | HQYYTAP WT (149) |
| CR8049 | 2-26 | NTRMGVS (150) | HIFSNDETSyrTS LKR (151) | IGSGYESSA YSTWLDP (152) | 2-14 | EGDTIGSK SVH (153) | NDRDRPS (154) | QVWESG GDQTV (155) |
| CR8050 | 4-34 | DHYWS (156) | EVVHSGDTNYTP SLRN (157) | GRNVAVVG AIQRHYDY (158) | A27 | RASQSVSR NYLA (159) | GASSRAT (160) | QHYGSVL VA (161) |
| CR8052 | 4-61 | SGTYYS (162) | DISYSGSTNYNPS LKS (163) | AMAAYNY DRGGYNDY YYMDV (164) | O12 | RASQGINT YLN (165) | AASTLQS (166) | QQSYSTA IT (167) |
| CR8055 | 3-33 | TYGMH (168) | FIWYDGSNKHY QDSVKG (169) | DGGYSTWE WYFDL (170) | A26 | RASRSIGS DLH (171) | FASQSMS (172) | HQSSSLP LT (137) |
| CR8057 | 3-53 | VIFMS (173) | IYIDDSTYYADS VKG (174) | ESGDFGDQ TGPYHYA MDV (175) | 2-14 | TGSSGDIG GYNAVS (176) | EVTSRPS (177) | CSFADSN LI (178) |
| CR8069 | 3-43 | DYTMH (179) | LISWDGGMSNY ADSVKG (180) | DIRPRMPAR HFMDV (181) | L2 | RASQNVN YNLA (182) | VASTRAT (183) | QQYNNW PPAIT (184) |

Tabela 10. Os dados dos IgGs específicos de HA. SEQ ID NO's do nucleotídeo e sequências de aminoácido das regiões variáveis das cadeias pesadas e leves

| Nome IgG | SEQ ID NO da região variável de cadeia pesada de sequência de nucleotídeo | SEQ ID NO da região variável de cadeia pesada de sequência de aminoácido | SEQ ID NO da região variável de cadeia leve de sequência de nucleotídeo | SEQ ID NO da região variável de cadeia leve de sequência de aminoácido |
|----------|---|--|---|--|
| CR8001 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| CR8003 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| CR8015 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| CR8016 | 13 | 14 | 15 | 16 |

| Nome IgG | SEQ ID NO da região variável de cadeia pesada de sequência de nucleotídeo | SEQ ID NO da região variável de cadeia pesada de sequência de aminoácido | SEQ ID NO da região variável de cadeia leve de sequência de nucleotídeo | SEQ ID NO da região variável de cadeia leve de sequência de aminoácido |
|----------|---|--|---|--|
| CR8017 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| CR8018 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| CR8019 | 25 | 26 | 27 | 28 |
| CR8020 | 29 | 30 | 31 | 32 |
| CR8021 | 33 | 34 | 35 | 36 |
| CR8038 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| CR8039 | 41 | 42 | 43 | 44 |
| CR8040 | 45 | 46 | 47 | 48 |
| CR8041 | 49 | 50 | 51 | 52 |
| CR8043 | 53 | 54 | 55 | 56 |
| CR8049 | 57 | 58 | 59 | 60 |
| CR8050 | 61 | 62 | 63 | 64 |
| CR8052 | 65 | 66 | 67 | 68 |
| CR8055 | 69 | 70 | 71 | 72 |
| CR8057 | 73 | 74 | 75 | 76 |
| CR8069 | 77 | 78 | 79 | 80 |

Tabela 11: Neutralização in vitro de vírus influenza H3N2 por IgGs selecionados

| Titulador de neutralização SK50 (µg/ml) | |
|---|---------------------|
| IgG # | A/Wisconsin/67/2005 |
| CR8001 | 11,95 |
| CR8003 | 5,31 |
| CR8015 | 23,78 |
| CR8016 | 1,77 |
| CR8017 | 2,82 |
| CR8018 | 6,03 |
| CR8019 | 1,98 |
| CR8020 | 8,45 |
| CR8021 | 1,77 |
| CR8038 | 3,54 |
| CR8039 | 1,8 |
| CR8040 | >40 |
| CR8041 | 3,99 |
| CR8043 | 1,49 |
| CR8049 | 3,26 |
| CR8050 | 1,77 |
| CR8052 | >40 |
| CR8055 | 1,07 |
| CR8057 | 0,011 |
| CR8069 | ND |

Tabela 12: Reatividade de ligação cruzada de IgGs anti-H3N2. NCal.=A/New Caledonia/20/1999 (H1N1); Wisc.=A/Wisconsin/67/2005 (H3N2); NY.=A/New York/55/2004 (H3N2), Wyo.=A/Wyoming/3/2003 (H3N2); Neth.=A/Netherlands/219/2003 (H7N7); ND=não realizado.

| IgG # | Ligação de IgG Elisa (titulação) | | | | | Ligação de Facs, [IgG]=5µg/ml, MFI | | | |
|--------|----------------------------------|---------|-------|--------|---------|------------------------------------|-----|-----|-----|
| | H1 NCal. | H3 Wisc | H3 NY | H3 Wyo | H7 Neth | PerC6 | H1 | H3 | H7 |
| CR8001 | + | + | + | + | + | 4 | 100 | 763 | 106 |
| CR8003 | - | + | + | + | - | 3 | 3 | 657 | 5 |
| CR8015 | - | + | + | + | - | 3 | 4 | 600 | 4 |
| CR8016 | - | + | + | + | - | 3 | 3 | 840 | 5 |
| CR8017 | - | + | + | + | - | 3 | 3 | 558 | 4 |
| CR8018 | - | + | + | + | - | 3 | 3 | 348 | 4 |
| CR8019 | - | + | - | + | - | 3 | 4 | 685 | 6 |

| | | | | | | | | | |
|--------|---|---|---|---|-------|----|----|-----|-----|
| CR8020 | - | + | + | + | + | 4 | 3 | 657 | 140 |
| CR8021 | - | + | + | + | + | 4 | 4 | 678 | 4 |
| CR8038 | - | + | + | + | - | ND | ND | ND | ND |
| CR8039 | - | + | + | + | - | 4 | 4 | 503 | 4 |
| CR8040 | - | + | + | + | - | 4 | 5 | 446 | 4 |
| CR8041 | - | + | + | + | + | 4 | 4 | 364 | 120 |
| CR8043 | - | + | + | + | + | 4 | 4 | 646 | 11 |
| CR8049 | - | + | + | + | - | 3 | 3 | 542 | 4 |
| CR8050 | - | + | + | + | - | 6 | 8 | 282 | 6 |
| CR8052 | - | + | + | + | - | 4 | 4 | 364 | 5 |
| CR8055 | - | - | - | - | - | 21 | 31 | 433 | 26 |
| CR8057 | - | + | + | + | baixo | 7 | 8 | 943 | 15 |
| CR8069 | - | + | + | + | - | 4 | 6 | 447 | 5 |

Tabela 13: Atividade de neutralização cruzada anti-H3N2 IgGs; ND=não realizado

| IgG # | H1 | | | H3 | | | | | H7 | H10 |
|--------|-------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|------------------------|--------------------|-------------------------------|----------------------|
| | A/New Caledonia/20/1999 | A/Brisbane/59/1007 | A/Solomon islands/IVR-145 | A/Wisconsin/67/2005 | A/Hiroshima/52/2005 | A/Panama/2000/1999 | A/Johannesburg/33/1994 | A/Hong Kong/1/1968 | A/Mallard/Netherlands/12/2000 | A/Chick/Germany/N/49 |
| CR8001 | >40 | >40 | >40 | 11,95 | 13,02 | >40 | 6,51 | 7,07 | >40 | >40 |
| CR8003 | >40 | >40 | >40 | 5,31 | 4,27 | >40 | >40 | ND | >40 | >40 |
| CR8015 | >40 | >40 | >40 | 23,78 | 28,28 | >40 | >40 | ND | >40 | >40 |
| CR8016 | >40 | >40 | >40 | 1,77 | 8,84 | 28,28 | >40 | ND | >40 | >40 |
| CR8017 | >40 | >40 | >40 | 2,82 | 13,55 | >40 | >40 | ND | >40 | >40 |
| CR8018 | >40 | >40 | >40 | 6,03 | 8,45 | >40 | >40 | ND | >40 | >40 |
| CR8019 | >40 | >40 | >40 | 1,98 | 0,88 | >40 | 0,88 | ND | >40 | >40 |
| CR8020 | >40 | >40 | >40 | 8,45 | 11,95 | 7,74 | 7,07 | 1,77 | 0,028 | 17,68 |
| CR8021 | ND | >40 | >40 | 1,77 | 2,5 | >40 | 3,54 | 14,14 | >40 | >40 |
| CR8038 | ND | ND | ND | 3,54 | 7,07 | >40 | 5,95 | ND | >40 | >40 |
| CR8039 | >40 | >40 | >40 | 1,8 | 3,26 | 4,6 | 1,33 | 2,97 | >40 | >40 |
| CR8040 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | 6,77 | ND | >40 | >40 |
| CR8041 | >40 | >40 | >40 | 3,99 | 4,75 | 2,99 | 1,69 | 1,05 | 1,105 | 25 |
| CR8043 | >40 | >40 | >40 | 1,49 | 3,54 | 10,15 | 2,66 | 4,2 | >40 | 14,87 |
| CR8049 | >40 | >40 | >40 | 3,26 | 3,54 | >40 | >40 | ND | >40 | >40 |
| CR8050 | ND | ND | ND | 1,77 | ND | 6,5 | 1,49 | ND | >40 | >40 |
| CR8052 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | 21,89 | >40 | ND | >40 | >40 |
| CR8055 | >40 | >40 | >40 | 1,07 | 1,15 | >40 | 3,38 | ND | >40 | >40 |
| CR8057 | >40 | >40 | >40 | 0,011 | 0,0068 | 0,022 | 2,17 | 2,17 | >40 | >40 |
| CR8069 | >40 | >40 | >40 | ND | 3,54 | 11,89 | 3,54 | 11,89 | >40 | >40 |

Tabela 14: Conservação de sequência em torno da região de ligação do H3

mAbs CR8020, CR8041 e CR8043

| | Posição HA2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | N | Anos | Cepas Testadas | | | | | | | |
|-----------|-------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|------|----------------|----|----|----|-----|-----------|-----------|----|
| | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | | | | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 |
| Consensus | W | E | G | M | V | D | G | W | Y | G | F | R | H | D | N | S | E | G | T | G | Q | A | A | D | L | K | | | |
| Grupo_1 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 655 | 1972-2008 | Pa |
| Grupo_2 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 380 | 2004-2008 | Hs-Wi | |
| Grupo_3 | . | . | . | . | M | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 127 | 1999-2004 | | |
| Grupo_4 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 91 | 2007-2009 | | |
| Grupo_5 | . | . | . | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 69 | 1968-1997 | HK | |
| Grupo_6 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 10 | 2007 | | |
| Grupo_7 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 6 | 1999-2004 | | |
| Grupo_8 | . | . | . | . | M | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 4 | 2002-2007 | | |
| Grupo_9 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 3 | 2004 | | |
| Grupo_10 | . | . | . | . | K | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 3 | 1999 | | |
| Grupo_11 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 2 | 2009 | | |
| Grupo_12 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | Y | . | . | . | . | . | . | . | . | F | 2 | 2003-2004 | | |
| Grupo_13 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | F | 1 | 2006 | | |
| Grupo_14 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1 | 2007 | | |
| Grupo_15 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | X | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1 | 2007 | | |
| Grupo_16 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | Y | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1 | 2008 | | |
| Grupo_17 | . | . | . | . | . | . | . | . | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1 | 2003 | | |
| Grupo_18 | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1 | 2001 | | |
| Grupo_19 | . | . | . | . | . | N | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1 | 1999 | | |
| Grupo_20 | . | . | . | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1 | 1975 | | |
| Grupo_21 | . | . | . | . | M | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1 | 2008 | | |
| Grupo_22 | . | . | . | . | M | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1 | 2002 | | |
| Grupo_23 | K | . | . | . | . | . | R | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1 | 2002 | | |

Tabela 15: Tituladores de Neutralização em várias cepas de Influenza A

| IgG# | H1 | | | | | | | | H3 | | | | | | | | H7 | | | H10 | | | | | | |
|--------|----------------------------|-------|-------|------|-----|-----|------|-----|---------------------|-------|---------------------|------|--------------------|------|------------------------|-----|--------------------|-------|---------------|-----|----------------|-----|-------------------------------|-----|------|-------------------------|
| | 3 H1N1 strains (1999-2007) | | | | | | | | A/Wisconsin/67/2005 | | A/Hiroshima/52/2005 | | A/Panama/2000/1999 | | A/Johannesburg/33/1994 | | A/Hong Kong/1/1968 | | A/HK/1/68-M20 | | A/HK/1/68-M20c | | A/Mallard/Netherlands/12/2000 | | | A/Chick/NL/621557/03-ma |
| CR8001 | >40 | 11.9 | 13.0 | >40 | 6.5 | 7.1 | 5.26 | tbd | >40 | 39.8 | >40 | >40 | 2.5 | 27.6 | 6.6 | >40 | 38.0 | 258.0 | 37.2 | >40 | >40 | 6.6 | >40 | >40 | >250 | |
| CR8020 | >40 | 3.5 | 3.5 | 5.0 | 2.0 | 1.8 | 1.8 | 1.8 | >40 | 1.6 | 1.8 | 4.2 | 1.2 | 0.8 | 1.8 | 1.2 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | | | |
| CR8041 | >40 | 3.3 | 3.5 | 5.0 | 1.6 | 1.7 | 1.8 | 1.7 | >40 | 0.005 | 0.003 | 0.01 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | | | |
| CR8043 | >40 | 1.6 | 1.8 | 4.2 | 1.2 | 0.8 | 1.8 | 1.2 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | | | |
| CR8057 | >40 | 0.005 | 0.003 | 0.01 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | >40 | | | |

Todos os tituladores SK50 em ug/ml; cepas adaptadas de camundongo; cepa H7 Ma 'pandêmica'

Tabela 16. área média sob a curva da mudança de peso corporal da linha de base do dia 0.

| Estudo | Grupo | Média AUC (g*dia) | SD (g*dia) | p-valor ^a (mAb vs controle) | p-valor ^b |
|--------|-------------------|-------------------|------------|--|------------------------|
| 1 | 30 mg/kg controle | -82,86 | 14,15 | | |
| | 1 mg/kg CR8020 | -63,21 | 30,91 | 0,09 | |
| | 3 mg/kg CR8020 | 16,95 | 8,20 | <0,001 | <0,001 (1 vs 3 mg/kg) |
| | 10 mg/kg CR8020 | 31,44 | 9,09 | <0,001 | 0,454 (3 vs 10 mg/kg) |
| | 30 mg/kg CR8020 | 25,62 | 12,94 | <0,001 | ns |
| 2 | 30 mg/kg controle | -86,51 | 8,83 | | |
| | 1 mg/kg CR8041 | -68,26 | 11,41 | 0,004 | |
| | 3 mg/kg CR8041 | 19,51 | 13,82 | <0,001 | <0,001 (1 vs 3 mg/kg) |
| | 10 mg/kg CR8041 | 35,23 | 11,06 | <0,001 | 0,061 (3 vs 10 mg/kg) |
| | 30 mg/kg CR8041 | 28,21 | 7,89 | <0,001 | ns |
| | 1 mg/kg CR8043 | -66,19 | 8,74 | <0,001 | |
| | 3 mg/kg CR8043 | 8,48 | 11,81 | <0,001 | <0,001 (1 vs 3 mg/kg) |
| | 10 mg/kg CR8043 | 31,57 | 7,90 | <0,001 | <0,001 (3 vs 10 mg/kg) |
| | 30 mg/kg CR8043 | 27,72 | 6,61 | <0,001 | 0,997 (10 vs 30 mg/kg) |

^aValores AUC médios dos grupos de dose de mAb foram comparados com os grupos Ab de controle usando-se a análise de variação com o ajuste de Dunnett para comparações múltiplas.

^bValores AUC médios por concentração de anticorpo foram comparados para cada anticorpo usando-se a análise de variação com o ajuste de Tukey para comparações múltiplas.

ns= não estatisticamente significativa

Tabela 17. área média sob a curva de mudança de peso corporal da linha de base no dia 0.

| Grupo | Média AUC (g*dia) | SD (g*dia) | p-valor ^a |
|---------------------------|-------------------|------------|----------------------|
| 15 mg/kg CR8020 no dia -1 | 33,44 | 10,06 | <0,001 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 1 | 10,70 | 16,23 | <0,001 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 2 | -15,23 | 11,60 | <0,001 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 3 | -65,45 | 35,90 | 0,003 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 4 | -85,95 | 23,14 | 0,742 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 5 | -100,88 | 12,78 | 0,986 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 6 | -84,91 | 12,28 | 0,653 |
| O mAb controle no dia 1 | -95,76 | 11,55 | |

^aValores AUC médios dos grupos dosados com 15 mg/kg de mAb CR8020 foram comparados com o grupo de controle mAb usando-se a análise de variância com o ajuste de Dunnett para comparações múltiplas na análise pós-hoc. O tratamento profilático com 15 mg/kg de mAb CR8020 resultou em uma redução estatisticamente significativa na perda de peso em comparação com o grupo de controle ($p < 0,001$). O tratamento terapêutico no dia 1, dia 2 ou dia 3 com 15 mg/kg de mAb CR8020 também resultou em uma redução estatisticamente significativa na perda de peso em comparação com o grupo de controle ($p < 0,001$, $p < 0,001$ e $p = 0,003$, respectivamente). O tratamento no dia 4, dia 5 ou dia 6 com 15 mg/kg de mAb CR8020 não resultou em uma redução estatisticamente significativa na perda de peso em comparação com o grupo de controle ($p > 0,05$ para todos os três grupos).

5 Tabela 18 Registros clínicos médios.

O intervalo com diferença significativa entre os registros clínicos em comparação com o grupo de controle mAb são listados (por exemplo, entre 15 mg/kg no dia -1 e o grupo de controle a diferença nos registros clínicos é

significante do dia 4 em diante).

| Grupo | Relativo ao controle | |
|---------------------------|----------------------|---------|
| | Intervalo (dia(s)) | p |
| 15 mg/kg CR8020 no dia -1 | 4-21 | ≤0,001 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 1 | 2-21 | ≤0,001 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 2 | 3, 5-21 | ≤0,001 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 3 | 3, 5-21 | ≤ 0,012 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 4 | 3, 5-21 | ≤0,034 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 5 | 3 | ≤0,001 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 6 | 3 | ≤0,001 |

Tabela 19. Área média sob a curva de mudança de peso corporal a partir da linha de base no dia 0.

| Grupo | Média AUC (g*dia) | SD (g*dia) | p-valor ^a (mAb CR8020 vs controle) |
|----------------------|-------------------|------------|---|
| 30 mg/kg de controle | -93,06 | 10,88 | |
| 1 mg/kg CR8020 | -45,61 | 15,05 | <0,001 |
| 3 mg/kg CR8020 | -13,31 | 9,51 | <0,001 |
| 10 mg/kg CR8020 | -6,35 | 12,40 | <0,001 |
| 30 mg/kg CR8020 | -12,59 | 7,35 | <0,001 |

^aValores AUC médios dos grupos dosados com mAb CR8020 foram comparados com o grupo de controle de usando-se a análise de variância com o ajuste de Dunnet para comparações múltiplas na análise pós-hoc.

Tabela 20: Resumo das propriedades de ligação e neutralização de anticorpos monoclonais específicos para o vírus influenza HA.

| | H1 | H3 | | |
|--------|---------|-----|---------|-----|
| | Ligação | VNA | Ligação | VNA |
| CR6261 | + | + | - | - |
| CR6323 | + | + | - | - |
| CR8001 | + | - | + | + |
| CR8020 | - | - | + | + |
| CR8041 | - | - | + | + |
| CR8043 | - | - | + | + |

Tabela 21. Área média sob a curva de faixa de peso corporal da linha de base no dia 0.

| Grupo | Média AUC (g*dia) | SD (g*dia) | p-valor (mAb vs controle) ^a |
|----------------------|-------------------|------------|--|
| 30 mg/kg de controle | -101,38 | 11,67 | |
| 1 mg/kg CR8020 | -82,58 | 34,71 | 0,356 |
| 3 mg/kg CR8020 | -5,70 | 23,97 | <0,001 |
| 10 mg/kg CR8020 | 2,13 | 13,13 | <0,001 |
| 1 mg/kg CR8041 | -105,05 | 17,04 | 1 |
| 3 mg/kg CR8041 | -32,22 | 30,87 | <0,001 |
| 10 mg/kg CR8041 | -20,06 | 17,92 | <0,001 |
| 30 mg/kg CR8041 | -10,01 | 10,11 | <0,001 |
| 1 mg/kg CR8043 | -107,75 | 11,04 | 0,997 |
| 3 mg/kg CR8043 | -117,88 | 5,91 | 0,510 |
| 10 mg/kg CR8043 | -94,00 | 23,23 | 0,992 |
| 30 mg/kg CR8043 | -56,82 | 17,55 | <0,001 |

^aValores AUC médios dos grupos dosados com mAb CR8020 foram comparados com o grupo de controle mAb usando-se a análise de variação com o ajuste de Dunnet para comparações múltiplas na análise pós-hoc.

Tabela 22. Área média sob a curva de faixa de peso corporal da linha de base

no dia 0.

| Grupo | Média AUC (g*dia) | SD (g*dia) | p-valor (mAb vs controle) ^a |
|--------------------------------|-------------------|------------|--|
| 15 mg/kg CR8020 no dia -1 | -7,68 | 8,17 | < 0,001 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 1 | -20,43 | 8,41 | < 0,001 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 2 | -38,18 | 37,35 | < 0,001 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 3 | -28,27 | 9,63 | < 0,001 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 4 | -99,11 | 37,90 | 0,566 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 5 | -93,62 | 10,29 | 0,979 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 6 | -94,06 | 7,65 | 0,858 |
| Anticorpo de controle no dia 1 | -93,33 | 10,58 | |

^aValores AUC médios foram comparados usando-se o procedimento RobustReg (SAS) que aloca menos peso à parte.

Tabela 23. Registros clínicos médios.

| Grupo | Relative ao controle | |
|---------------------------|----------------------|---------|
| | Intervalo (dia(s)) | p |
| 15 mg/kg CR8020 no dia -1 | 4-21 | ≤0,001 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 1 | 2, 5-21 | ≤ 0,012 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 2 | 6-21 | ≤ 0,038 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 3 | 7-21 | ≤ 0,035 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 4 | 5, 6, 8-21 | ≤ 0,016 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 5 | 8 | <0,001 |
| 15 mg/kg CR8020 no dia 6 | - | ≥ 0,449 |

Tabela 24. cinética de ligação

| A/Wisconsin | | | |
|--------------------|------------|------------|---------|
| Fab | kon (1/Ms) | Kdis (1/s) | KD (nM) |
| CRF8020 | 2.03E+05 | 2.08E-03 | 11.2 |
| CRF8043 | 4.08E+05 | 9.86E-05 | 0.3 |
| A/Brisbane | | | |
| Fab | kon (1/Ms) | Kdis (1/s) | KD (nM) |
| CRF8020 | 1.81E+05 | 1.43E-03 | 8.9 |
| CRF8043 | 3.12E+05 | 8.69E-05 | 0.3 |

Sequência de nucleotídeo e aminoácido das regiões variáveis de cadeia leve e pesada:

>SC08-001 VH DNA (SEQ ID N°: 1)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCCTGATCCAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCGTCAGTAGCAACTACGTGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTCTCCTACTTATTTACACGGGTGGTACCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAC TCCAAGAATACGGTGTCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACGCGGCCATGTATTACTGTGCGAGAG TGTCAGCATTACGGTTTTTGCAGTGGCCAACTACGCATGGACGTC

>SC08-001 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 2)

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYVSWVRQAPGKGLEWLSLIYTGTTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVFLQMNLSRAEDAAMYCARVSALRFLQWPNYAMDV

>SC08-001 VL DNA (SEQ ID N°: 3)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACGGTCGATCACCATCTCCTGCTCTGGAA CCCGAGTGACGTTGGTGGTCATAATTATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAACTCAT GATTTATGAGGTCAGTCATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAGCACGGCC TCCCTGACCATCTCTGGCCTCCAGTCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCTTATACAGGTGAAGGCC CCCTAGGAGTG

>SC08-001 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 4)

QSALTQPASVSGSPGRSITISCSGTRSDVGGHNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSHRPSGVSNRFGSKSGSTA SLTISGLQSEDEADYYCSSYTGEGLPV

>SC08-003 VH DNA (SEQ ID N°: 5)
GAGGTGCAGCTGGTGGAGACCGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTCAGCCT
CTGAATTCAGCTTCAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGC
CAACATGAAGCAAGATGGAAGTGAGAAGTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGAC
AACGCCAAGAAGCTATTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
GGGGTTCCTGTGACGATTCTTGGACTGGTTGTTCATGATGCTTTTTCACATC

>SC08-003 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 6)
EVQLVETGGDLVQPGGSLRLSCSASEFSSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANMKQDGSEKYYVDSVKGRFTISR
NAKNSLYLQMNLSRGEDTAVYYCARGSCDDSWTGCHDAFDI

>SC08-003 VL DNA (SEQ ID N°: 7)
GTGTTGACGCAGCCGCCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTGCCTGTGGGGGAAACAACA
TTGGGAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCTGCTATGATGATAG
CGCCCGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAATTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGC
AGGGTCGAGGCCGGGGATGAAGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGAGAGTGGTAGTGATCTACGACTGCTT

>SC08-003 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 8)
VLTQPPSVSVAPGQTARIACGGNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS
RVEAGDEADYYCQVWESGSDLRL

>SC08-015 VH DNA (SEQ ID N°: 9)
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTCAGCCT
CTGAATTCAGCTTCAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGC
CAACATGAAGCAAGATGGAAGTGAGAAGTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGAC
AACGCCAAGAAGCTATTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
GGGGTTCCTGTGACGATTCTTGGACTGGTTGTTCATGATGCTTTTTCACATC

>SC08-015 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 10)
QVQLQESGGDLVQPGGSLRLSCSASEFSSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANMKQDGSEKYYVDSVKGRFTISR
NAKNSLYLQMNLSRGEDTAVYYCARGSCDDSWTGCHDAFDI

>SC08-015 VL DNA (SEQ ID N°: 11)
GTGTTGACGCAGCCGCCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAAGATTACCTGTGGGGGAGACAACA
TTGGAAGAAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCCTGGCCCTGTGCTGGTCTCAATGATAATAG
CGACCCGCCCTCAGGGATCCCTGCGCGATTCTCTGGCTCCAATTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGC
AGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGGTAGTAGTCTGACCATATATGTC

>SC08-015 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 12)
VLTQPPSVSVAPGQTAKITCGGDNIGRKSVDHWYQQKPLAPVLLVNDSDRPSGIPARFSGSNSGNTATLTIS
RVEAGDEADYYCHVWGSSRDHYV

>SC08-016 VH DNA (SEQ ID N°: 13)
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTCAGCCT
CTGAATTCAGCTTCAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGC
CAACATGAAGCAAGATGGAAGTGAGAAGTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGAC
AACGCCAAGAAGCTATTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
GGGGTTCCTGTGACGATTCTTGGACTGGTTGTTCATGATGCTTTTTCACATC

>SC08-016 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 14)
EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCSASEFSSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANMKQDGSEKYYVDSVKGRFTISR
NAKNSLYLQMNLSRGEDTAVYYCARGSCDDSWTGCHDAFDI

>SC08-016 VL DNA (SEQ ID N°: 15)
CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTGCACTGGGA
GCAGCTCCAACATCGGGGAGGTTATGATGTACACTGGTACCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCAACTCCT
CATCTATGGTAACAACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGATCCAGGTCTGGCCCTTTAGCC
CTCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCATGACAGCAGCCTGA
GTGTTTATGTC

>SC08-016 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 16)
QSVVTPPPSVSGAPQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNNRPSGVPDRFSGSRSGPLA
LLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLVYV

>SC08-017 VH DNA (SEQ ID N°: 17)
GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTCAGCCT
CTGAATTCAGCTTCAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGC
CAACATGAAGCAAGATGGAAGTGAGAAGTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGAC
AACGCCAAGAAGCTATTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
GGGGTTCCTGTGACGATTCTTGGACTGGTTGTTCATGATGCTTTTTCACATC

>SC08-017 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 18)
EVQLVETGGDLVQPGGSLRLSCSASEFSSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANMKQDGSEKYYVDSVKGRFTISR
NAKNSLYLQMNLSRGEDTAVYYCARGSCDDSWTGCHDAFDI

>SC08-017 VL DNA (SEQ ID N°: 19)
TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAG

ACACGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTTCATCTATGC
TAAAACCAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACTGCTTCCTTGACC
ATCACTGGGGCTCAGGCGGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCCCGGGACAGCAGTGGTAACCATGTGG
TA

>SC08-017 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 20)

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYAKTNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLT
ITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHV

>SC08-018 VH DNA (SEQ ID N°: 21)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTCAGCCT
CTGAATTCAGCTTCACTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGC
CAACATGAAGCAAGATGGAAGTGAGAAGTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGAC
AACGCCAAGAACTCATTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
GGGGTTCCTGTGACGATTCTTGGACTGGTTGTCATGATGCTTTTGATATC

>SC08-018 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 22)

EVQLVETGGDLVQPGGSLRLSCSASEFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANMKQDGSEKYYVDSVKGRFTISR
NAKNSLYLQMNLSRGEDTAVYYCARGSCDDSWTGCHDAFDI

>SC08-018 VL DNA (SEQ ID N°: 23)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACCTGGAA
CCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCAT
GATTTATGAGGTCACTCATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAGCACGGCC
TCCCTGACCATCTCTGGCCTCCAGTCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCTTATACAGGTGAAGGCC
CCCTAGGAGTG

>SC08-018 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 24)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSHRPSGVSNRFSGSKSGSTA
SLTISGLQSEDEADYYCSSYTGEGLGV

>SC08-019 VH DNA (SEQ ID N°: 25)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGGAGCCT
CTGGAATCAGCGTTAGCACTTCTGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTC
AGGTATTAGTGGTAGTGGTGTACACATACTACGCAGGCTCCGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAGAGAC
AAATCCAAGAACACACTGCATCTGCAAATGAGCAGACTGAGAGCCGAGGACACGGCCATTTACTACTGTGCGA
AAGATACCTCCTTGTGAGTATGATACAAGTGGTTTTACGGCTCCCGCAATGCTTTTGATATC

>SC08-019 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 26)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGASGISVSTSAWSWVRQVPGKGLEWVSGISGSGATTYYAGSVKGRFTISR
KSKNTLHLQMSRLRAEDTAIYYCAKDTSLFEYDTSFGFTAPGNAFDI

>SC08-019 VL DNA (SEQ ID N°: 27)

GACATCCAGWTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGATGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG
CAAGTCAGAGCATTAGCGGCTATTTAAATTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAGCCCCAACCTCCTGATCTA
TGGTGCATCCACTTTGCAGAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
ACCATCACCAGTCTGCAACCTGAAGACTATGCAACTTACTACTGTCAACAGACTTACACCTCCCCTCCGTACG
CT

>SC08-019 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 28)

DIQXTQSPSSLSASVDDRVTITCRASQISIGYLNWYQQKPGKAPNLLIYGASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TITSLQPEDYATYYCQQTYSPPYA

>SC08-020 VH DNA (SEQ ID N°: 29)

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAAGAGCTGAGGTGAAGACCCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCT
CTGGATACACCTTTACCAGGTTTGGTGTCACTGATACGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGGAGTGGATTGG
ATGGATCAGCGCTTACAATGGTACACATACTATGCACAGAAGTTCAGGCCAGAGTCACCATGACCACAGAC
ACATCCACGACCACAGCCTACATGGAGATGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA
GAGAACCCCCCTTTTTTACAGCAGCTGGTCTCTTGACAAC

>SC08-020 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 30)

QVQLQQSGAEVKTTPGASVKVSKASGYTFTRFGVSWIRQAPGQGLEWIGWISAYNGDTYYAQKQARVMTT
TSTTTAYMEMRSLRSDDTAVYYCAREPPLFYSSWSLDN

>SC08-020 VL DNA (SEQ ID N°: 31)

GAAATTGTGWTGACRCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG
CCAGTCAGAGTGTAGCATGAACTACTTAGCCTGGTTCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT
CTATGGTGGTCCCAGGGCCACTGGCATCCCCGACAGGATCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT
CTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGCAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACAGTATGGTACCTCACCTCGGA
CG

>SC08-020 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 32)

EIVXTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSMNYLAWFQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRISGSGSGTDF
LTISRLEPADFAVYYCQYGTSPRT

>SC08-021 VH DNA (SEQ ID N°: 33)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGATACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT

CTGGATTACCTTTAGCGCCTATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC
AGCTATTGGTGGTAGTGGCGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGAC
AACTCCAAGAAGATCCTGTATCTGCAAATGAACGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCATATATTACTGTGCGA
AAGCCCGGATTGGACTGGGGTTACTTCTTTGACTCC
>SC08-021 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 34)
EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSAYAMNWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
NSKKILYLQMNLRAEDTAIYYCAKGRDWTGGYFFDS
>SC08-021 VL DNA (SEQ ID N°: 35)
GACATCCAGWTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGT
CCAGCCAGAGTATTTTCTACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAACTTGGTACCAGCAGAAAACCAGGACAGCC
TCCTAAGCTGCTCATTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGAGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATACT
ATAGTATTCCCTACACT
>SC08-021 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 36)
DIQXTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFYSSNNKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS
GTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSIPYT
>SC08-038 VH DNA (SEQ ID N°: 37)
GAGGTGCAGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGATTGCCTTTAGCGGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC
AGATATTGGTGGTAGTGGTGGTGGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGAC
AATGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGA
AAAGCAGTAGCTGGGACCGGCCTACTTCTTTGACTCC
>SC08-038 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 38)
VQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAPSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSDIGSGGGTYADSVKGRFTISRDN
AKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKSSSWDRAYFFDS
>SC08-038 VL DNA (SEQ ID N°: 39)
GATATTGTGATGACCCAGACTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGT
CCAGCCAGAGTGTTFATACAGCTCCATCCATAAGAACTACTTAGCCTGGTACCAGCAAAAACCAGGACAGCC
TCCTAAGCTGCTCATTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATT
ATAGATCTCCTCCAACACT
>SC08-038 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 40)
DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSIHKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS
GTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYRSPT
>SC08-039 VH DNA (SEQ ID N°: 41)
CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACGTGCACTGTCT
CTGGCGGCTCCATCGGTAGTTACTACTGGAGCTGGATACGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGG
ATATATCTATTACCGTGGGGGTACCAGTTACAACCCCTCCCTCAAGAGTGCAGTACCATATCAGTCGACACG
TCCAAGAGCCAGTTCACCTTGAAGCTGAACTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAA
AGGACTGGGGATCAGCGGCCCGAAGTGTCTGGTACTTTCGATCTC
>SC08-039 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 42)
QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIGSYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYRGGTSYNPSLKSRTISVDT
SKSQFTLKLNSVTAADTAVYYCARKDWGSAAGSVWYFDL
>SC08-039 VL DNA (SEQ ID N°: 43)
CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGTCTCCTGGACAGTCACTCACCATCTCCTGCACTGGAA
CCAGCAGTGCAGTGGTGGTTATAATTATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCAT
GATTCGTGAGGTGAGTAAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGTTCCAAGTCTGGCAACACGGCC
TCCCTGACCGTCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGAATACTACTGCAGCTCGTATGCAGGACAGCAACA
ATCTGATA
>SC08-039 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 44)
QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIREVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTA
SLTVSGLQAEDAEEYCYSSYAGSNLI
>SC08-040 VH DNA (SEQ ID N°: 45)
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAAGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGT
CTGGATTGCTTTTCACTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGAC
CTTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAACACTATGCAGACTCCATGAAGGGCCGATTTCACCATCTCCAGAGAC
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGA
GAGATGGGGGATATAGCACCTGGGAATGGTACTTCGATCTC
>SC08-040 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 46)
EVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFAPSSYGMHWVRQAPGKLEWVTFIWDGNSKNHYADSMKGRFTISRDN
NSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDGGYSTWEWYFDL
>SC08-040 VL DNA (SEQ ID N°: 47)
GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCGGACTTTTCACTGTGACTCCAAAGGAGAGAGTACCATCACCTGCCGGG

CCAGTCAGGGCATTGGCAGTAACTTACTGTTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAAAGCTCCTCATCAA
GTATGCTTCCAGTCCATCACAGGGGTCCCCTCGAGGTTCACTGGCAGGGGATCTGGGACAGATTTACCCTC
ACCATCAATAGCCTGGAAGTTGAAGATGCTGCAGTGTATTACTGTCATCAGAGTAGTAGTTTACCCTCACT
>SC08-040 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 48)
EIVLTQSPDFQSVTPKERVTITCRASQIGSNLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSITGVPSRFSRSGSGTDFTL
TINSLEVEDAAVYYCHQSSSLPLT
>SC08-041 VH DNA (SEQ ID N°: 49)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCCAGGCTT
CGGGTTACACCTTTACCTCCTTTGGTCTCAGTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCCTGAGTGGATGGG
ATGGATCAGCGCTTACAATGTTGAAATAAAGTATGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCTCCATGACCACAGAC
ACATCAACGAGGACAGCCTACATGGAGGTGCGGAGCCTCAGACCTGACGACACGGCCGTATACTACTGTGCGA
GAGAGCCCCCTGTATTTCACTAGCTGGTCTCTCGACTTC
>SC08-041 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 50)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYTFTSFGLSWVRQAPGQGPPEWMGWISAYNGEIKYAQKFQGRVSMTTD
TSTRAYMEVRSRPPDDTAVYYCAREPPLYFSSWSLDF
>SC08-041 VL DNA (SEQ ID N°: 51)
GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCCTGCAGGG
CCAGTCAGAGTGTAGCAGCAACTACTTAGCTGGTTCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT
CTATGGTGCATCAAGGAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT
CTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGATAGCTCACCTCGGA
CG
>SC08-041 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 52)
EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWFQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTL
LTISRLEPEDFAVYYCQQYDSSPRT
>SC08-043 VH DNA (SEQ ID N°: 53)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGCTTCTCCTGCAAGGCTT
CTGGATACACCTTCACTGCCTATTCTATGCATTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACAAAGCCTTGAGTGGTTGGG
ATGGATCAACACTGCCATCGGTAACACACAATATTACAGAAAGTTCAGGACAGAGTCACCATTACCAGGGAC
ACATCTGCGCGCACATCGTACATGGAAGTGCAGCCTGAGATCTGGAGACACGGCTGTCTATTTCTGTGCGA
GAGGGGCTCTTGGGACGCCCCTGGGTGGTCTGGCTAC
>SC08-043 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 54)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTAYSMDHWVRQAPGQSLEWLGWINTAIGNTQYSQKFDQDRVTITRD
TSARTSYMELSSLRSGDTAVYFCARGASWDARGWSGY
>SC08-043 VL DNA (SEQ ID N°: 55)
GACATCCAGWTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGT
CCAGCCAGAGTGTTTTTTCCAGCTCCACCAATAAGAAGTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCC
TCCTAAGGTGCTAATTTACTGGTCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCACTGCCAGCGGGTCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGCAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCACCAATATT
ATACTGCTCCGTGGACG
>SC08-043 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 56)
DIQXTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFSSSTNKNYLAWYQQKPGQPPKVLIIYWSSTRESGVPDRFSASGS
GTDFTLTISSLQAAADVAVYYCHQYYTAPWT
>SC08-049 VH DNA (SEQ ID N°: 57)
CAGGTACCTTGAAGGAGTCTGGTCTGTACTGGTGAAGCCCAAAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCGTCT
CTGGGTTCTCACTCAGCAACTAGAAATGGGTGTGAGTTGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAAGCCCTGGAGTG
GCTTGCACACATCTTTTCGAACGACGAAACATCCTACAGGACATCTCTGAAGAGGAGGCTCACCATCTCCAG
GACATCTCCAAAAGTCAGGTGGTCTTTCTATGACCAACGTGGACCCTGCAGACACAGCCACATATTTTGTG
CACGGATCGGGTCTGGCTATGAGAGTAGTGCTTACTCCACCTGGCTCGACCCC
>SC08-049 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 58)
QVTLKESGPNLVKPKETLTLTCTVSGFSLNTRMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDETSYRSLKRRRLTISQ
DISKSQVVLSTNVDPADTATYFCARIGSGYESSAYSTWLDL
>SC08-049 VL DNA (SEQ ID N°: 59)
CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTGAGTGGCCCCAGGGCAGACGGCCAGGCTCACCTGTGAGGGAG
ACACAATTGGCAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAGGCCAGGCCAGGCCCTGTGTTGGTCTGCTATAA
TGATCGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGCGCACGGCCACCCTGACC
ATCAGCAGGGTCAAGCCGGGGATGAGGCCACTATTTCTGTGAGGTGTGGGAGAGTGGAGGTGATCAGACTG
TC
>SC08-049 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 60)
QSVLTQPPSVSVAPGQTARLTCEGDTIGSKSVHWYQQRPQAPVLVYVYNDRDRPSGIPERFSGSNSGRATLTL
ISRVEAGDEADYFCQVWESGGDQTV
>SC08-050 VH DNA (SEQ ID N°: 61)
CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTATTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTGT
ATGGTGGGTGCTTCACTGATCACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGTCCCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGATTGG

TGAAGTCGTTTCATAGTGGAGACACCAACTACACCCCGTCCCTCAGAAATCGAGTTTCCATATCGGTGCGACTCG
TCCAAGAATCAGTTCTCCCTGAGGCTGGGGTCTGTGACCGCCGCGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGAG
GCAGGAATGTTGCGGTAGTTGGTGTCTATTAGAGGCACACTATGACTAC

>SC08-050 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 62)

QVQLQQWAGALLKPKSETLSLTCVAVYGGSTFDHYWSWIRQSPGKGLEWIGEVVHSGDNTYTPSLRNRVSVSDS
SKNQFSLRLGSLVTAADTAVYYCARGRNVAVVGAIQRHVDY

>SC08-050 VL DNA (SEQ ID N°: 63)

GAAATTTGTGATGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG
CCAGTCAGAGTGTAGCAGAACTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCTGGCTCCCAGGCTCCTCAT
CTCTGGTGCATCGAGCAGGGCCACTGGCGTCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGGGGGTCTGACACAGACTTCACT
CTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCCTGTATTACTGTGACACTATGGTTCGGTCTTGTAG
CT

>SC08-050 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 64)

EIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSRNYLAWYQQKPKGLAPRLLISGASSRATGVPDRFSGRSDTDFL
LTISRLEPEDFAVYYCQHYGSLVA

>SC08-052 VH DNA (SEQ ID N°: 65)

CAGGTGCAGTGCAGGAGTCCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCAGTGTCT
CTGGTGGTCCCGTCCAGTGGTACTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTG
GATTGGGGATATCTCTTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATTTCTAGA
GACACGTCCAAGAACCTGGTCTCCCTGAAGCTGACCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGCATTACTGTG
CGAGAGCGATGGCGCTTATAATTATGACAGGGTGGTTATAACGACTACTACTACATGGACGTC

>SC08-052 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 66)

QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCVSGGSVSSGTYYSWIRQPPGKGLEWIGDISYSGSTNYNPSLKRVTISR
DTSKNLVLKLTSTVTAADTAVHYCARAMAAYNYDRGGYNDYYMDV

>SC08-052 VL DNA (SEQ ID N°: 67)

GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGCGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG
CAAGTCAGGGCATTAAACCTATTTAAATTTGGTATCAGCAAAAACCAGGGGAGGGCCCTAAGGTCCTGATCTT
TGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGAGTCCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGGTCTTGGGACAGAAATCACTCTC
AACATCAACAATCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACTGCGATCACT

>SC08-052 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 68)

DIQLTQSPSSLSASVGRVITICRASQGINTYLNWYQQKPKKPKVLIFAASTLQSGVPSRFRSGSGSGETFTL
NINNLQPEDFATYYCQSYSTAIT

>SC08-055 VH DNA (SEQ ID N°: 69)

GAGGTGCAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCGGCGT
CTGGATTACAGCTTACCACCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
CTTTATTTGGTATGATGGAAGTAACAAACTATCAAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAGGAC
AATTCCAACAACATGTTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGTCGCCGACACGGCTGTTTATTACTGTGTGA
GAGATGGGGGATATAGCACCTGGGAATGGTACTTCGATCTC

>SC08-055 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 70)

EVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFSFTTYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIWDGNSNKHYQDSVKGRFTISKD
NSNNMLYLQMDSLRVADTAVYYCVRDGGYSTWEWYFDL

>SC08-055 VL DNA (SEQ ID N°: 71)

GAAATTTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTTCAAGTCTGTGGCTCCAAAGGAGAAAAGTCACCATCACCTGCCGGG
CCAGTCGGAGCATTGGTAGTGACTTGCAGTGGTTTCCAGCAGAGGCCAGATCAGTCTCAAAGCTCCTCATCAA
GTTTGTCTCCAGTCCATGTGAGGGTCCCCTCGAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGAGAGATTTACCCTC
ACCATCAGTAGCCTGGAGGCTGAAGATGCTGCTACGTATTACTGTGATCAGAGTAGTAGTTTACCGCTCACT

>SC08-055 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 72)

EIVLTQSPDFQSVAPKEKVTITCRASRSIGSDLHWFQQRPDQSPKLLIKFASQSMGVPVSRFRSGSGSRDFTL
TISSLEAEDAATYYCHQSSSLPLT

>SC08-057 VH DNA (SEQ ID N°: 73)

GAGGTGCAGTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTCCAACCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTGTGACGCTC
CTGGGTTACCGACAGTGTGATCTTTCATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGTGTCTC
AATTATTTATATCGATGATTCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGACACAAT
TCCATGGGCACAGTGTCTTCTTGAATGAACAGCCTGAGACCTGACGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGACAG
AGAGCGGAGACTTTGGTGACCAACGGGTCCCTATCATTACTACGCTATGGACGTC

>SC08-057 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 74)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTDSVIFMSWVRQAPGKGLECVSIIYIDSTYYADSVKGRFTISRHN
SMGTVFLEMNLRPDDTAVYYCATESGDFGDTGPHYHYAMDV

>SC08-057 VL DNA (SEQ ID N°: 75)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTGCATCACCATCTCCTGCAGTGGAA
GCAGCGGTGACATTTGGTGGTTATAACGCTGTCTCCTGGTACCAACACCACCCAGGCAAAGCCCCAAACTGAT
GATTTATGAGGTCAGTACGCGCCCTCAGGGGTTTCCGATCGCTTCTCTGCGTCCAGGTCTGGCGACACGGCC
TCCCTGACTGTCTCTGGTCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTCACTATTACTGCTGCTCATTTCAGACAGCAACA

TTTTGATT

>SC08-057 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 76)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSGDIGGYNAVSWYQHHPGKAPKLMYEVTSRPSGVSDRFSASRSGDTA
SLTVSGLQAEDEAHYYCCSFADSNILI

>SC08-069 VH DNA (SEQ ID N°: 77)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGTCGTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGCTTACGTTTGGAGATTATACCATGCACTGGGTCCGTCAGTTCGGGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCCG
GCTCATTAGTTGGGATGGCGGTATGTCAAACATGCACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC
AACAGCAAAAACCTCTCTGTATCTGCAAGTGAGCAGTCTGAGAAGTGAAGACACCGCCCTGTATTACTGTGCAA
AAGATATACGACCCCGTATGCCAGCTCGTCACTTTATGGACGTC

>SC08-069 VH PROTEÍNA (SEQ ID N°: 78)

EVQLVETGGVVVQPGGSLRLSACAASGFTFEDYTMHWVRQVPGKLEWVALISWDGGMNSNYADSVKGRFTISR
NSKNSLYLQVSSLRSEDTALYYCAKDIRPRMPARHFMDV

>SC08-069 VL DNA (SEQ ID N°: 79)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG
CCAGTCAGAATGTCAACTACAACCTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTA
TGTTCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGACAGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACCTCTC
ACCATCAGCAGTCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCGGCGA
TCACT

>SC08-069 VL PROTEÍNA (SEQ ID N°: 80)

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQNVNINLAWYQQKPGQAPRLLIYVASTRATGIPDRFSGSGSGTEFTL
TISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPAIT

>CR6261 HC DNA (SEQ ID N°: 185)

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| gaggtgcagc | tggtggagtc | tggggctgag | gtgaagaagc | ctgggtcctc | ggtgaaagtc | 60 |
| tcttgcaagg | cttctggagg | ccccttccgc | agctatgcta | tcagctgggt | gcgacaggcc | 120 |
| cctggacaag | ggcctgagtg | gatgggaggg | atcatcccta | tttttggtag | aacaaaatac | 180 |
| gcaccgaagt | tccagggcag | agtcacgatt | accgcggacg | atttcgcggg | cacagtttac | 240 |
| atggagctga | gcagcctgcg | atctgaggac | acggccatgt | actactgtgc | gaaacatatg | 300 |
| gggtaccagg | tgcgcgaaac | tatggacgtc | tggggcaaaag | ggaccacggt | caccgtctcg | 360 |
| agtgctagca | ccaagggccc | cagcgtgttc | cccctggccc | ccagcagcaa | gagcaccagc | 420 |
| ggcggcacag | ccgcccctggg | ctgcctggtg | aaggactact | tccccgagcc | cgtgaccgtg | 480 |
| agctggaaca | gcggcgcctt | gaccagcggc | gtgcacacct | tccccgcctg | gctgcagagc | 540 |
| agcggcctgt | acagcctgag | cagcgtggtg | accgtgcccc | gcagcagcct | gggcaccagc | 600 |
| acctacatct | gcaacgtgaa | ccacaagccc | agcaaacacca | aggtggacaa | acgcgtggag | 660 |
| cccaagagct | gcgacaagac | ccacacctgc | ccccctgcc | ctgcccccca | gctgctgggc | 720 |
| ggaccctccg | tgttctgtt | ccccccaag | cccaaggaca | ccctcatgat | cagccggacc | 780 |
| cccgaggtga | cctgcgtggt | ggtggacgtg | agccaagagg | acccccgaggt | gaagttcaac | 840 |
| tggtacgtgg | acggcgtgga | ggtgcacaac | gccaagacca | agccccggga | ggagcagtac | 900 |
| aacagcacct | accgggtggt | gagcgtgctc | accgtgctgc | accaggactg | gctgaacggc | 960 |
| aaggagtaca | agtgcaaggt | gagcaacaag | gcctgacctg | cccccatcga | gaagaccatc | 1020 |
| agcaaggcca | agggccagcc | ccgggagccc | caggtgtaca | ccctgcccc | cagccgggag | 1080 |
| gagatgacca | agaaccaggt | gtccctcacc | tgtctggtga | agggcttcta | ccccagcgac | 1140 |
| atgcocgtgg | agtgggagag | caacggccag | cccgagaaca | actacaagac | cacccccctt | 1200 |
| gtgctggaca | gcgacggcag | cttcttctctg | tacagcaagc | tcaccgtgga | caagagccgg | 1260 |
| tggcagcagg | gcaacgtggt | cagctgcagc | gtgctgcagc | aggccctgca | caaccactac | 1320 |
| accagaaga | gcctgagcct | gagccccggc | aag | | | 1353 |

>CR6261 HC PROTEÍNA (SEQ ID N°: 186)

E V Q L V E S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G P F R S Y A I S W V
R Q A P G Q G P E W M G G I I P I F G T T K Y A P K F Q G R V T I T A D D
F A G T V Y M E L S S L R S E D T A M Y Y C A K H M G Y Q V R E T M D V W
G K G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C
L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S
L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K
S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R
T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R
E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P
A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T
C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S
F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
L S L S P G K

>CR6261 LC DNA (SEQ ID N°: 187)

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| cagctctgtgt | tgacgcagcc | gccctcagtg | tctgcgcccc | caggacagaa | ggtcaccatc | 60 |
| tcctgctctg | gaagcagctc | caacattggg | aatgattatg | tatcctggta | ccagcagctc | 120 |

```

ccaggaacag cccccaaact cctcattttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg agggcaacta ttactgocga acatgggatc gccgcccgac tgcttatgtt 300
gtcttcggcg gagggaacaa gctgaccgtc ctagggtcgg cgcgaggcca gcccaaggcc 360
gctcccagcg tgaccctggt cccccctcc tccgaggagc tgcaggccaa caaggccacc 420
ctggtgtgcc tcatcagcga cttctaccct ggcgccgtga ccgtggcctg gaaggccgac 480
agcagccccg tgaaggccgg cgtggagacc accacccccca gcaagcagag caacaacaag 540
tacgccgcca gcagctacct gagcctcacc cccgagcagt ggaagagcca ccggagctac 600
agctgccagg tgaccacaga gggcagcacc gtggagaaga ccgtggcccc caccgagtgc 660
agc 663

```

>CR6261 LC PROTEÍNA (SEQ ID N°: 188)

```

Q S V L T Q P P S V S A A P G Q K V T I S C S G S S S N I G N D Y V S W Y
Q Q L P G T A P K L L I Y D N N K R P S G I P D R F S G S K S G T S A T L
G I T G L Q T G D E A N Y Y C A T W D R R P T A Y V V F G G G T K L T V L
G A A A G Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F
Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S
Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S

```

Vector pIg-C911-HCgamma1 (SEQ ID N°: 190)

```

tcgacggatc gggagatctc ccgatccccct atgggtgcaact ctcagtacaa tctgctctga 60
tgccgcatag ttaagccagt atctgctccc tgcttgtgtg ttggaggctc ctgagtagtg 120
cgcgagcaaa atttaagcta caacaaggca aggcttgacc gacaattgca tgaagaatct 180
gcttaggggtt aggcgttttg cgctgcttcg ctagggtggtc aatattggcc attagccata 240
ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca tacgttgtat 300
ccatatcata atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa cattaccgcc atgttgacat 360
tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat 420
atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac 480
ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc 540
cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg 600
tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgctggcat 660
tatgccagat acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 720
atcgctatta ccattggtgat gcggttttgc cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt 780
gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 840
caaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg ccccatggac gcaaatggc 900
ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc 960
gcctggagac gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccggga ccgatccagc 1020
ctccgcggcc gggaaacggtg cattggaagc tggcctggat atcctgactc tcttaggtag 1080
ccttgacaga gttggtcgtg aggcactggg caggtaagta tcaaggttac aagacaggtt 1140
taaggagatc aatagaaact gggcttgcg agacagagaa gactcttgcg tttctgatag 1200
gcacctattg gtcttactga catccacttt gcctttctct ccacaggtgt cactcccag 1260
ttcaattaca gctcgcacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtactgctgc 1320
tggcccagcc ggccagtgac cttgaccggt gcaccacttt tgatgatggt caagctccta 1380
attacactca acatacttca tctatgaggg gggtttacta tcctgatgaa atttttagat 1440
cggacactct ttatttaact caggattttat ttcttccatt ttatttcaat gttacaggtt 1500
ttcatactat taatcatacg tttggcaacc ctgtcatacc ttttaaggat ggtattttatt 1560
ttgctgccac agagaaatca aatgttgtcc gtggttgggt ttttggttct accatgaaca 1620
acaagtcaac gtcggtgatt attattaaca atttactaa tgttggtata cgagcatgta 1680
actttgaatt gtgtgacaac cctttctttg ctgtttctaa accatgggt acacagacac 1740
atactatgat attcgataat gcatttaatt gcactttoga gtacatatct gatgcctttt 1800
cgcttgatgt ttcagaaaag tcaggtaatt taaacactt acgagagttt gtgtttaaaa 1860
ataaagatgg gtttctctat gtttataagg gctatcaacc tatagatgta gttcgtgatc 1920
taccttctgg ttttaacact ttgaaacctt tttttaagtt gcctcttggg attaacatta 1980
caaattttag agccattctt acagcctttt cacctgctca agacatttgg ggcacgtcag 2040
ctgcagccta ttttggtggc tttttaaagc caactacatt tatgctcaag tatgatgaaa 2100
atggtacaat cacagatgct gttgattggt ctcaaaatcc acttgctgaa ctcaaatgct 2160
ctgtaagag ctttgagatt gacaaaggaa tttaccagac ctctaatttc agggttgttc 2220
cctcaggaga tgttgtgaga ttccctaata ttacaaactt gtgtcctttt ggagaggttt 2280
ttaatgctac taaattccct tctgtctatg catgggagag aaaaaaatt tctaattgtg 2340
ttgctgatta ctctgtgctc tacaactcaa catttttttc aacctttaag tgctatggcg 2400
tttctgccac taagttgaat gatctttgct tctccaatgt ctatgcagat tctttttag 2460
tcaagggaga tgatgtaaga caaatagcgc caggacaaac tgggtgttatt gctgattata 2520
attataaatt gccagatgat ttcattgggt gtgtccttgc ttggaatact aggaacattg 2580
atgctacttc aactggtaat tataattata aatataaggta tcttagacat ggaacgctta 2640
ggccctttga gagagacata tctaattgtc ctttctcccc tgatggcaaa ccttgacccc 2700

```

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| cacctgctct | taattgttat | tggccattaa | atgattatgg | tttttacacc | actactggca | 2760 |
| ttgggtacca | accttacaga | gtttagtagc | tttcttttga | acttttaaat | gcaccggcca | 2820 |
| cggtttgtgg | accaaataa | tccactgacc | ttattaagaa | ccagtggtgc | aattttaatt | 2880 |
| ttaatggact | cactggtagt | ggtgtgttaa | ctccttcttc | aaagagattt | caaccatttc | 2940 |
| aacaatttgg | ccgtgatggt | tctgatttca | ctgattccgt | tcgagatcct | aaaacatctg | 3000 |
| aaatattaga | catttcacct | tgtcttttgg | ggggtgtaag | tgtaattaca | cctggaacaa | 3060 |
| atgcttcac | tgaagttgct | gttctatata | aagatgttaa | ctgcaactgat | gtttctacag | 3120 |
| caattcatgc | agatcaactc | acaccagctt | ggcgcatata | ttctactgga | aacaatgtat | 3180 |
| tccagactca | ggcaggctgt | cttataggag | ctgagcatgt | cgacacttct | tatgagtgcg | 3240 |
| acattcctat | tggagctggc | atttgtgcta | gttaccatac | agtttcttta | ttacgtagta | 3300 |
| ctagccaaaa | atctattgtg | gcttatacta | tgtctttagg | tgctgatagt | tcaattgctt | 3360 |
| actctaataa | caccattgct | atacctaata | acttttcaat | tagcattact | acagaagtaa | 3420 |
| tgctgttttc | tatggctaaa | acctccgtag | attgtaatat | gtacatctgc | ggagattcta | 3480 |
| ctgaatgtgc | taatttgctt | ctccaatatg | gtagcttttg | cacacaacta | aatcgtgcac | 3540 |
| tctcaggtat | tgctgctgaa | caggatcgca | acacacgtga | agtgttcgct | caagtcaaac | 3600 |
| aatgtacaa | aacccaact | ttgaaatatt | ttggtggttt | taatttttca | caaataattac | 3660 |
| ctgaccctct | aaagccaact | aagaggtctt | ttattgagga | cttgctcttt | aataaggtaga | 3720 |
| cactcgctct | atgtagcctt | atggaagcaat | atggcgaatg | cctaggtgat | attaatgcta | 3780 |
| gagatctcat | ttgtgctcag | aagttcaatg | gacttacagt | gttgccacct | ctgctcactg | 3840 |
| atgatatgat | tgctgcctac | actgctgctc | tagtttagtgg | tactgccact | gctggatgga | 3900 |
| catttggtgc | tggcgtgct | cttcaaatac | cttttgctat | gcaaattggca | tataggttca | 3960 |
| atggcattgg | agttacccaa | aatgttctct | atgagaacca | aaaacaaatc | gccaaccaat | 4020 |
| ttaacaaggc | gattagtcaa | attcaagaat | cacttacaac | aacatcaact | gcattgggca | 4080 |
| agctgcaaga | cgttgttaac | cagaatgctc | aagcattaaa | cacacttggt | aaacaactta | 4140 |
| gctctaattt | tgggtgcaatt | tcaagtgtgc | taaatagat | cctttcgcga | cttgataaag | 4200 |
| tcgagggcga | ggtacaaaatt | gacaggttaa | ttacagggcag | acttcaaagc | cttcaaacct | 4260 |
| atgtaacaca | acaactaatc | agggctgctg | aaatcagggc | ttctgctaat | cttgctgcta | 4320 |
| ctaaaatgtc | tgagtgtggt | cttggacaat | caaaaagagt | tgacttttgt | ggaaagggct | 4380 |
| accaccttat | gtccttccca | caagcagccc | cgcatgggtg | tgtcttccca | catgtcacgt | 4440 |
| atgtgccatc | ccaggagagg | aacttcacca | cagcggcagc | aatttgtcat | gaaggcaaaag | 4500 |
| catacttccc | tcgtgaaggt | gtttttgtgt | ttaatggcac | ttcttggttt | attacacaga | 4560 |
| ggaacttctt | ttctccacaa | ataattacta | cacagacatac | atttgcctca | ggaaattgtg | 4620 |
| atgtcgttat | tggcatcatt | aacaacacag | tttatgatcc | tctgcaacct | gagcttgact | 4680 |
| cattcaaaga | agagctggac | aagtacttca | aaaatcatac | atcaccagat | gttgattttg | 4740 |
| gcgacatttc | aggcattaac | gcttctgtcg | tcaacattca | aaaagaaatt | gaccgcctca | 4800 |
| atgaggtcgc | taaaaattta | aatgaatcac | tcattgacct | tcaagaactg | ggaaaatatg | 4860 |
| agcaatata | taaattggcct | ctcgacgaac | aaaaactcat | ctcagaagag | gatctgaatg | 4920 |
| ctgtgggcca | ggacacgcag | gaggtcatcg | tgggtgccaca | ctccttgccc | tttaagggtgg | 4980 |
| tgggtgatctc | agccatcctg | gccctgggtg | tgctcaccat | catctccctt | atcatcctca | 5040 |
| tcattgctttg | gcagaagaag | ccacgttagg | cgccgctcgc | agtgctagca | ccaagggccc | 5100 |
| cagcgtgttc | cccctggccc | ccagcagcaa | gagcaccagc | ggcggcacag | ccgcccctggg | 5160 |
| ctgcctggtg | aaggactact | tccccgagcc | cgtgaccgtg | agctggaaca | gcgggcctt | 5220 |
| gaccagcggc | gtgcacacct | tccccgccc | gctgcagagc | agcggcctgt | acagcctgag | 5280 |
| cagcgtggtg | accgtgccc | gcagcagcct | gggcacccag | acctacatct | gcaacgtgaa | 5340 |
| ccacaagccc | agcaacacca | aggtggacaa | acgcgtggag | cccaagagct | gcgacaagac | 5400 |
| ccacactagc | ccccctgcc | ctgccccga | gctgctgggc | ggaccctccg | tgttcctggt | 5460 |
| ccccccaag | cccaaggaca | ccctcatgat | cagcgggacc | cccaggtga | ctgctggtg | 5520 |
| ggtggacgtg | agccacgagg | accccaggtg | gaagttcaac | tggtagctgg | acggcgtgga | 5580 |
| ggtgcacaac | gccaaagacca | agccccggga | ggagcagtag | aacagcacct | accgggtggt | 5640 |
| gagcgtgctc | accgtgctgc | accaggactg | gctgaacggc | aaggagtaca | agtgcaagg | 5700 |
| gagcaacaag | gccctgcctg | cccccatcga | gaagaccatc | agcaaggcca | agggccagcc | 5760 |
| ccgggagccc | caggtgtaca | ccctgcccc | cagccgggag | gagatgacca | agaaccaggt | 5820 |
| gtccctcacc | tgtctggtga | agggcttcta | ccccagcgac | atcgccgtgg | agtgggagag | 5880 |
| caacggccag | cccgagaaca | actacaagac | cacccccct | gtgctggaca | gcgacggcag | 5940 |
| cttcttctctg | tacagcaagc | tcaccgtgga | caagagccgg | tggcagcagg | gcaacgtggt | 6000 |
| cagctgcagc | gtgatgcacg | aggccctgca | caaccactac | accagaaga | gcctgagcct | 6060 |
| gagccccggc | aagtgataat | ctagagggcc | cgtttaaac | cgctgatcag | cctcgactgt | 6120 |
| gccttctagt | tgccagccat | ctggtgtttg | cccctcccc | gtgccttct | tgaccctgga | 6180 |
| aggtgccact | cccactgtcc | tttcttaata | aaatgaggaa | attgcatcgc | attgtctgag | 6240 |
| taggtatcat | tctattctgg | ggggtggggt | ggggcaggac | agcaaggggg | aggattggga | 6300 |
| agacaatagc | aggtatgctg | gggatggggt | gggctctatg | gcttctgagg | cggaaagaac | 6360 |
| cagctggggc | tctagggggt | atccccacgc | gccctgtagc | ggcgcattaa | gcccggcggg | 6420 |
| tgtggtggtt | acgcgcagcg | tgaccgctac | acttgccagc | gccctagcgc | ccgctccttt | 6480 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------|
| cgctttcttc | ccttcctttc | tcgccacggt | cgccggcttt | ccccgtcaag | ctcctaaatcg | 6540 |
| ggggctccct | ttagggttcc | gatttagtgc | tttacggcac | ctcgacccca | aaaaacttga | 6600 |
| ttagggatgat | ggttcacgta | gtgggccatc | gccctgatag | acggtttttc | gccctttgac | 6660 |
| gttggagtc | agcttcttta | atagtggact | cttgttccaa | actggaacaa | cactcaaccc | 6720 |
| tatctcgytc | tattcttttg | atataaagg | gattttgccc | atctcggcct | attggttaaa | 6780 |
| aaatgagctg | atttaacaaa | aatttaacgc | gaattaattc | tgtggaatgt | gtgtcagtta | 6840 |
| gggtgtggaa | agtccccagg | ctccccagca | ggcagaagta | tgcaaagcat | gcatctcaat | 6900 |
| tagtcagcaa | ccaggtgtgg | aaagtcccc | ggctccccag | caggcagaag | tatgcaaagc | 6960 |
| atgcatctca | attagtcagc | aaccatagtc | ccgcccctaa | ctccgccc | cccgccccta | 7020 |
| actccgcca | gttccgcca | ttctccgccc | catggctgac | taattttttt | tatttatgca | 7080 |
| gaggccgagg | ccgctctctg | ctctgagcta | ttccagaagt | agtgaggagg | cttttttggg | 7140 |
| ggcctaggct | tttgcaaaaa | gctcccggga | gcttgtatat | ccattttcgg | atctgatcaa | 7200 |
| gagacaggat | gaggatcgtt | tcgcatgatt | gaacaagatg | gattgcacgc | aggttctccg | 7260 |
| gccgcttggg | tggagaggct | attcggctat | gactgggcac | aacagacaat | cggctgctct | 7320 |
| gatgccgccc | tgttccggct | gtcagcgag | gggcccgg | ttctttttgt | caagaccgac | 7380 |
| ctgtccggtg | ccctgaatga | actgcaggac | gaggcagcgc | ggctatcgtg | gctggccacg | 7440 |
| acgggcgttc | cttgccgagc | tgtgctcgag | gttgtcactg | aagcgggaag | ggactggctg | 7500 |
| ctattggggc | aagtgccggg | gcaggatctc | ctgtcatctc | accttgctcc | tgccgagaaa | 7560 |
| gtatccatca | tggctgatgc | aatgcggcgg | ctgcatacgc | ttgatccggc | tacctgcca | 7620 |
| ttcgaccacc | aagcgaacaa | tcgcatcgag | cgagcacgta | ctcggatgga | agccggtctt | 7680 |
| gtcgatcagg | atgatctgga | cgaagagcat | caggggctcg | cgccagccga | actgttcgcc | 7740 |
| aggctcaagg | cgcgcatgcc | cgacggcgag | gatctcgtcg | tgacccatgg | cgatgectgc | 7800 |
| ttgccgaata | tcatggtgga | aaatggccgc | ttttctggat | tcatcgactg | tggccggctg | 7860 |
| ggtgtggcgg | accgctatca | ggacatagcg | ttggctacc | gtgatattgc | tgaagagctt | 7920 |
| ggcggcgaat | gggctgaccg | cttctctgtg | ctttacggta | tcgcccgtcc | cgattcgcag | 7980 |
| cgcatcgctt | tctatcgctt | tcttgacgag | ttcttctgag | cgggactctg | gggttcgaaa | 8040 |
| tgaccgacca | agcgacgccc | aacctgccat | cacgagattt | cgattccacc | gccgccttct | 8100 |
| atgaaagggt | gggcttcgga | atcgttttcc | gggacgccgg | ctggatgatc | ctccagcgcg | 8160 |
| gggatctcat | gctggagttc | ttcgcccacc | ccaacttggt | tattgcagct | tataatggtt | 8220 |
| acaaataaag | caatagcatc | acaaatttca | caaataaagc | atttttttca | ctgcattcta | 8280 |
| gttgtggttt | gtccaaactc | atcaatgtat | cttatcatgt | ctgtataaccg | tcgacctcta | 8340 |
| gctagagctt | ggcgaatca | tggctatagc | tgtttctctg | gtgaaattgt | tatccctca | 8400 |
| caattccaca | caacatacga | gccggaagca | taaagtgtaa | agcctggggg | gcctaattgag | 8460 |
| tgagctaact | cacattaatt | gcgttgcgct | cactgcccgc | tttccagtctg | ggaaacctgt | 8520 |
| cgtgccagct | gcattaatga | atcggccaac | gcgcggggag | aggcggtttg | cgtattgggc | 8580 |
| gctcttccgc | ttcctcgctc | actgactcgc | tgcgctcggt | cgttcggctg | cggcgagcgg | 8640 |
| tatcagctca | ctcaaaggcg | gtaatacggg | tatccacaga | atcaggggat | aacgcaggaa | 8700 |
| agaacatgtg | agcaaaaagg | cagcaaaaagg | ccaggaaccg | taaaaaggcc | gcgttgctgg | 8760 |
| cgtttttcca | taggctccgc | ccccctgacg | agcatcacia | aaatcgacgc | tcaagtcaga | 8820 |
| ggtggcga | cccgcacagga | ctataaagat | accaggcgtt | tccccctgga | agctccctcg | 8880 |
| tgcgctctcc | tgttccgacc | ctgccgctta | ccggatacct | gtccgccttt | ctccctcgg | 8940 |
| gaagcgtggc | gctttctcat | agctcacgct | gtaggatctt | cagttcgggtg | taggtcgttc | 9000 |
| gctccaagct | gggctgtgtg | cacgaacccc | ccgttcagcc | cgaccgctgc | gccttatccg | 9060 |
| gtaactatcg | tcttgagctc | aacccggtaa | gacacgactt | atcgccactg | gcagcagcca | 9120 |
| ctggtaacag | gattagcaga | gcgaggtatg | taggcgggtg | tacagagttc | ttgaagtggg | 9180 |
| ggcctaacta | cggtacact | agaagaacag | tatttgggat | ctgcgctctg | ctgaagccag | 9240 |
| ttacctctcg | aaaaagagtt | ggtagctctt | gatccggcaa | acaaaccacc | gctggtagcg | 9300 |
| gtttttttgt | ttgcaagcag | cagattacgc | gcagaaaaaa | aggatctcaa | gaagatcctt | 9360 |
| tgatcttttc | tacggggtct | gacgctcag | ggaacgaaaa | ctcacgttaa | gggatttttg | 9420 |
| tcatgagatt | atcaaaaagg | atcttcacct | agatcctttt | aaattaa | tgaagtttta | 9480 |
| aatcaatcta | aagtataat | gagtaaactt | ggtctgacag | ttaccaatgc | ttaatcagtg | 9540 |
| aggcacctat | ctcagcgatc | tgtctatttc | gttcatccat | agttgcctga | ctccccgtcg | 9600 |
| tgtagataac | tacgatacgg | gagggttac | catctggccc | cagtgcctga | atgataccgc | 9660 |
| gagaccacg | ctcaccggct | ccagatttat | cagcaataaa | ccagccagcc | ggaagggccg | 9720 |
| agcgcagaag | tggctctgca | actttatccg | cctccatcca | gtctattaat | tgttgccggg | 9780 |
| aagctagagt | aagtagttcg | ccagttaata | gtttgcgcaa | cgttggtgcc | attgctacag | 9840 |
| gcatcggtg | gtcacgctcg | tcgtttggtg | tggcttcatt | cagctccggg | tcccaacgat | 9900 |
| caaggcgagt | tacatgatcc | cccatggtgt | gcaaaaaagc | ggttagctcc | ttcggctctc | 9960 |
| cgatcgttgt | cagaagtaag | ttggccgag | tgttatcact | catggttatg | gcagcactgc | 10020 |
| ataattctct | tactgtcatg | ccatccgtaa | gatgcttttc | tgtgactggg | gagtactcaa | 10080 |
| ccaagtcatt | ctgagaatag | tgtatgcggc | gaccaggttg | ctcttgcccg | gcgtcaatac | 10140 |
| gggataatac | cgcgccacat | agcagaactt | taaaagtgtc | catcattgga | aaacgttctt | 10200 |
| cggggcgaaa | actctcaagg | atcttaccgc | tgttgagatc | cagttcgatg | taaccacctc | 10260 |

| | | | | | | |
|---|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| gtgcacccaa | ctgatcttca | gcatctttta | ctttcaccag | cgtttctggg | tgagcaaaaa | 10320 |
| caggaaggca | aaatgccgca | aaaaagggaa | taagggcgac | acggaaatgt | tgaatactca | 10380 |
| tactcttct | ttttcaatat | tattgaagca | tttatcaggg | ttattgtctc | atgagcggat | 10440 |
| acataattga | atgtatttag | aaaaataaac | aaataggggt | tccgcgcaca | tttccccgaa | 10500 |
| aagtgccacc | tgacg | | | | | 10515 |
| Vector pIg-C909-Ckappa (SEQ ID N°: 191) | | | | | | |
| tcgacggatc | gggagatctc | ccgatcccc | atgggtgcact | ctcagtacaa | tctgctctga | 60 |
| tgccgcatag | ttaagccagt | atctgctccc | tgcttgtgtg | ttggaggctcg | ctgagtagtg | 120 |
| cgcgagcaaa | atttaagcta | caacaaggca | aggcttgacc | gacaattggt | aattaacatg | 180 |
| aagaatctgc | ttagggttag | gcgttttgcg | ctgcttcgct | aggtgggtcaa | tattggccat | 240 |
| tagccatatt | attcattggt | tatatagcat | aaatcaatat | tggctattgg | ccattgcata | 300 |
| cgttgtatcc | atatcataat | atgtacattt | atattggctc | atgtccaaca | ttaccgcat | 360 |
| gttgacattg | attattgact | agttattaat | agtaataaat | tacgggggtca | ttagttcata | 420 |
| gccccatata | ggagttccgc | gttacataac | ttacggtaaa | tggccccgct | ggctgaccgc | 480 |
| ccaacgaccc | ccgcccattg | acgtcaataa | tgacgtatgt | tccccatagta | acgccaatag | 540 |
| ggactttcca | ttgacgtcaa | tgggtggagt | atttacggta | aactgcccac | ttggcagtac | 600 |
| atcaagtgta | tcatatgcca | agtacgcccc | ctattgacgt | caatgacggt | aaatggcccc | 660 |
| cctggcatta | tgcccagtac | atgaccttat | gggactttcc | tacttggcag | tacatctacg | 720 |
| tattagtcac | cgctattacc | atgggtgatgc | ggttttggca | gtacatcaat | ggcgtggat | 780 |
| agcggtttga | ctcacgggga | ttccaagtc | tccaccccat | tgacgtcaat | gggagtttgt | 840 |
| tttggcacca | aaatcaacgg | gactttccaa | aatgtcgtaa | caactccgcc | ccattgacgc | 900 |
| aaatgggcgg | taggcgtgta | cggtgggagg | tctatataag | cagagctcgt | ttagtgaacc | 960 |
| gtcagatcgc | ctggagacgc | catccacgct | gttttgacct | ccatagaaga | caccgggacc | 1020 |
| gatccagcct | ccgcgccggg | gaacggtgca | ttggaatcga | tgactctctt | aggtagcctt | 1080 |
| gcagaagttg | gtcgtgaggc | actgggcagg | taagtatcaa | ggttacaaga | caggtttaag | 1140 |
| gagatcaata | gaaactgggc | ttgtcgagac | agagaagact | cttgcgtttc | tgataggcac | 1200 |
| ctattggtct | tactgacatc | cactttgcct | ttctctccac | aggtgtccac | tcccagttca | 1260 |
| attacagctc | gccaccatgc | ggctgcccc | ccagctgctg | ggccttctca | tgctgtgggt | 1320 |
| gccccgctcg | agatctatcg | atgcatgcca | tggtagcaag | cttgccacca | tgagcagcag | 1380 |
| ctcttggctg | ctgctgagcc | tgggtggcct | gacagccgcc | cagagcacca | tcgaggagca | 1440 |
| ggccaagacc | ttcctggaca | agttcaacca | cgagccggag | gacctgttct | accagagcag | 1500 |
| cctggccagc | tggaactaca | acaccaacat | caccgaggag | aacgtgcaga | acatgaacaa | 1560 |
| cgccggcgac | aagtggagcg | ccttctgaa | ggagcagagc | acactggccc | agatgtacct | 1620 |
| cctgcaggag | atccagaacc | tgaccgtgaa | gctgcagctg | caggccctgc | agcagaacgg | 1680 |
| cagcagcgtg | ctgagcgagg | acaagagcaa | gcggctgaac | accatcctga | acaccatgtc | 1740 |
| caccatctac | agcaccggca | aagtgtgcaa | ccccgacaac | ccccaggagt | gcctgctgct | 1800 |
| ggagcccggc | ctgaacgaga | tcatggccaa | cagcctggac | tacaacgagc | ggctgtgggc | 1860 |
| ctgggagagc | tggcggagcg | aagtgggcaa | gcagctgcgg | cccctgtacg | aggagtagct | 1920 |
| ggtgctgaag | aacgagatgg | ccagggccaa | ccactacgag | gactacggcg | actactggag | 1980 |
| aggcgactac | gaagtgaacg | gcgtggacgg | ctacgactac | agcagaggcc | agctgatcga | 2040 |
| ggacgtggag | cacaccttcg | aggagatcaa | gcctctgtac | gagcacctgc | acgcctacgt | 2100 |
| gcgggccaag | ctgatgaacg | cctaccccag | ctacatcagc | cccatcggt | gcctgcccgc | 2160 |
| ccacctgctg | ggcgacatgt | ggggccgggt | ctggaccaac | ctgtacagcc | tgaccgtgcc | 2220 |
| cttggccag | aagcccaaca | tgcagctgac | cgacgccatg | gtggaccagg | cctgggacgc | 2280 |
| ccagcggatc | ttcaaggagg | ccgagaagtt | cttctgtgag | gtgggacctgc | ccaacatgac | 2340 |
| ccagggcttt | tgggagaaca | gcatgctgac | cgaccccggc | aatgtgcaga | aggccgtgtg | 2400 |
| ccaccccacc | gcctgggacc | tgggcaaggg | gcacttccgg | atcctgatgt | gcaccaaagt | 2460 |
| gaccatggac | gacttctga | ccgcccacca | cgagatgggc | cacatccagt | acgacatggc | 2520 |
| ctacgcgcgc | cagoccttcc | tgctgcgga | cggcgccaac | gagggcttcc | acgaggccgt | 2580 |
| gggcgagatc | atgagcctga | gcgccgccac | ccccaaagcac | ctgaagagca | tcggcctgct | 2640 |
| gagccccgac | ttccaggagg | acaacgagac | cgagatcaac | ttcctgctga | agcaggccct | 2700 |
| gaccatcgtg | ggcaccctgc | ccttcacct | catgctggag | aagtggcgggt | ggatgggtgtt | 2760 |
| taagggcgag | atccccaaag | accagtggt | gaagaagtgg | tgggagatga | agcgggagat | 2820 |
| cgtgggcgtg | gtggagcccg | tgccccacga | cgagacctac | tgcgaccccg | ccagcctggt | 2880 |
| ccacgtgagc | aacgactact | ccttcatccg | gtactacacc | cggaccctgt | accagttcca | 2940 |
| gttccaggag | gccctgtgcc | aggccgccaa | gcacgagggc | cccctgcaca | agtgcgacat | 3000 |
| cagcaacagc | accgaggccg | gacagaaact | gttcaacatg | ctgcccgtgg | gcaagagcga | 3060 |
| gccctggacc | ctggccctgg | agaatgtggt | gggcgccaaag | aacatgaatg | tgcgccccct | 3120 |
| gctgaactac | ttcgagcccc | tgttcacctg | gctgaaggac | cagaacaaga | acagcttctg | 3180 |
| gggctggagc | accgacttga | gccccctacg | cgaccagagc | atcaaagtgc | ggatcagcct | 3240 |
| gaagagcgcc | ctggcgaca | aggcctacga | gtggaacgac | aacgagatgt | acctgttccg | 3300 |
| gagcagcgtg | gcctatgcca | tgcggcagta | cttctgaaa | gtgaagaacc | agatgatcct | 3360 |
| gttggcgag | gaggacgtga | gagtgcccaa | cctgaagccc | cggatcagct | tcaacttctt | 3420 |

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| cgtgaccgcc | cccaagaacg | tgagcgacat | catccccgg | accgaagtgg | agaaggccat | 3480 |
| ccgatgagc | cggagccgga | tcaacgacgc | cttccggctg | aacgacaact | ccctggagtt | 3540 |
| cctgggcatc | cagcccacc | tgggcccctc | caaccagccc | cccgtgagca | tctggctgat | 3600 |
| cgtgtttggc | gtggtgatgg | gcgtgatcgt | ggtgggaatc | gtgatcctga | tcttcaccgg | 3660 |
| catccgggac | cggaagaaga | agaacaaggc | ccggagcggc | gagaaccctt | acgccagcat | 3720 |
| cgatatcagc | aagggcgaga | acaacccccg | cttccagaac | accgacgacg | tgagaccag | 3780 |
| cttctgataa | tctagaacga | gctcgaattc | gaagcttctg | cagacgcgtc | gacgtcatat | 3840 |
| ggatccgata | tgcgctggc | ggccgcaccc | agcgtgttca | tcttcccccc | ctccgacgag | 3900 |
| cagctgaaga | gcggcaccgc | cagcgtgggt | tgcttctga | acaacttcta | ccccgggag | 3960 |
| gccaaggtgc | agtgaaggt | ggacaacgcc | ctgcagagcg | gcaacagcca | ggagagcgtg | 4020 |
| accgagcagg | acagcaagga | ctccacctac | agcctgagca | gcaccctcac | cctgagcaag | 4080 |
| gccgactacg | agaagcacia | ggtgtacgcc | tgcgaggtga | cccaccaggg | cctgagcagc | 4140 |
| cccgtgacca | agagcttcaa | ccggggcgag | tgtaataaga | cttaagttta | aaccgctgat | 4200 |
| cagcctcgac | tgtgccttct | agttgccagc | catctgttgt | ttgccctcc | cccgtgcctt | 4260 |
| ccttgaccct | ggaaggtgcc | actcccactg | tcctttccta | ataaaatgag | gaaattgcat | 4320 |
| cgcatgtct | gagtaggtgt | cattctattc | tgggggggtg | ggtggggcag | gacagcaagg | 4380 |
| gggaggattg | ggaagacaat | agcaggcatg | ctggggatgc | ggtgggctct | atggcttctg | 4440 |
| aggcggaaag | aaccagctgg | ggctctaggg | ggtatcccca | cgccctctgt | agcgcgcat | 4500 |
| taagcgcggc | gggtgtgggt | gttacgcgca | gcgtgaccgc | tacacttgcc | agcgcctag | 4560 |
| cgcccgcctc | tttcgcttct | ttcccttctt | ttctcgccac | gttcgcccgc | tttccccgtc | 4620 |
| aagctctaaa | tggggggctc | ccttaggggt | tccgatttag | tgctttacgg | cacctcgacc | 4680 |
| ccaaaaaact | tgattaggggt | gatggttcac | gtagtgggcc | atcgccctga | tagacggttt | 4740 |
| ttcgcccttt | gacgttggag | tccacgttct | ttaatagtgg | actcttgctc | caaactggaa | 4800 |
| caacactcaa | ccctatctcg | gtctattctt | ttgatattata | agggattttg | gccatttcgg | 4860 |
| cctattggtt | aaaaaatgag | ctgatttaac | aaaaatttaa | cggaattaa | ttctgtggaa | 4920 |
| tgtgtgtcag | ttaggtgtg | gaaagtcccc | aggctcccca | gcaggcagaa | gtatgcaaag | 4980 |
| catgcatctc | aattagttag | caaccaggtg | tggaaagtcc | ccaggctccc | cagcaggcag | 5040 |
| aagtatgcaa | agcatgcatc | tcaattagtc | agcaaccata | gtcccgcccc | taactccgcc | 5100 |
| catcccggcc | ctaaactccgc | ccagttccgc | ccattctccg | ccccatggct | gactaatttt | 5160 |
| ttttatttat | gcagaggccg | aggccgcctc | tgctctgag | ctattccaga | agtagtgagg | 5220 |
| aggctttttt | ggaggcctag | gcttttgcaa | aaagctcccg | ggagcttcta | tatccatttt | 5280 |
| cggatctgat | cagcacgtga | tgaaaaagcc | tgaactcacc | gcgagctctg | tcgagaagtt | 5340 |
| tctgatcgaa | aagttcgaca | gcgtctccga | cctgatgcag | ctctcggagg | gcgaagaatc | 5400 |
| tctgtctttc | agcttcgatg | taggagggcg | tgatattgtc | ctgcgggtaa | atagctgcgc | 5460 |
| cgatggtttc | tacaaaagatc | gttatgttta | tccggcacttt | gcatcggccg | cgctcccgat | 5520 |
| tccggaagtg | cttgacattg | gggaattcag | cgagagcctg | acctattgca | tctcccgcgg | 5580 |
| tgcacagggg | gtcacggttc | aagacctgcc | tgaaccggaa | ctgcccgcgt | ttctgcagcc | 5640 |
| ggtcgcggag | gccatggatg | cgatcgctgc | ggccgatctt | agccagacga | gcgggttcgg | 5700 |
| cccattcgga | ccacaaggaa | tccgtcaata | cactacatgg | cgtgatattca | tatgcgcgat | 5760 |
| tgctgatccc | catgtgtatc | actggcaaac | tgtgatggac | gacaccgtca | gtgcgtccgt | 5820 |
| cgccagggct | ctcgatgagc | tgatgctttg | ggccgaggac | tgccccgaag | tccggcacct | 5880 |
| cgtgcacgcg | gatttcggct | ccaacaatgt | cctgacggac | aatggccgca | taacagcggg | 5940 |
| cattgactgg | agcgaggcga | tgctcgggga | ttcccaatac | gaggtcgcca | acatcttctt | 6000 |
| ctggaggccg | tggttggtct | gtatggagca | gcagacgcgc | tacttcgagc | ggaggcatcc | 6060 |
| ggagcttgca | ggatcgccgc | ggctccgggc | gtatatgctc | cgcatgtgtc | ttgaccaact | 6120 |
| ctatcagagc | ttggttgacg | gcaatttcga | tgatgcagct | tgggcgcagg | gtcgatgcga | 6180 |
| cgcaatcgtc | cgatccggag | ccgggactgt | cgggcgtaca | caaatcgccc | gcagaagcgc | 6240 |
| ggccgtctgg | accgatggct | gtgtagaagt | actcgccgat | agtggaaacc | gacgccccag | 6300 |
| cactcgtccg | agggcaaaag | aatagcacgt | gctacagat | ttcgattcca | ccgccgcctt | 6360 |
| ctatgaaaag | ttgggcttcg | gaatcgtttt | ccgggacgcc | ggctggatga | tctccagcgg | 6420 |
| cggggatctc | atgctggagt | tcttcgcccc | ccccaaactg | tttattgcag | cttataatgg | 6480 |
| ttacaaaata | agcaatagca | tcacaaattt | cacaaataaa | gcattttttt | cactgcattc | 6540 |
| tagttgtggt | ttgtccaac | tcataaatgt | atcttatcat | gtctgtatac | cgctgacctc | 6600 |
| tagctagagc | ttggcgtaat | catggtcata | gctgtttcct | gtgtgaaatt | gttatccgct | 6660 |
| cacaattcca | cacaacatac | gagccggaag | cataaagtgt | aaagcctggg | gtgcctaatt | 6720 |
| agtgagctaa | ctcacattaa | ttgcgttgcg | ctcactgccc | gctttccagt | cgggaaaacct | 6780 |
| gtcgtgccag | ctgcattaat | gaatcggcca | acgcgcgggg | agaggcgggt | tgcgatttgg | 6840 |
| gcgctcttcc | gcttccctcg | tactgactc | gctgcgctcg | gtcgttcggc | tgccggcagc | 6900 |
| ggtatcagct | cactcaaaag | cggtataatc | ggtatccaca | gaatcagggg | ataacgcagg | 6960 |
| aaagaacatg | tgagcaaaa | gccagcaaaa | ggccaggaac | cgtaaaaagg | ccgcgttgc | 7020 |
| ggcgtttttc | cataggctcc | gccccctga | cgagcatcac | aaaaatcgac | gctcaagtca | 7080 |
| gaggtggcga | aacccgacag | gactataaag | ataccagggc | tttccccctg | gaagctccct | 7140 |
| cgtgcgctct | cctgttccga | ccctgcogct | taccggatac | ctgtccgcct | ttctcccttc | 7200 |

| | | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------|
| gggaagcgtg | gcgctttctc | atagctcacg | ctgtaggtat | ctcagttcgg | tgtaggtcgt | 7260 |
| tcgctccaag | ctgggctgtg | tgcacgaacc | ccccgttcag | cccgaccgct | gcgccttacc | 7320 |
| cggtaactat | cgtcttgagt | ccaacccggt | aagacacgac | ttatcgccac | tggcagcagc | 7380 |
| actggtaaac | aggattagca | gagcgaggta | tgtagcggtg | gctacagagt | tcttgaagtg | 7440 |
| gtggcctaac | tacggctaca | ctagaagaac | agtatttggg | atctgcgctc | tgctgaagcc | 7500 |
| agttaccttc | ggaaaaagag | ttggtagctc | ttgatccggc | aaacaaacca | ccgctggtag | 7560 |
| cggttttttt | gtttgcaagc | agcagattac | gcgcagaaaa | aaaggatctc | aagaagatcc | 7620 |
| tttgatcttt | tctacggggg | ctgacgctca | gtggaacgaa | aactcacggt | aagggatttt | 7680 |
| ggatcatgaga | ttatcaaaaa | ggatcttcac | ctagatcctt | ttaaattaa | aatgaagttt | 7740 |
| taaatcaatc | taaagtatat | atgagtaaac | ttggctctgac | agttaccaat | gcttaatcag | 7800 |
| tgaggcacct | atctcagcga | tctgtctatt | tcgttcaccc | atagttgcct | gactccccgt | 7860 |
| cgtgtagata | actacgatac | gggagggcct | accatctggc | cccagtgctg | caatgatacc | 7920 |
| gcgagaccca | cgctcaccgg | ctccagatct | atcagcaata | aaccagccag | ccggaagggc | 7980 |
| cgagcgcaga | agtggctctg | caactttatc | cgctccatc | cagtctatta | attggtgccc | 8040 |
| ggaagctaga | gtaagtagtt | cgccagttaa | tagtttgccg | aacggtggtg | ccattgctac | 8100 |
| aggcatcgtg | gtgtcacgct | cgtcgtttgg | tatggcttca | ttcagctccg | gttccccaac | 8160 |
| atcaaggcga | gttacaatgat | ccccatggt | gtgcaaaaa | gcggttagct | ccttcggctc | 8220 |
| tccgatcgtt | gtcagaagta | agttggccgc | agtggtatca | ctcatgggta | tggcagcact | 8280 |
| gcataattct | cttactgtca | tgccatccgt | aagatgcttt | tctgtgactg | gtgagtactc | 8340 |
| aaccaagtca | ttctgagaat | agtgtatgcg | gcgaccgagt | tgctcttgcc | cggcgtcaat | 8400 |
| acgggataat | accgcgccac | atagcagaac | tttaaaagtg | ctcatcattg | gaaaacgttc | 8460 |
| ttcggggcga | aaactctcaa | ggatcttacc | gctgttgaga | tccagttcga | tgtaaccac | 8520 |
| tcgtgcaccc | aactgatctt | cagcatcttt | tactttcacc | agcgtttctg | ggtgagcaaa | 8580 |
| aacaggaagg | caaatgccg | caaaaaagg | aataagggcg | acacggaaat | ggtgaatact | 8640 |
| catactcttc | ctttttcaat | attattgaag | catttatcag | ggttattgtc | tcatgagcgg | 8700 |
| atacatattt | gaatgtatct | agaaaaataa | acaaataggg | gttccgcgca | catttccccg | 8760 |
| aaaagtgcc | cctgacg | | | | | 8777 |
| Vector pIg-C910-Clambda (SEQ ID N°: 192) | | | | | | |
| tcgacggatc | gggagatctc | ccgatcccct | atgggtgact | ctcagtacaa | tctgctctga | 60 |
| tgccgcatag | ttaagccagt | atctgctccc | tgcttgtgtg | ttggaggctg | ctgagtagtg | 120 |
| cgcgagcaaa | atttaagcta | caacaaggca | aggcttgacc | gacaattggt | aattaacatg | 180 |
| aagaatctgc | ttagggttag | gcgttttgcg | ctgcttcgct | aggtgggcaa | tattggccat | 240 |
| tagccatatt | attcattggt | tatatagcat | aaatcaatat | tggctattgg | ccattgcata | 300 |
| cgttgatctc | atatcataat | atgtacattt | atattggctc | atgtccaaca | ttaccgccat | 360 |
| gttgacattg | attattgact | agttattaat | agtaatcaat | tacgggggtc | ttagttcata | 420 |
| gcccatatat | ggagttccgc | gttacataac | ttacggtaaa | tggcccgcct | ggctgaccgc | 480 |
| ccaacgaccc | ccgcccattg | acgtcaataa | tgacgtatgt | tcccatagta | acgccaatag | 540 |
| ggactttcca | ttgacgtcaa | tgggtggagt | atctacggta | aactgccac | ttggcagtag | 600 |
| atcaagtgta | tcatatgcca | agtacgcccc | ctattgacgt | caatgacggt | aaatggcccc | 660 |
| cctggcatta | tgcccagtag | atgaccttat | gggactttcc | tacttggcag | tacatctacg | 720 |
| tattagtcac | cgctattacc | atgggtgatg | ggttttggca | gtacatcaat | gggctggtg | 780 |
| agcggtttga | ctcacggggg | tttccaagtc | tccaccccat | tgacgtcaat | gggagtttgt | 840 |
| tttggcacca | aaatcaacgg | gactttccaa | aatgtcgtaa | caactccgcc | ccattgacgc | 900 |
| aaatgggcgg | taggcgtgta | cgggtggagg | tctatataag | cagagctcgt | ttagtgaacc | 960 |
| gtcagatcgc | ctggagacgc | catccacgct | gttttgacct | ccatagaaga | caccgggacc | 1020 |
| gatccagcct | ccgcggccgg | gaacgggtgca | ttggaatcga | tgactctctt | aggtagcctt | 1080 |
| gcagaagttg | gtcgtgaggg | actgggcagg | taagtatcaa | ggttacaaga | cagggttaag | 1140 |
| gagatcaata | gaaactgggc | ttgtcgagac | agagaagact | cttgcgtttc | tgataggcac | 1200 |
| ctattggtct | tactgacatc | cactttgcct | ttctctccac | aggtgtccac | tcccagttca | 1260 |
| attacagctc | gccaccatgc | ggttctccgc | tcagctgctg | ggccttctgg | tgctgtggat | 1320 |
| tcccggcgtc | tcgagatcta | tcgatgcatg | ccatgggtacc | aagcttgcca | ccatgagcag | 1380 |
| cagctcttgg | ctgctgctga | gcctgggtgg | cgtgacagcc | gcccagagca | ccatcgagga | 1440 |
| gcaggccaag | accttcctgg | acaagttcaa | ccacgaggcc | gaggacctgt | tctaccagag | 1500 |
| cagcctggcc | agctggaact | acaacaccaa | catcaccgag | gagaacgtgc | agaacatgaa | 1560 |
| caacgcocgg | gacaagtggg | gcgcccttct | gaaggagcag | agcacactgg | cccagatgta | 1620 |
| ccccctgcag | gagatccaga | acctgaccgt | gaagctgcag | ctgcaggccc | tgacgagaaa | 1680 |
| cggcagcagc | gtgctgagcg | aggacaagag | caagcggctg | aacaccatcc | tgaacaccat | 1740 |
| gtccaccatc | tacagcaccg | gcaaagtgtg | caaccccagc | aacccccagg | agtgcctgct | 1800 |
| gctggagccc | ggcctgaacg | agatcatggc | caacagcctg | gactacaacg | agcggctgtg | 1860 |
| ggcctgggag | agctggcgga | gcgaagtggg | caagcagctg | cggcccctgt | acgagtagta | 1920 |
| cgtggtgctg | agaacagaga | tggccagggc | caaccactac | gaggactacg | gcgactactg | 1980 |
| gagaggcgac | tacgaagtga | acggcgtgga | cggctacgac | tacagcagag | gccagctgat | 2040 |
| cgaggacgtg | gagcacacct | tcgaggagat | caagcctctg | tacgagcacc | tgacgcctca | 2100 |

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------|
| cgtgcgggcc | aagctgatga | acgcctaccc | cagctacatc | agccccatcg | gctgctgcc | 2160 |
| cgcccacctg | ctggcgaca | tgtggggcgg | gttctggacc | aacctgtaca | gcctgaccgt | 2220 |
| gcocttcggc | cagaagccca | acatcgacgt | gaccgacgcc | atgggtggacc | aggcctggga | 2280 |
| cgcccagcgg | atcttcaagg | aggccgagaa | gttcttcgtg | agcgtggggc | tgcccaacat | 2340 |
| gaccagggc | ttttgggaga | acagcatgct | gaccgacccc | ggcaatgtgc | agaaggccgt | 2400 |
| gtgccacccc | accgcctggg | acctgggcaa | gggcgacttc | cggatcctga | tgtgcaccaa | 2460 |
| agtgaccatg | gacgacttcc | tgaccgcccc | ccacgagatg | ggccacatcc | agtacgacat | 2520 |
| ggcctacgcc | gccagccct | tcctgctgcg | gaacggcgcc | aacgagggct | ttcacgaggc | 2580 |
| cgtgggogag | atcatgagcc | tgagcgccgc | cacccccaa | cacctgaaga | gcatcggcct | 2640 |
| gctgagcccc | gacttccagg | aggacaacga | gaccgagatc | aacttcctgc | tgaagcaggc | 2700 |
| cctgaccatc | gtgggcaccc | tgcccttcac | ctacatgctg | gagaagtggc | ggtggatggt | 2760 |
| gtttaagggc | gagatcccca | aggaccagtg | gatgaagaag | tggtgggaga | tgaagcggga | 2820 |
| gatcgtgggc | gtgggtggagc | ccgtgcccc | cgacgagacc | tactgcgacc | ccgccagcct | 2880 |
| gttccacgtg | agcaacgact | actccttcat | ccggtactac | accoggaccc | tgtaccagtt | 2940 |
| ccagttccag | gaggccctgt | gccaggccgc | caagcacgag | ggccccctgc | acaagtgcga | 3000 |
| catcagcaac | agcaccgagg | ccggacagaa | actgttcaac | atgctgcggc | tgggcaagag | 3060 |
| cgagccctgg | accctggccc | tggagaatgt | ggtgggcgcc | aagaacatga | atgtgcgccc | 3120 |
| cctgtggaac | tacttcgagc | ccctgttcac | ctggctgaag | gaccagaaca | agaacagctt | 3180 |
| cgtgggctgg | agcaccgact | ggagccccta | cgccgaccag | agcatcaaag | tcggtatcag | 3240 |
| cctgaagagc | gccctggggc | acaaggcccta | cgagtggaac | gacaacgaga | tgtacctgtt | 3300 |
| ccggagcagc | gtggcctatg | ccatgcgcca | gtacttcctg | aaagtgaaga | accagatgat | 3360 |
| cctgttcggc | gaggaggacg | tgagagtggc | caacctgaag | ccccggatca | gcttcaactt | 3420 |
| cttcgtgacc | gcccccaaga | acgtgagcga | catcatccc | cggaccgaag | tggagaaggc | 3480 |
| catccggatg | agccggagcc | ggatcaacga | cgccctccgg | ctgaacgaca | actccctgga | 3540 |
| gttccctggc | atccagcccc | ccctgggccc | tcccaaccag | ccccccgtga | gcatctggct | 3600 |
| gatcgtgttt | ggcgtggtga | tgggcgtgat | cgtggtggga | atcgtgatcc | tgatcttcac | 3660 |
| cggcacccgg | gaccggaaga | agaagaacaa | ggcccggagc | ggcgagaacc | cctacgccag | 3720 |
| catcgatata | agcaagggcg | agaacaaccc | cggttccag | aacaccgacg | acgtgcagac | 3780 |
| cagcttctga | taatctagaa | cgagctcga | ttcgaagctt | ctgcagacgc | gtcgcagtca | 3840 |
| tatggatccg | atatcgccgt | ggcggccgca | ggccagcccc | aggccgctcc | cagcgtgacc | 3900 |
| ctgttcccc | cctcctccga | ggagctgcag | gccaacaagg | ccaccctggt | gtgctcatc | 3960 |
| agcgcctct | accctggcgc | cgtgaccgtg | gctggaagg | ccgacagcag | ccgagcgaag | 4020 |
| gccggcgtgg | agaccaccac | ccccagcaag | cagagcaaca | acaagtacgc | cgccagcagc | 4080 |
| tacctgagcc | tcacccccga | gcagtgggaag | agccaccgga | gctacagctg | ccaggtgacc | 4140 |
| cacgagggca | gcaccgtgga | gaagaccgtg | gccccaccg | agtgcagcta | atagacttaa | 4200 |
| gtttaaacgg | ctgatcagcc | tcgactgtgc | cttctagtgt | ccagccatct | gttgtttgcc | 4260 |
| cctcccccg | gccttccttg | accctggaag | gtgccactcc | cactgtcctt | tcctaataaa | 4320 |
| atgaggaaat | tgcatcgcat | tgtctgagta | ggtgtcattc | tattctgggg | ggtggggtgg | 4380 |
| ggcaggacag | caagggggag | gattgggaag | acaatagcag | gcatgctggg | gatgcggtgg | 4440 |
| gctctatggc | ttctgaggcg | gaaagaacca | gctggggctc | tagggggtat | ccccacgcgc | 4500 |
| cctgtagcgg | cgcatthaagc | gcggcgggtg | tggtggttac | gcgcagcgtg | accgctacac | 4560 |
| ttgccagcgc | cctagcgccc | gctcctttcg | ctttcttccc | ttcctttctc | gccacgttcg | 4620 |
| ccggtttcc | ccgtcaagct | ctaaatcggg | ggctcccttt | agggttccga | tttagtgctt | 4680 |
| tacggcacct | cgacccccaa | aaacttgatt | agggtgatgg | ttcacgtagt | gggccatcgc | 4740 |
| cctgatagac | ggtttttcgc | cctttgacgt | tggagtccac | gttctttaat | agtgactct | 4800 |
| tgttccaaac | tggaacaaca | ctcaacccta | tctcggctca | ttcttttgat | ttataaggga | 4860 |
| ttttggccat | ttcggcctat | tggttaaaaa | atgagctgat | ttaaacaaaa | tttaacgoga | 4920 |
| attaattctg | tggaatgtgt | gtcagttagg | gtgtggaaag | tccccaggct | ccccagcagg | 4980 |
| cagaagtatg | caaagcatgc | atctcaatta | gtcagcaacc | agggtgtgga | agtccccagg | 5040 |
| ctccccagca | ggcagaagta | tgcaaagcat | gcatctcaat | tagtcagcaa | ccatagtccc | 5100 |
| gcccctaact | ccgcccatac | cgcccctaac | tccgcccagt | tccgcccatt | ctccgcccc | 5160 |
| tggctgacta | atTTTTTTT | tttatgcaga | ggccgaggcc | gcctctgct | ctgagctatt | 5220 |
| ccagaagtag | tgaggaggct | tttttgagg | cctaggcttt | tgcaaaaagc | tcccgggagc | 5280 |
| ttgtatatcc | atTTTTCGG | ctgatcagca | cgtgatgaaa | aagcctgaac | tcaccgcgac | 5340 |
| gtctgtcgag | aagtttctga | tcgaaaagtt | cgacagcgtc | tccgacctga | tgcaagctct | 5400 |
| ggagggcgaa | gaatctcgtg | ctttcagctt | cgatgtagga | gggcgtggat | atgtcctgcg | 5460 |
| ggtaaatagc | tgcgccgatg | gtttctacaa | agatcgttat | gtttatcggc | actttgcate | 5520 |
| ggccgcgctc | ccgattccgg | aagtgttga | cattggggaa | ttcagcgaga | gcctgacct | 5580 |
| ttgcatctcc | cgccgtgcac | agggtgtcac | gttgcaagac | ctgcctgaaa | ccgaactgcc | 5640 |
| cgctgttctg | cagccggctc | cggaggccat | ggatgcgac | gctgcggccg | atcttagcca | 5700 |
| gacgagcggg | ttcggcccat | tcggaccgca | aggaatcgg | caatacact | catggcgtga | 5760 |
| tttcatatgc | gcgattgctg | atccccatgt | gtatcactgg | caaactgtga | tggacgacac | 5820 |
| cgtcagtgcg | tccgtcgcgc | aggctctcga | tgagctgatg | ctttgggccc | aggactgccc | 5880 |

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| cgaagtccgg | cacctcgtgc | acgcggattt | cggctccaac | aatgtcctga | cggacaatgg | 5940 |
| ccgcataaca | gcggtcattg | actggagcga | ggcgatgttc | ggggattccc | aatacgaggt | 6000 |
| cgccaacatc | ttcttctgga | ggccgtggtt | ggcttgtatg | gagcagcaga | cgcgctactt | 6060 |
| cgagcggagg | catccggagc | atgcaggatc | gcccgggctc | cggcggtata | tgctccgcat | 6120 |
| tggtcttgac | caactctatc | agagcttgg | tgacggcaat | ttcgatgatg | cagcttgggc | 6180 |
| gcagggtcga | tgcgacgcaa | tcgtccgata | cggagccggg | actgtcgggc | gtacacaaat | 6240 |
| cgccccgaga | agcgcggccg | tctggaccga | tggctgtgta | gaagtactcg | ccgatagtgg | 6300 |
| aaaccgacgc | cccagcactc | gtccgagggc | aaaggaatag | cacgtgctac | gagatttcga | 6360 |
| ttccaccgcc | gccttctatg | aaaggttggg | cttcggaatc | gttttccggg | acgccggctg | 6420 |
| gatgatcctc | cagcgcgggg | atctcatgct | ggagttcttc | gccaccccca | acttgtttat | 6480 |
| tgcagcttat | aatggttaca | aataaagcaa | tagcatcaca | aatttcacaa | ataaagcatt | 6540 |
| tttttactg | cattctagtt | gtggtttgtc | caaactcatc | aatgtatctt | atcatgtctg | 6600 |
| tataccgctg | acctctagct | agagcttggc | gtaatcatgg | tcatagctgt | ttcctgtgtg | 6660 |
| aaattgttat | ccgctcacia | ttccacacaa | catacgagcc | ggaagcataa | agtgtaaagc | 6720 |
| ctggggtgcc | taatgagtga | gctaaactcac | attaattgcy | ttgcgctcac | tgccccgttt | 6780 |
| ccagtcggga | aacctgtcgt | gccagctgca | ttaatgaatc | ggccaacgcy | cggggagagg | 6840 |
| cggtttgcyt | attgggcgct | cttccgcttc | ctcgcctcact | gactcgcctc | gctcggctct | 6900 |
| tcggctgcyt | cgagcgggat | cagctcactc | aaaggcggta | atacggttat | ccacagaatc | 6960 |
| aggggataac | gcaggaaga | acatgtgagc | aaaaggccag | caaaaggcca | ggaaccgtaa | 7020 |
| aaagcccgcy | ttgctggcgt | ttttccatag | gctccgcccc | cctgacgagc | atcacaiaaaa | 7080 |
| tcgacgctca | agtcagaggt | ggcgaaaacc | gacaggacta | taaagatacc | aggcgtttcc | 7140 |
| ccctggaagc | tcctcgtgcy | gctctcctgt | tcgcaccctg | ccgcttaccg | gatacctgtc | 7200 |
| cgctttctc | ccttcgggaa | gcgtggcgtc | ttctcatagc | tcacgctgta | ggtatctcag | 7260 |
| ttcgggtgtag | gtcgttcgct | ccaagctggg | ctgtgtgcac | gaaccccccg | ttcagccccga | 7320 |
| ccgctgcgcc | ttatccggta | actatcgtct | tgagtccaac | ccggtaaagc | acgacttatc | 7380 |
| gccactggca | gcagccactg | gtaacaggat | tagcagagcy | aggtatgtag | gcggtgctac | 7440 |
| agagttcttg | aagtgggtgg | ctaactacgg | ctacactaga | agaacagtat | ttggtatctg | 7500 |
| cgctctgctg | aagccagtta | ccttcggaaa | aagagttggt | agctcttgat | ccggcaaaaca | 7560 |
| aaccaccgct | ggtagcgggt | tttttgtttg | caagcagcag | attacgcgca | gaaaaaaaagg | 7620 |
| atctcaagaa | gatcctttga | tcttttctac | ggggtctgac | gctcagtgga | acgaaaactc | 7680 |
| acgtaaagg | attttggcca | tgagattatc | aaaaaggatc | ttcacctaga | tcctttttaa | 7740 |
| ttaaaaatga | agttttaaat | caatctaaag | tatatatgag | taaacttgg | ctgacagtta | 7800 |
| ccaatgctta | atcagtgagg | cacctatctc | agcgatctgt | ctatttcggt | catccatagt | 7860 |
| tgctgactc | cccgtcgtgt | agataactac | gatacgggag | ggcttaccat | ctggccccag | 7920 |
| tgctgcaatg | ataccgcgag | acccacgctc | accggctcca | gatttatcag | caataaaacca | 7980 |
| gccagccgga | agggccgagc | gcagaagtgg | tcctgcaact | ttatccgcct | ccatccagtc | 8040 |
| tattaattgt | tgccgggaag | ctagagtaag | tagttcgcca | gttaatagtt | tgcgcaacgt | 8100 |
| tggtgccatt | gctacaggca | tcgtgggtgc | acgctcgtcg | tttgggatgg | cttcattcag | 8160 |
| ctccggttcc | caacgatcaa | ggcgagttac | atgatcccc | atggtgtgca | aaaaagcgg | 8220 |
| tagctccttc | ggtcctccga | tcgttgtcag | aagtaagttg | gccgcagtg | tatcactcat | 8280 |
| ggttatggca | gcactgcata | attctcttac | tgctcatgcca | tcgtaagat | gcttttctgt | 8340 |
| gactggtgag | tactcaacca | agtcattctg | agaatagtgt | atgcggcgac | cgagttgctc | 8400 |
| ttgcccggcg | tcaatacggg | ataataccgc | gccacatagc | agaacttta | aagtgtcat | 8460 |
| cattggaaaa | cgttcttcgg | ggcgaaaact | ctcaaggatc | ttaccgctgt | tgagatccag | 8520 |
| ttcgatgtaa | cccactcgtg | cacccaactg | atcttcagca | tcttttactt | tcaccagcgt | 8580 |
| ttctgggtga | gcaaaaacag | gaaggcaaaa | tgccgcaaaa | aagggaataa | ggcgacacg | 8640 |
| gaaatgttga | atactcatac | tcttcctttt | tcaatattat | tgaagcattt | atcagggtta | 8700 |
| ttgtctcatg | agcggataca | tatttgaatg | tatttagaaa | aataaiaaaa | taggggttcc | 8760 |
| gcgcacattt | ccccgaaaag | tgccacctga | cg | | | 8792 |

Sequence of immature HA from A/Hong Kong/1/1968 (SEQ ID N°: 193)

**MKTIIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHA VPNGTLVKITITDDQIEVTNATELVQSSSTGKIC
NNPHRILDGIDCTLIDALLGDPHCDVFQNETWDLFVERSKAFSNCYPYDVPDYASLRSLVASSGTLE
FITEGFTWTGVTQNGGSNACKRGP**

**SGFFSRLNWLTKSGSTYPVLNVTMPNNDNFDKLYIWGVHHPSTNQEQTSLYVQASGRVTVSTRSQ
QTIIPNIGSRPWVRLSSRSIYWIVKPGDVLVINSNGNLIAPRGYFKMRTGKSSIMRSDAPIDTCISE
CITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAIAGFIENGWEGMI
DGWYGFHRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQINGKLN RVIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVE
DTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESI
RNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVLLGFIMWACQRGNIRCNI
CI**

REFERENCES

- Air MA (1981), Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(12):7639-7643.
- 5 Boel E et al. (2000), Functional human monoclonal antibodies of all subtypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments. *J Immunol Methods* 239:153-166.
- Brown EG et al. (2001), Pattern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: 10 Identification of functional themes. *PNAS* 98:6883-6888.
- Burton DR and Barbas CF (1994), Human antibodies from combinatorial libraries. *Adv Immunol.* 57:191-280.
- Chou TC and P Talalay (1984), Quantitative analysis of dose-effect relationships: the 15 combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22:27-55.
- De Kruif J et al. (1995a), Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3938.
- 20 De Kruif J et al. (1995b), Selection and application of human single-chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions. *J Mol Biol* 248:97-105.
- Ekiert et al. (2009), Antibody recognition of a highly conserved virus influenza epitope. *Science* 324:246-251.
- 25 Fouchier AM et al. (2005), Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79(5):2814-2822.
- Gocník M. et al. (2007), Antibodies specific to the HA2 glycopolyptide of influenza A virus haemagglutinin with fusion-inhibition

activity contribute to the protection of mice against lethal infection, *J Gen Virol* 88: 951-955.

Huls G et al. (1999), Antitumor immune effector mechanisms recruited by phage display-derived fully human IgG1 e IgA1 monoclonal anticorpos. *Cancer Res* 59:5778-5784.

Östberg L and Pursch E (1983), Human x (Mouse x Human) hybridomas stably producing human anticorpos. *Hybridoma* 2(4): 361-367.

10 Slootstra JW et al. (1996), Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries. *Mol Divers* 1:87-96.

Stropkovská A et al. (2009), Broadly cross-reactive monoclonal anticorpos against HA2 glycopeptide of influenza A virus hemagglutinin do subtipo H3 reduce replication of virus influenza A of human and avian origin. *Acta Virologica* 53: 15-20.

15 The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network (2005), Evolution of H5N1 Avian Virus influenza in Asia. *Emerg Infect Dis* 11:1515-1521.

20 Varečková E. et al. (2003a), Inhibition of fusion activity of influenza A haemagglutinin mediated by HA2-specific monoclonal anticorpos. *Arch Virol* 148: 469-486.

Varečková E. et al. (2003b), A monoclonal antibody specific to the HA2 glycoproteína of influenza A virus haemagglutinin that inhibits its fusion activity reduces replication of the virus. *Acta Virologica* 47: 229-236.

25 Wang T. et al. (2010), Broadly protective monoclonal anticorpos against H3 virus influenza following sequential immunization with different hemagglutinins. *PLoS Pathogens* 6(2): 1-9.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ligação humana isolada capaz de reconhecer e ligar especificamente a um epítopo em proteína de hemaglutinina de influenza (HA), caracterizada pelo fato de que tem atividade neutralizadora contra vírus influenza que compreendem HA do subtipo H3, tal como H3N2 e tendo atividade de neutralização cruzada contra pelo menos um vírus influenza que compreende HA do subtipo H7 e/ou um vírus influenza que compreende HA do subtipo H10.

2. Molécula de ligação isolada de acordo com a reivindicação 1, capaz de reconhecer e ligar especificamente a um epítopo em proteína de hemaglutinina de influenza (HA), tendo atividade neutralizadora contra vírus influenza que compreende HA do subtipo H3, tal como H3N2, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de ligação tem pelo menos atividade neutralizadora contra uma ou mais das cepas H3N2 selecionadas do grupo que consiste de A/Wisconsin/67/2005, A/Hiroshima/52/2005, A/Panama/2007/99 e A/Johannesburg/33/94.

3. Molécula de ligação de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de ligação ainda tem atividade neutralizadora contra a cepa H3N2 A/Hong Kong/1/68.

4. Molécula de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de ligação liga-se a um epítopo que compreende o aminoácido na posição 19, 25, 27, 33 e/ou 34 do polipeptídeo HA2 da proteína H3 HA.

5. Molécula de ligação de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação liga-se ao dito epítopo em HA2, quando o aminoácido na posição 19 é ácido aspártico (D), o aminoácido na posição 25 é glutamina (Q), o aminoácido na posição 27 é glicina (G), o aminoácido na posição 33 é glicina (G) e/ou o aminoácido na posição 34 é glutamina.

6. Molécula de ligação de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação não liga ao dito epítipo em HA2 quando um ou mais dos aminoácidos foram mudados.

5 7. Molécula de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação é capaz de evitar *in vitro* a clivagem da tripsina da molécula precursora H3 HA HA0 em HA1 e HA2.

10 8. Molécula de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação é capaz de evitar a mudança conformacional da proteína H3 HA requerida para a fusão da membrana viral com a membrana endossômica de uma célula infectada.

15 9. Molécula de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação não é capaz de ligar-se a e neutralizar o vírus influenza A que compreende HA do subtipo H1, tal como H1N1.

10. Molécula de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação é selecionada do grupo que consiste de:

20 a) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 109, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 110 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 111, e uma região de CDR1 de cadeia leve de SEQ ID N°: 112; uma região de CDR2 de cadeia leve de SEQ ID N°: 113 e uma região de CDR3 de cadeia leve de SEQ ID N°: 114,

25 b) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 138, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 139 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 140, e uma região de CDR1 de cadeia leve de SEQ ID N°: 141; uma

região de CDR2 de cadeia leve de SEQ ID N°: 142 e uma região de CDR3 de cadeia leve de SEQ ID N°: 143

5 c) uma molécula de ligação que compreende uma região CDR1 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 144, uma região CDR2 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 145 e uma região de CDR3 de cadeia pesada da SEQ ID N°: 146; e uma região de CDR1 de cadeia leve de SEQ ID N°: 147; uma região de CDR2 de cadeia leve de SEQ ID N°: 148 e uma região de CDR3 de cadeia leve de SEQ ID N°: 149

10 11. Molécula de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de ligação é um anticorpo monoclonal humano.

12. Molécula de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, caracterizada pelo fato de que é para o uso como um medicamento.

15 13. Molécula de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, caracterizada pelo fato de que é para o uso como um medicamento no diagnóstico, tratamento terapêutico e/ou profilático de infecção por influenza causada por vírus influenza que compreende HA do subtipo H3, tal como H3N2.

20 14. Variante funcional da molécula de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, caracterizada pelo fato de que a variante funcional tem atividade neutralizadora contra um vírus influenza que compreende HA do subtipo H3, tal como H3N2.

25 15. Imunoconjugado, caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ligação como definida nas reivindicações de 1 a 13 ou uma variante funcional como definida na reivindicação 14, o imunoconjugado ainda compreendendo compreende pelo menos um rótulo.

16. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a molécula de ligação como definida nas reivindicações de 1 a 13

e/ou uma variante funcional como definida na reivindicação 14 e/ou um imunocombinado como definido na reivindicação 15 e um excipiente farmacologicamente aceitável.

5 17. Uso da molécula de ligação como definida nas reivindicações de 1 a 13 e/ou uma variante funcional como definida na reivindicação 14 e/ou um imunocombinado como definido na reivindicação 15 caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para o diagnóstico, profilaxia, e/ou tratamento de uma infecção por vírus influenza.

10 18. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a infecção por influenza é causada por vírus influenza que compreende HA do H3subtipo H3, tal como H3N2.

19. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos uma molécula de ligação adicional.

15 20. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que a molécula de ligação adicional é capaz de neutralizar o vírus influenza que compreende HA do subtipo H1 e H5, tal como H1N1 e H5N1 ou uma variante funcional deste.

20 21. Composição farmacêutica compreendendo pelo menos duas moléculas de ligação de neutralização do vírus influenza, caracterizada pelo fato de que a pelo menos uma molécula de ligação é capaz de neutralizar um ou mais subtipos de vírus influenza do grupo filogenético 1 e em que pelo menos uma molécula de ligação é capaz de neutralizar um ou mais subtipos de vírus influenza do grupo filogenético 2.

25 22. Composição farmacêutica compreendendo pelo menos duas moléculas de ligação que neutralizam o vírus influenza, caracterizada pelo fato de que a pelo menos uma molécula de ligação é capaz de neutralizar vírus influenza que compreende HA do subtipo H1 e/ou H5 e em que pelo menos uma molécula de ligação é capazes de neutralizar o vírus influenza que

compreende HA do subtipo H3, H7 e/ou H10.

23. Molécula de ácido nucléico, caracterizada pelo fato de que codifica a molécula de ligação de como definida nas reivindicações de 1 a 13 ou uma variante funcional como definida na reivindicação 14.

5 24. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos uma molécula de ácido nucléico como definida na reivindicação 24.

25. Hospedeiro, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um vetor como definido na reivindicação 28.

10 26. Hospedeiro de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o hospedeiro é uma célula humana.

27. Método para produzir uma molécula de ligação como definida nas reivindicações de 1 a 13 ou uma variante funcional como definida na reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

15 a) cultivar um hospedeiro como definido na reivindicação 25 ou 36 sob condições condutoras para a expressão da molécula de ligação ou variante funcional e, opcionalmente,

b) recuperar a molécula de ligação ou variante funcional expressadas.

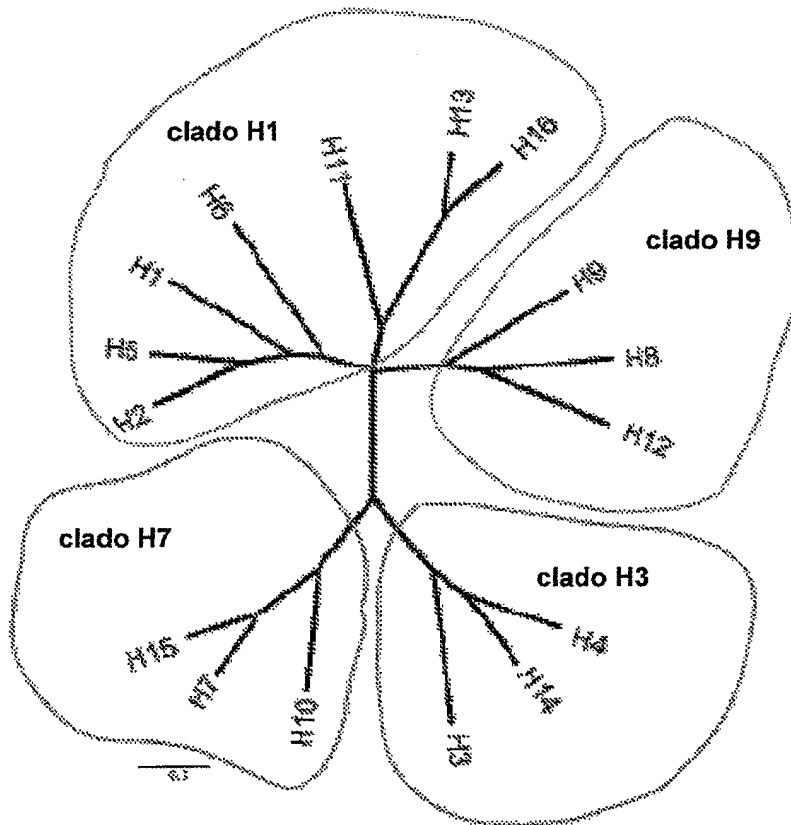


FIG. 1

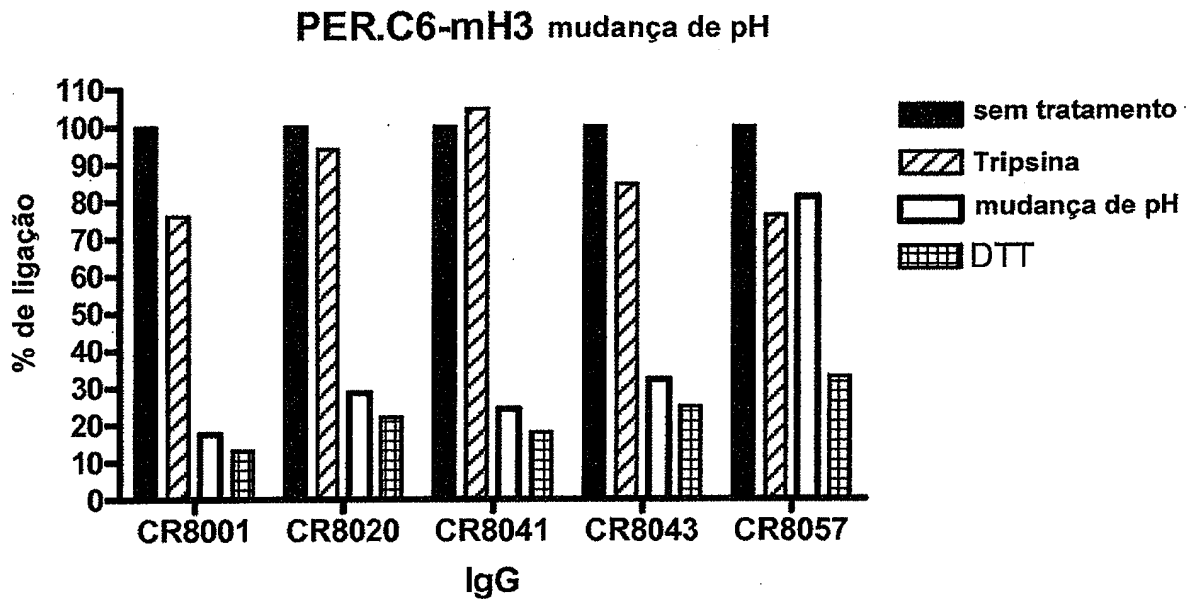


FIG. 2

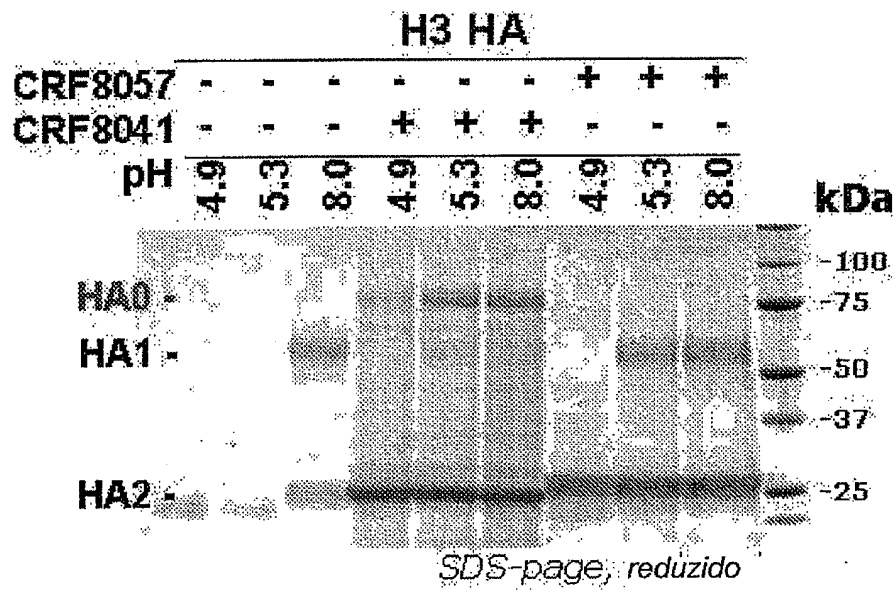


FIG. 3

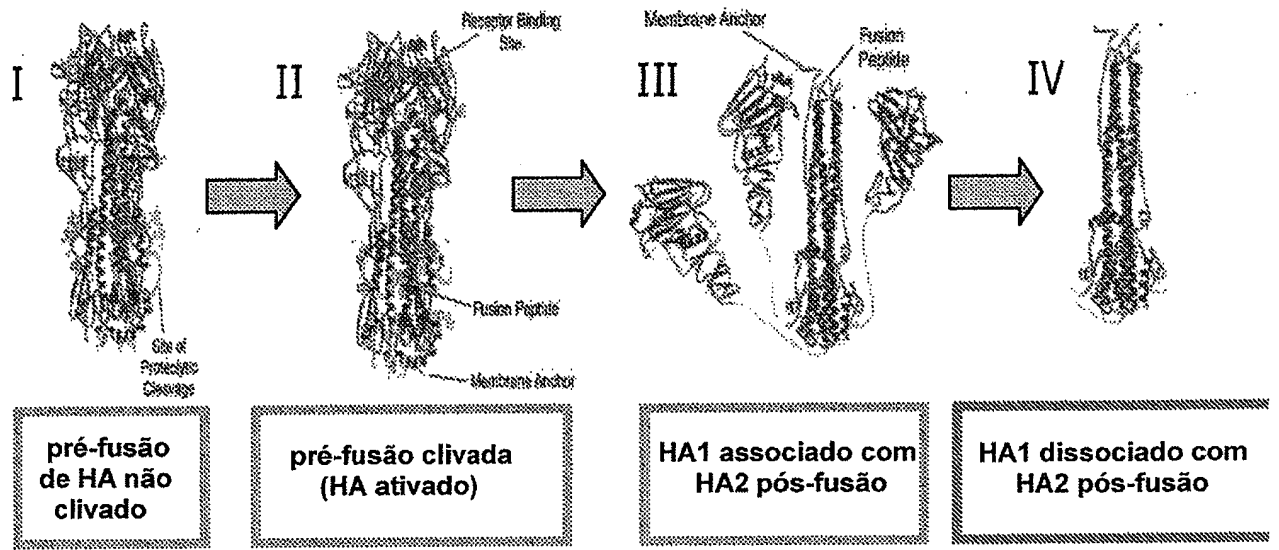


FIG. 4

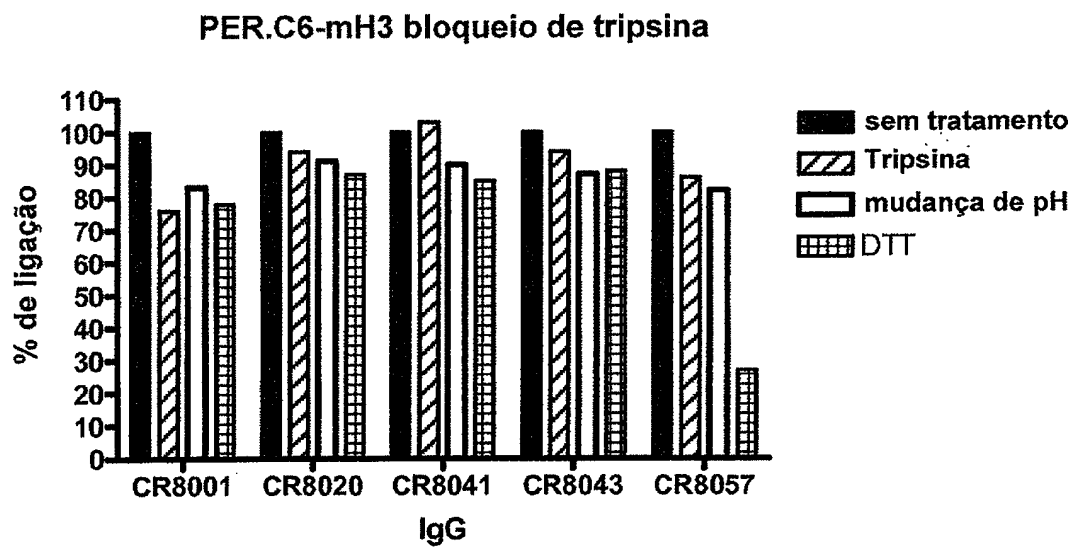


FIG. 5

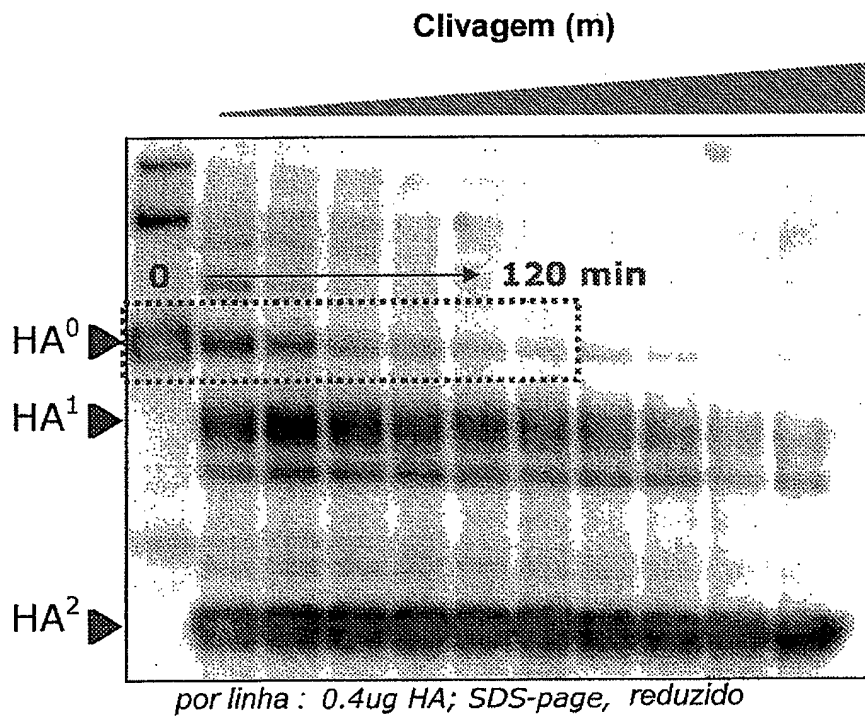
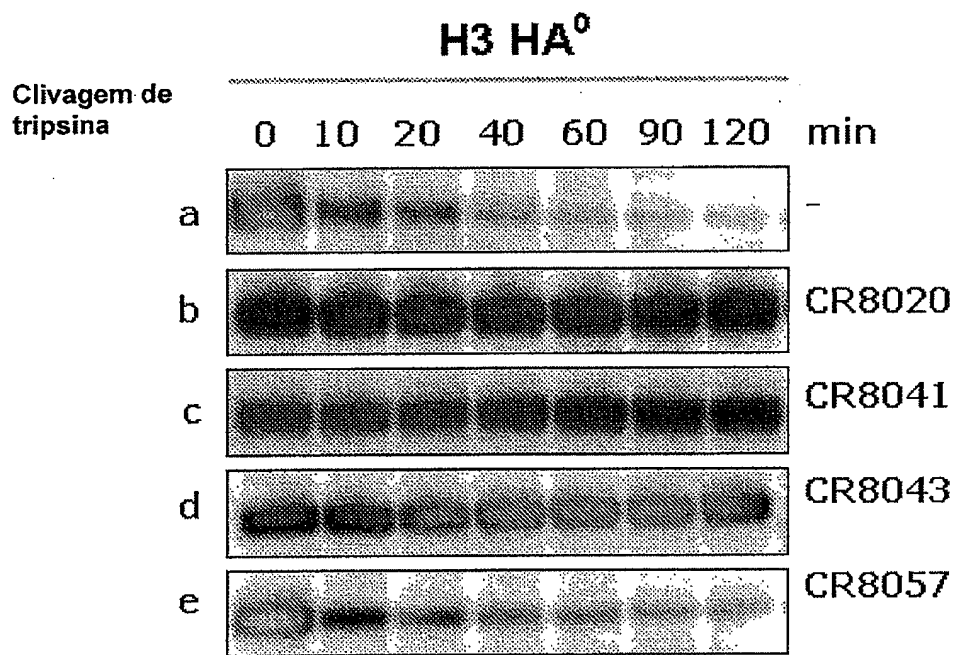


FIG. 6



por linha : 0.4ug HA, 2.5ug IgG; SDS-page, reduzido

FIG. 7

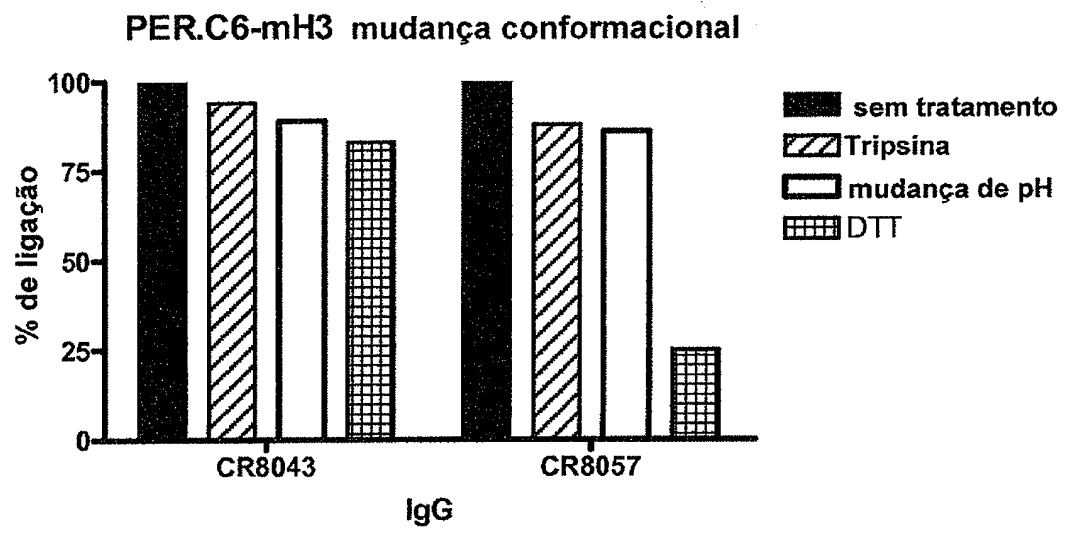


FIG. 8

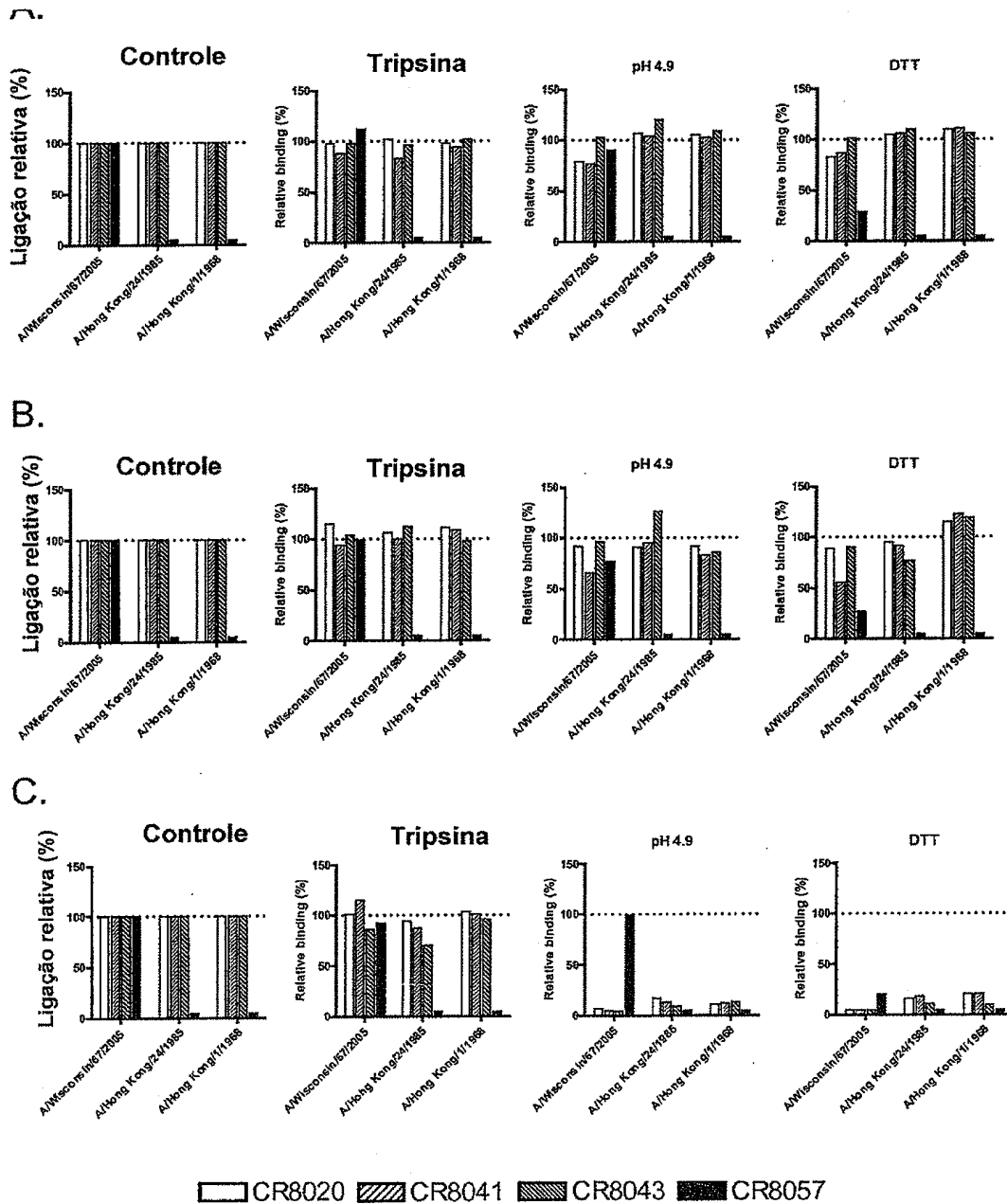
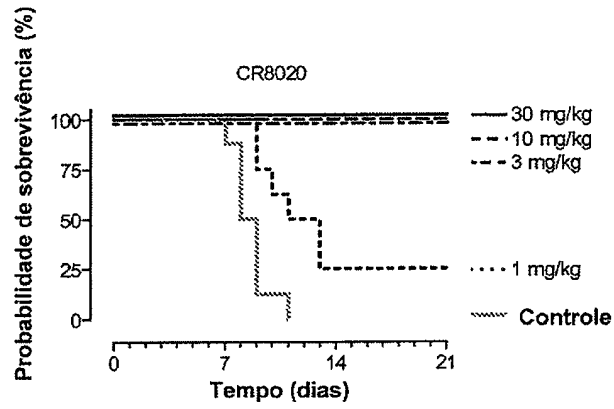
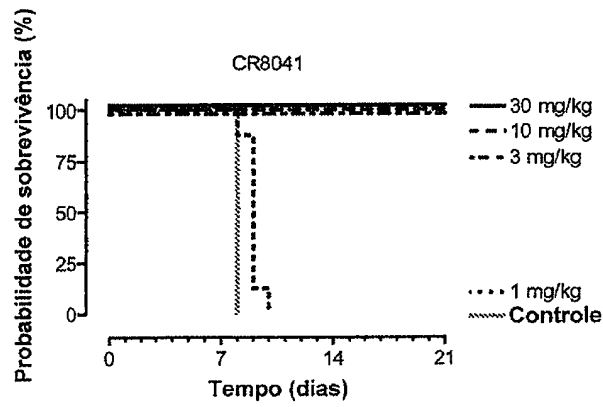


FIG. 9

A.



B.



C.

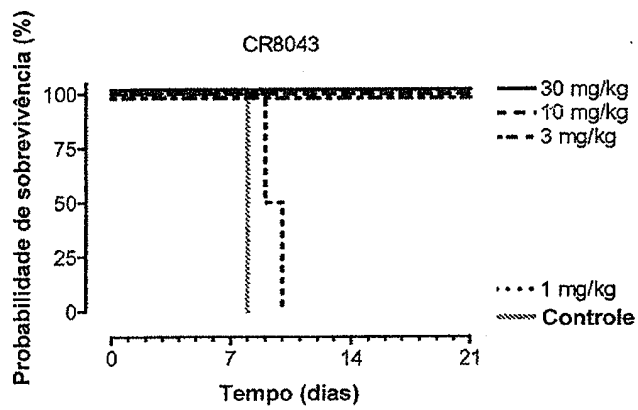
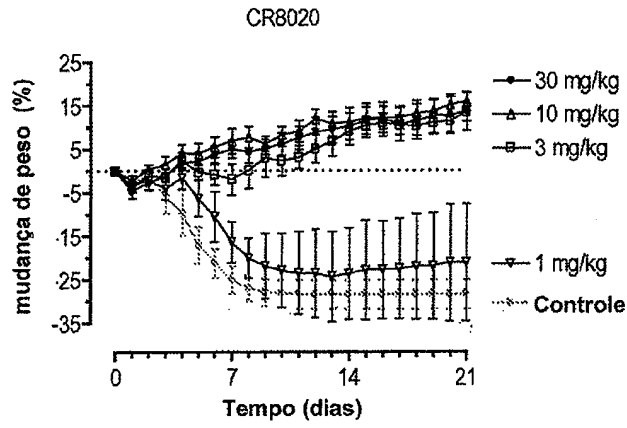
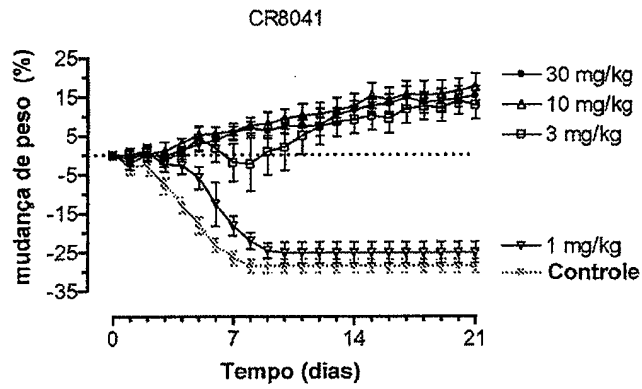


FIG. 10

A.



B.



C.

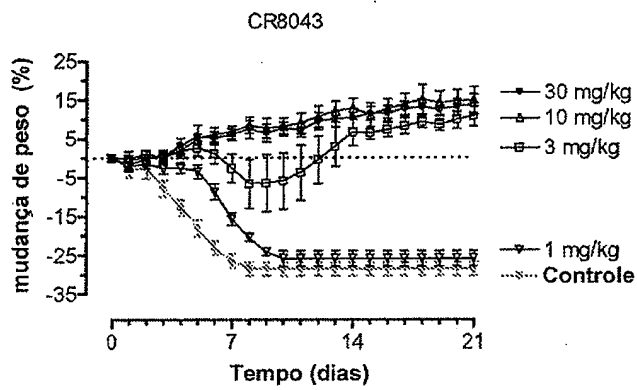
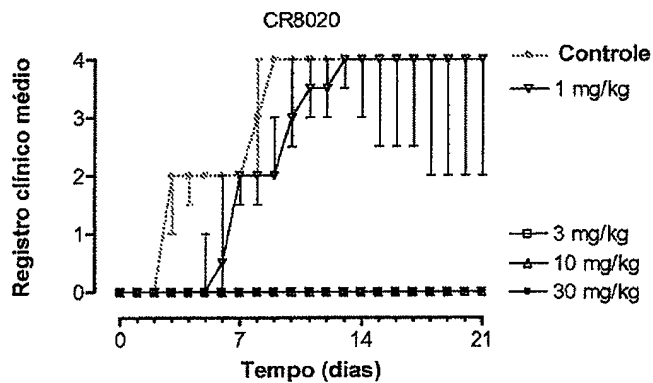
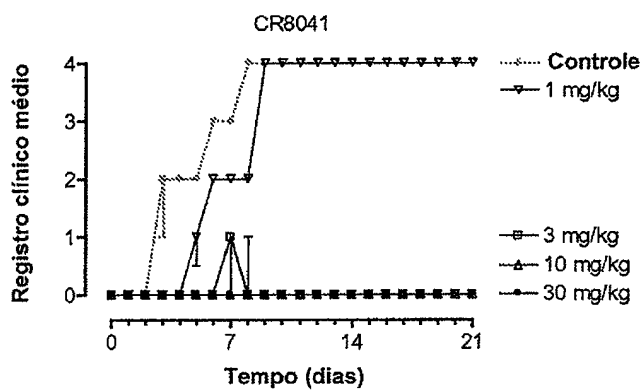


FIG. 11

A.



B.



C.

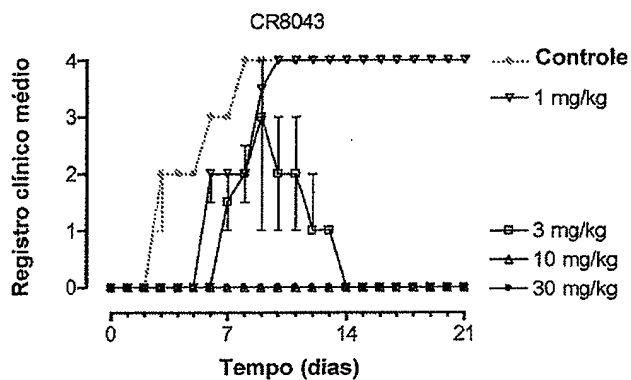
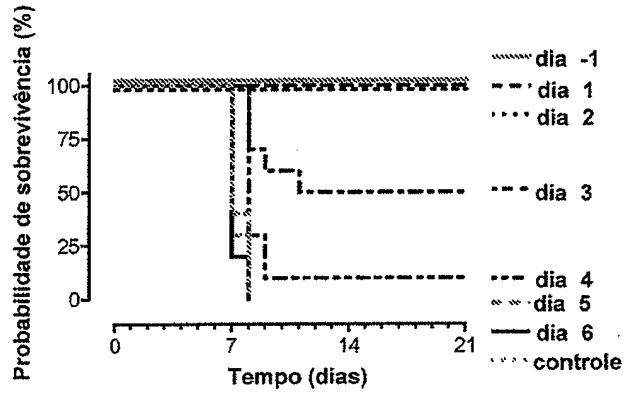
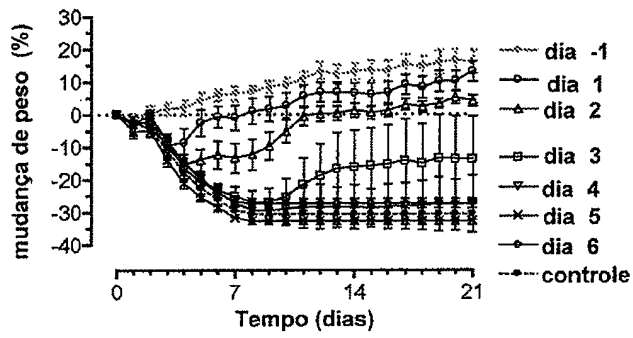


FIG. 12

A.



B.



C.

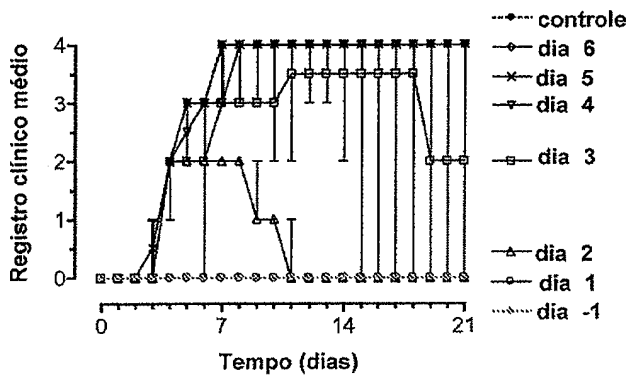
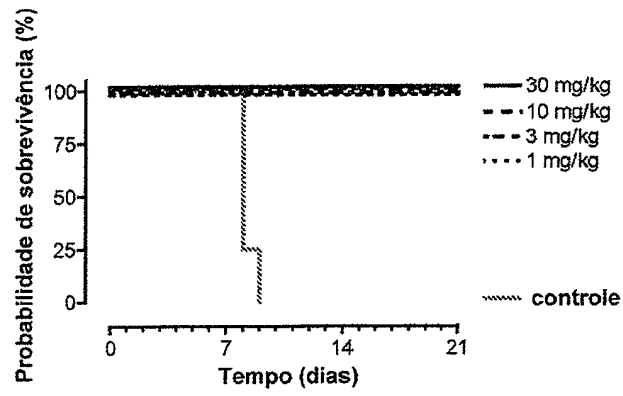
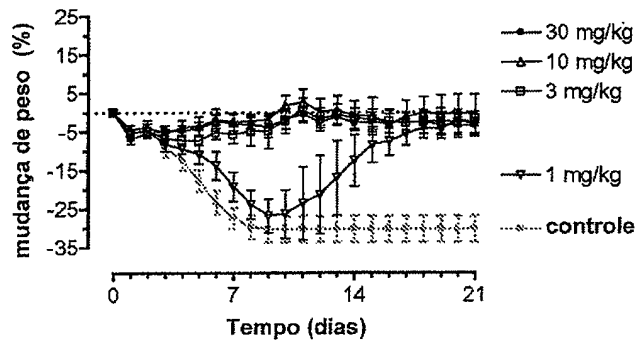


FIG. 13

A.



B.



C.

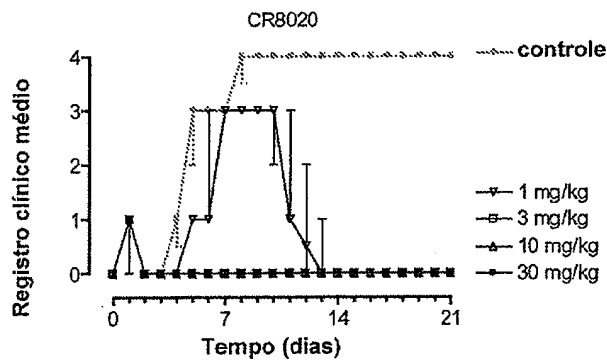


FIG. 14

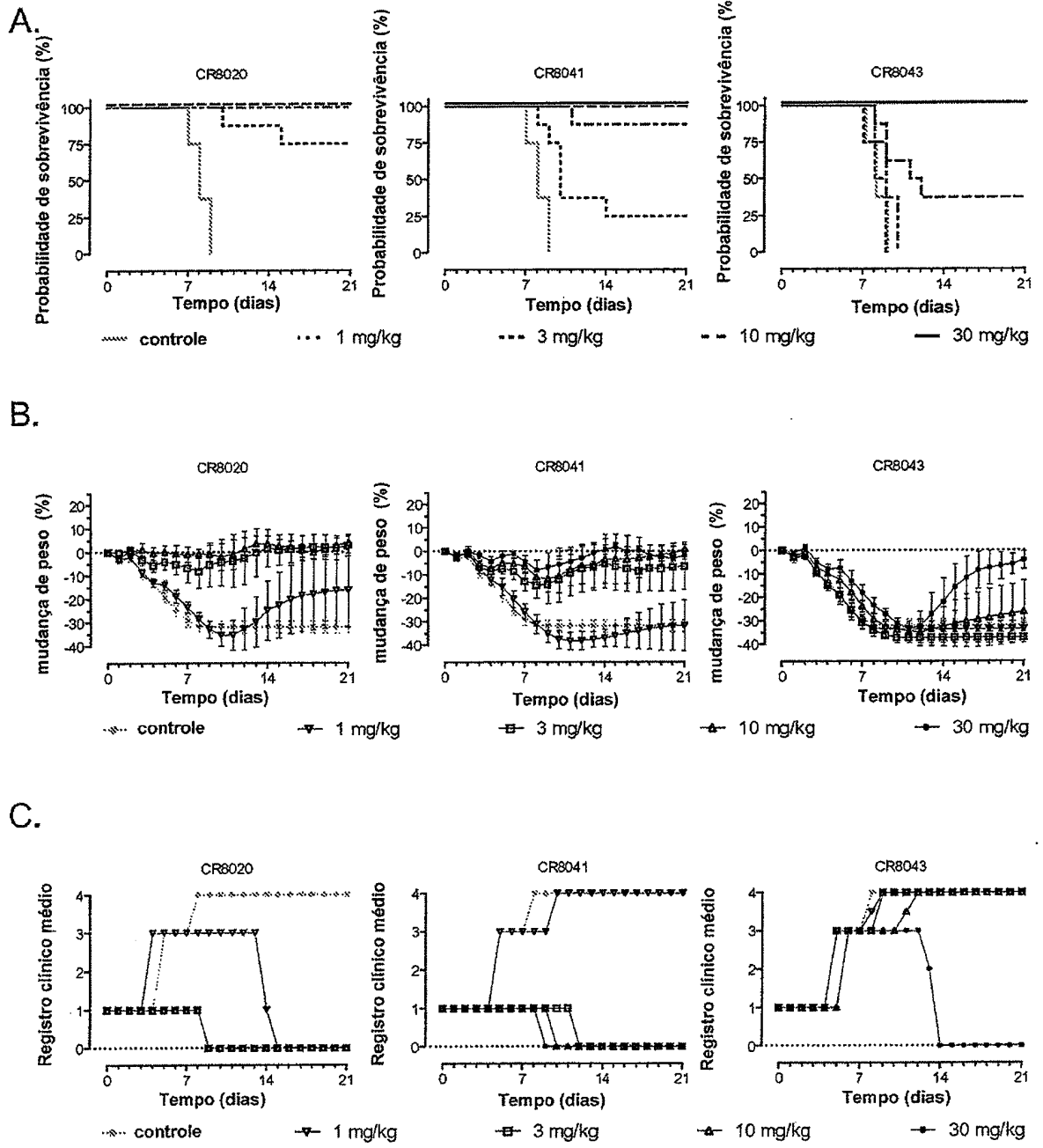
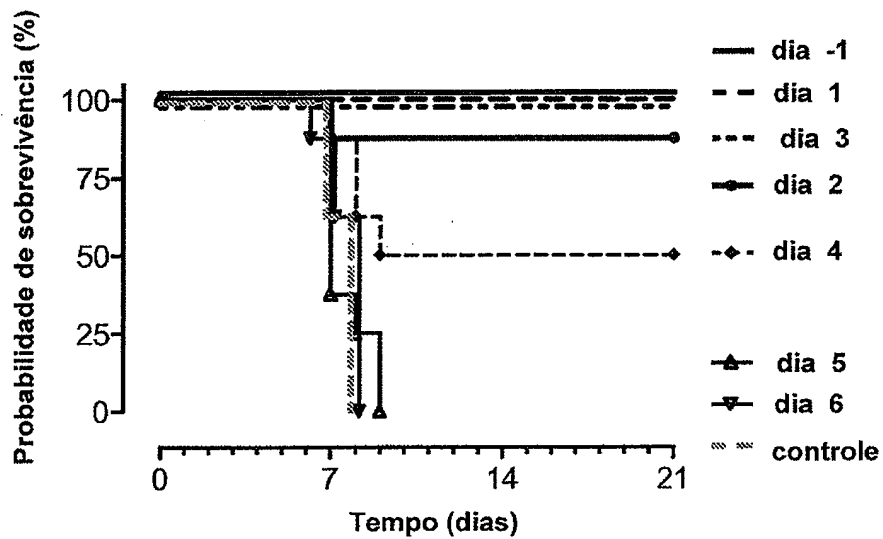


FIG. 15

A.



B.

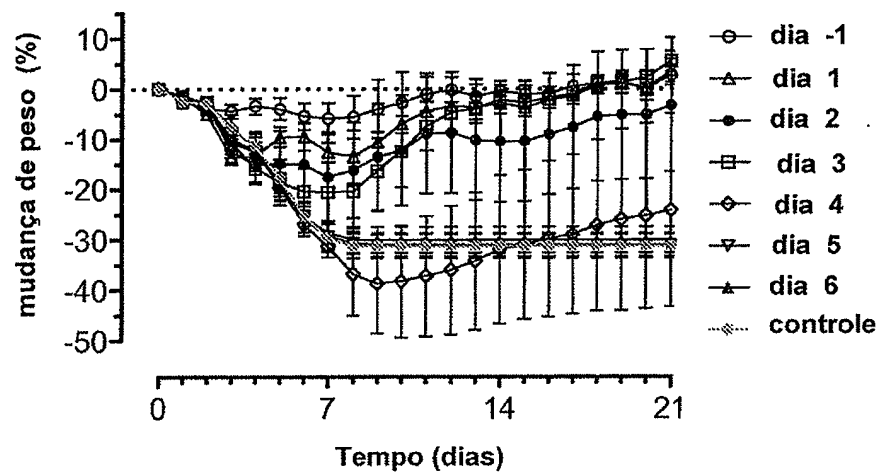


FIG. 16

C.

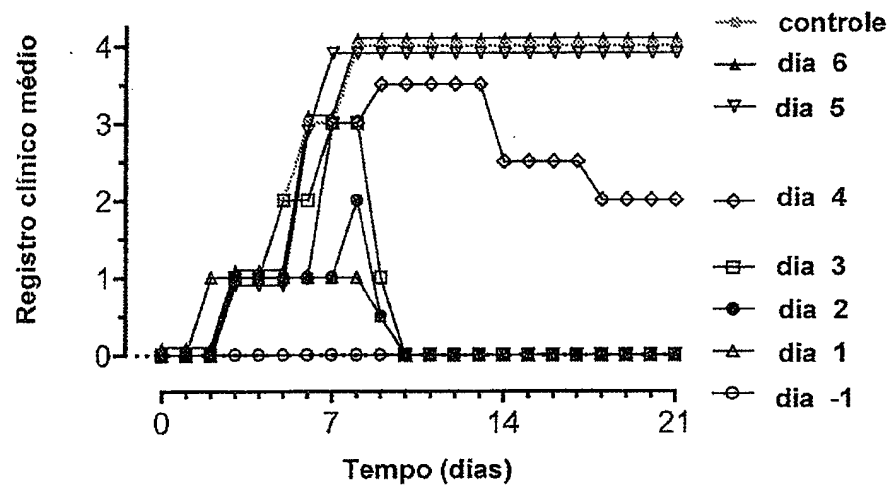


FIG. 16 cont

RESUMO

“MOLÉCULA DE LIGAÇÃO, VARIANTE FUNCIONAL DA
MOLÉCULA DE LIGAÇÃO, IMUNOCONJUGADO, COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA, USO DA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO, MOLÉCULA
5 DE ÁCIDO NUCLÉICO, VETOR, HOSPEDEIRO, E, MÉTODO PARA
PRODUZIR UMA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO”

A presente invenção diz respeito a moléculas de ligação, tais
anticorpos monoclonais humanos, que ligam-se ao vírus influenza que
compreende HA do subtipo H3, tal como H3N2 e tem um ampla atividade
10 neutralizadora contra tais vírus influenza. A divulgação fornece moléculas de
ácido nucléico que codificam os anticorpos, suas sequências e composições
que compreendem os anticorpos e métodos de identificar ou produzir os
anticorpos. Os anticorpos podem ser usados no diagnóstico, profilaxia e/ou
tratamento de uma infecção por vírus influenza H3N2. Em uma forma de
15 realização preferida, os anticorpos fornecem proteção do subtipo cruzado, tal
que as infecções com subtipos de influenza com base em H3, H7, e/ou H10
podem ser evitadas e/ou tratadas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



ACD3090D90222168

Campo 2



79BDB92E7E2AAE83

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 112745e004.txt
- Data de Geração do Código: 17-10-2011
- Hora de Geração do Código: 15:04:12
- Código de Controle:
 - Campo 1: ACD3090D90222168
 - Campo 2: 79BDB92E7E2AAE83

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized, cursive letter 'A'.