

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 934 102**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2010** **PCT/EP2010/056217**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2010** **WO10130636**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2010** **E 10718169 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2022** **EP 2430046**

54 Título: **Moléculas de unión humanas que pueden neutralizar el virus de la gripe H3N2 y usos de las mismas**

30 Prioridad:

11.05.2009 EP 09159947

11.05.2009 US 215890 P

20.01.2010 EP 10151155

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

16.02.2023

73 Titular/es:

JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V.

(100.0%)

Archimedesweg 4

2333 CN Leiden, NL

72 Inventor/es:

THROSBY, MARK;

FRIESEN, ROBERT HEINZ EDWARD;

KWAKS, THEODORUS HENDRIKUS JACOBUS;

JONGENEELN, MANDY ANTONIA CATHARINA;

BAKKER, ADRIANUS QUIRINUS;

BEAUMONT, TIM;

KWAKKENBOS, MARK y

SPITS, HERGEN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 934 102 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas de unión humanas que pueden neutralizar el virus de la gripe H3N2 y usos de las mismas

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a medicina. La invención, en particular, se refiere a moléculas de unión humanas que pueden neutralizar diversos subtipos de de la gripe A, incluyendo moléculas de unión neutralizantes contra virus de la gripe que comprenden HA del subtipo H3, tal como el virus de la gripe H3N2. En particular, la invención se refiere al diagnóstico, profilaxis y/o tratamiento de una infección por un virus de la gripe, que comprende HA del subtipo H3, en particular el virus de la gripe H3N2.

Antecedentes de la invención

Los virus de la gripe son ortomixovirus de ARN y consisten en tres tipos, A, B y C. Mientras que los virus de la gripe de los tipos B y C son patógenos predominantemente humanos, los virus de la gripe A infectan una amplia diversidad de aves y mamíferos, incluyendo seres humanos, caballos, mamíferos marinos, cerdos, hurones y pollos. En los animales, la mayoría de los virus de la gripe A provocan infecciones localizadas leves de las vías respiratorias y el tubo intestinal. Sin embargo, también existen subtipo de la gripe A altamente patógenos, tales como H5N1, que provocan infecciones sistémicas en aves de corral, en las que la mortalidad puede alcanzar el 100 %. Varios subtipos de virus de la gripe A también pueden provocar enfermedad grave en el ser humano.

Los virus de la gripe A pueden clasificarse en subtipos basándose en variaciones alélicas en regiones antigénicas de dos genes que codifican glucoproteínas superficiales, concretamente, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), que son necesarias para la fijación del virus y la liberación celular. Otras proteínas víricas importantes incluyen la nucleoproteína, la proteína estructural de la nucleocápside, proteínas de membrana (M1 y M2), polimerasas (PA, PB y PB2) y proteínas no estructurales (NS1 y NS2). Actualmente, se conocen dieciséis subtipos de variantes antigénicas de HA (H1-H16) y nueve de NA (N1-N9) en el virus de la gripe A. Los subtipos del virus de la gripe pueden clasificarse además por referencia a su grupo filogenético. El análisis filogenético (Fouchier *et al.*, 2005) ha demostrado una subdivisión de la HA que coincide en dos grupos principales (Air, 1981): entre otros, los subtipos H1, H2, H5 y H9 en el grupo filogenético 1 y, entre otros, los subtipos H3, H4 y H7 en el grupo filogenético 2 (figura 1).

Solamente algunos de los subtipos de gripe A (es decir, H1N1, H1N2 y H3N2) circulan entre las personas, pero se han identificado todas las combinaciones de los subtipos de 16 HA y 9 NA en especies de aves. Los animales infectados con gripe A a menudo actúan como depósito para los virus de la gripe y se ha demostrado que determinados subtipos cruzan la barrera de especies a los seres humanos, tal como la cepa H5N1 de la gripe A altamente patógena.

La infección por gripe es una de las enfermedades más comunes conocidas para el ser humano, que provoca entre tres y cinco millones de casos de enfermedad grave y entre 250 000 y 500 000 muertes cada año en todo el mundo. La gripe se propaga rápidamente en epidemias estacionales, que afectan a un 5-15 % de la población, y la carga en los costes por asistencia sanitaria y la productividad perdida son caros (Organización Mundial de la Salud (OMS)). La hospitalización y las muertes se producen principalmente en grupos de alto riesgo (ancianos, enfermos crónicos).

La epidemia anual de gripe se produce cuando se alteran las propiedades antigénicas de la proteína superficial vírica HA y NA. El mecanismo de antigenicidad alterada es doble: variaciones antigénicas mayores, provocadas por reordenamiento genético entre virus humanos y animales después de infección doble de células hospedadoras, lo que puede provocar una pandemia; y variaciones antigénicas menores, provocadas por pequeños cambios en las proteínas HA y NA en la superficie del virus, lo que puede provocar una epidemia de gripe. La aparición de cepas víricas variantes mediante estos dos mecanismos es la causa de las epidemias de gripe. Tres veces en el último siglo, los virus de la gripe A han experimentado cambios genéticos importantes principalmente en su componente HA, provocando pandemia global y grandes daños en términos tanto de enfermedad como de muertes. La pandemia más tristemente célebre fue la "gripe de 1918", provocada por el virus de la gripe H1N1, que afectó a grandes partes de la población mundial y se cree que provocó la muerte de al menos 40 millones de personas en 1918-1919. Más recientemente, se produjeron otras dos pandemias de gripe A, en 1957 ("gripe asiática", provocada por el virus de la gripe H2N2) y 1968 ("gripe de Hong Kong", provocada por el virus de la gripe H3N2), y provocaron morbilidad y mortalidad significativas globalmente. En contraste con las actuales epidemias gripales estacionales, estas pandemias se asociaron con resultados graves entre personas jóvenes sanas.

Las estrategias actuales para lidiar con las epidemias gripales anuales incluyen vacunación anual, preferiblemente generando protección cruzada heterotípica. Sin embargo, como se indica anteriormente, los virus de la gripe en circulación en seres humanos están sujetos a cambios antigénicos permanentes que requieren adaptación anual de la formulación de la vacuna contra la gripe para garantizar la mayor coincidencia posible entre las cepas de la vacuna contra la gripe y las cepas de la gripe circulantes.

Aunque la vacunación anual con la vacuna contra la gripe es la mejor manera de prevenir la gripe, los fármacos antivíricos, tales como oseltamivir (Tamiflu®) pueden ser eficaces para la prevención y tratamiento de la gripe. Sin embargo, está aumentando el número de cepas de virus de la gripe que muestran resistencia contra dicho oseltamivir.

Una estrategia alternativa es el desarrollo de medios profilácticos o terapéuticos basados en anticuerpos para neutralizar diversos virus estacionales de la gripe. La diana principal de los anticuerpos neutralizantes que protegen contra infección por virus de la gripe es la cabeza globular (parte HA1) de la proteína HA vírica que contiene el sitio de unión al receptor, pero que está sujeta a evolución genética continuada con sustituciones aminoacídicas en sitios de unión al anticuerpo (variaciones antigénicas menores). Recientemente se han identificado anticuerpos neutralizantes cruzados que reconocen la región de tronco más conservada de HA de virus de la gripe A del grupo filogenético 1 (por ejemplo, H1 y H5) (por ejemplo, el documento WO2008/028946). Sin embargo, ha habido éxito limitado en la identificación de anticuerpos que neutralicen uno o más subtipos del virus de la gripe A del grupo filogenético 2, tales como virus H3, y su amplitud de neutralización es estrecha y su potencia baja.

Se han descrito anticuerpos que reconocen específicamente cepas del virus de la gripe H3N2. Por tanto, un anticuerpo monoclonal humano, C28, que puede unirse a y neutralizar varias cepas de la gripe H3N2 entre los años 1968 y 1980 se ha descrito por Ostberg y Pursch (1983). Wang *et al.* (2010), han descrito un anticuerpo murino anti-HA2 que neutraliza virus H3 que abarcan varias décadas, pero que se demostró que no neutraliza ningún virus que no sea de subtipo H3.

Anticuerpos murinos anti-HA2 con reactividad cruzada que reconocen HA del subtipo H3, así como del subtipo H4 y H7, y que pueden reducir *in vitro* la replicación del virus de la gripe de los virus de la gripe H3 y H4 se han descrito por Stropkovská *et al.*, (2009). Se demostró que la accesibilidad de los epítopos HA2 a estos anticuerpos en el virus natural era baja, y que los anticuerpos tienen una mayor reactividad con HA después de su escisión con tripsina y tratamiento a pH 5 (Varečková *et al.*, 2003a), lo que puede explicar la observación de que la inhibición *in vitro* de la replicación del virus (Varečková *et al.*, 2003b), así como la potencia *in vivo* de estos anticuerpos era relativamente baja (Gocník *et al.*, 2007).

En el documento WO2009/115972, se ha divulgado un anticuerpo monoclonal humano, Fab28, que reconoce un epítipo en la región de tronco de HA y presenta una actividad neutralizante contra H1N1, pero menos actividad neutralizante contra H3N2.

En vista de la gravedad de la enfermedad respiratoria provocada por determinados virus de la gripe A, y la amenaza siempre existente de una posible pandemia, así como el alto impacto económico de las epidemias estacionales, hay una necesidad persistente de un medio eficaz para la prevención y tratamiento de los diversos subtipos de la gripe A. Por tanto, hay una necesidad de moléculas de unión, preferiblemente moléculas de unión humanas ampliamente neutralizantes, que pueden neutralizar los subtipos del virus de la gripe estacional, incluyendo virus de la gripe que comprenden HA del subtipo H3, preferiblemente H3N2, y que no tienen o tienen menos inconvenientes que los anticuerpos conocidos en la técnica anterior.

La presente invención proporciona estas moléculas de unión que pueden usarse en medicina, en particular para diagnóstico, prevención y/o tratamiento de infección con virus de la gripe que comprende HA del subtipo H3, preferiblemente infecciones por H3N2. Algunas de las moléculas de unión de la invención son únicas en su amplitud de actividad neutralizante dentro del subtipo H3. Por tanto, algunas de las moléculas de unión identificadas en este documento pueden neutralizar varias cepas, incluyendo al menos una o más cepas recientes dentro del subtipo H3N2 y pueden usarse como agente profiláctico y/o de tratamiento universal para la gripe estacional, independientemente de la cepa de gripe H3N2 causante. Al menos algunas de las moléculas de unión pueden prevenir *in vitro* la escisión de la molécula HA0 precursora de HA mediante tripsina. Además, al menos algunas de las moléculas de unión de la presente invención pueden prevenir el cambio conformacional de la proteína HA, que se cree que está implicada en la fusión membranaria de la membrana del virus de la gripe y la membrana del endosoma de una célula infectada. Además, al menos algunas moléculas de unión de la invención son únicas en el sentido de que también pueden neutralizar de forma cruzada virus de la gripe de al menos otro subtipo, incluyendo virus de la gripe que comprenden HA de los subtipos H7 y/o H10 y, por tanto, pueden usarse como agente profiláctico, de diagnóstico y/o de tratamiento universal para virus de la gripe, incluso independientemente del subtipo de gripe causante.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra un árbol filogenético de secuencias de aminoácidos al nivel de subtipo. Se indica la división de subtipos por grupo. El clado H1, que comprende, entre otros, los subtipos H1, y el clado H9, que comprende los subtipos H9, forman el grupo filogenético 1, y el H7, que comprende entre otros los subtipos H7 y el clado H3, que comprende entre otros los subtipos H3, forman el grupo filogenético 2.

La figura 2 es un diagrama de barras que muestra la unión de IgG1 a rHA H3 expresada en superficie, medida por análisis FACS, después de tratamiento secuencial con tripsina (barras a rayas), medio tamponado a pH 4,9 (barras blancas rellenas) y DTT (barras cruzadas) y expresada como porcentaje de unión a rHA sin tratar (barras negras rellenas).

La [figura 3](#) muestra los resultados de un ensayo de susceptibilidad a proteasa *in vitro*. Las muestras se procesaron en un gel de BisTris al 4-12 % en tampón MOPS 1x. Las bandas de proteína se visualizaron mediante tinción con azul coloidal.

La [figura 4](#) es una representación esquemática de las diferentes conformaciones de la proteína HA durante el proceso de infección.

La [figura 5](#) es un diagrama de barras que muestra la unión de los mAb contra H3 a células que expresan HA después de diferentes tratamientos, medida por análisis FACS, después de tratamiento secuencial con tripsina (barras a rayas), medio tamponado a pH 4,9 (barras blancas rellenas) y DTT (barras cruzadas) y expresada como porcentaje de unión a rHA sin tratar (barras negras rellenas).

La [figura 6](#) muestra el resultado del experimento de transcurso temporal descrito en el ejemplo 11, para determinar el tiempo de incubación de HA con tripsina para conseguir escisión de HA H3.

La [figura 7](#) muestra los resultados de digestión con tripsina de muestra de HA H3 preincubadas con mAb, como se describe en el ejemplo 11.

La [figura 8](#) es un diagrama de barras que demuestra que CR8043 inhibe el cambio conformacional inducido por pH en HA H3.

La [figura 9](#) muestra que CR8020 y CR8041 también pueden bloquear el cambio conformacional inducido por pH de HA: A. mAb añadidos antes de escisión con tripsina; B. mAb añadidos después de escisión con tripsina; C. mAb añadidos después de todos los tratamientos.

La [figura 10](#) muestra las curvas de probabilidad de supervivencia de Kaplan-Meier. El anticuerpo se administró por vía intravenosa en el día -1 antes de exposición usando un intervalo de dosis de 30 a 1 mg/kg. El Ab de control se administró a 30 mg/kg (gris), seguido de una exposición letal en el día 0 con 25 DL50 de A/HK/1/68-MA20 (H3N2). CR8020 (A) se ensayó en un estudio separado de CR8041 (B) y CR8043 (C), que se evaluaron en 1 experimento. Por lo tanto, se usa el mismo grupo de anticuerpo de control para B y C.

La [figura 11](#) muestra el cambio medio de peso corporal (%) con respecto al día 0. El anticuerpo se administró por vía intravenosa en el día -1 antes de exposición usando un intervalo de dosis de 30 a 1 mg/kg. El Ab de control se administró a 30 mg/kg (gris), seguido de una exposición letal en el día 0 con 25 DL50 de A/HK/1/68-MA20 (H3N2). Las barras representan el IC del 95 % de la media. Si un ratón moría/se sacrificaba durante el seguimiento del estudio, el último peso corporal observado se llevaba adelante. CR8020 (A) se ensayó en un estudio separado de CR8041 (B) y CR8043 (C), que se evaluaron en 1 experimento. Por lo tanto, se usa el mismo grupo de anticuerpo de control para B y C.

La [figura 12](#) muestra la mediana de puntuación clínica. El anticuerpo se administró por vía intravenosa en el día -1 antes de exposición usando un intervalo de dosis de 30 a 1 mg/kg. El Ab de control se administró a 30 mg/kg (gris), seguido de una exposición letal en el día 0 con 25 DL50 de A/HK/1/68-MA20 (H3N2). Las barras representan los intervalos intercuartiles. CR8020 (A) se ensayó en un estudio separado de CR8041 (B) y CR8043 (C), que se evaluaron en 1 experimento. Por lo tanto, se usa el mismo grupo de anticuerpo de control para B y C. Explicación de la puntuación clínica: 0 = sin signos clínicos; 1 = pelaje áspero; 2 = pelaje áspero, menos reactivo, pasivo durante la manipulación; 3 = pelaje áspero, enrollado, respiración dificultosa, pasivo durante la manipulación; 4 = pelaje áspero, enrollado, respiración dificultosa, no rueda de nuevo sobre el estómago cuando se tumba sobre su lomo. Los ratones observados con puntuación clínica 4 se sacrificaron en el mismo día.

La [figura 13](#) demuestra la eficacia terapéutica de mAb CR8020 en el modelo de exposición letal de ratón con gripe A/HK/1/68-MA20 (H3N2). Se administró una sola dosis de mAb CR8020 (15 mg/kg) por vía intravenosa en el día -1 antes de la exposición o en el día 1, 2, 3, 4, 5 o 6 después de la exposición en ratones 129X1/SvJ (n = 10/grupo). Se administró mAb de control (15 mg/kg) en el día 1 después de la exposición. Los ratones se expusieron en el día 0 con 25 DL50 de A/HK/1/68-MA20 (H3N2) y se controlaron durante 21 días. Panel A: Curvas de probabilidad de supervivencia de Kaplan-Meier. Panel B: Cambio medio de peso corporal (%) con respecto al día 0. Las barras representan el IC del 95 % de la media. Si un ratón moría/se sacrificaba durante el seguimiento del estudio, el último peso corporal observado se llevaba adelante. Panel C: Mediana de puntuación clínica. Las barras representan los intervalos intercuartiles. 0 = sin signos clínicos; 1 = pelaje áspero; 2 = pelaje áspero, menos reactivo, pasivo durante la manipulación; 3 = pelaje áspero, enrollado, respiración dificultosa, pasivo durante la manipulación; 4 = pelaje áspero, enrollado, respiración dificultosa, no rueda de nuevo sobre el estómago cuando se tumba sobre su lomo. Los ratones observados con puntuación clínica 4 se sacrificaron en el mismo día.

La figura 14 muestra la eficacia profiláctica de mAb CR8020 en el modelo de exposición letal de ratón con gripe A/CH/NL/621557/03 (H7N7) adaptada a ratón. A: Curvas de probabilidad de supervivencia de Kaplan-Meier. Panel B: Cambio medio de peso corporal (%) con respecto al día 0. Las barras representan el IC del 95 % de la media. Si un ratón moría/se sacrificaba durante el seguimiento del estudio, el último peso corporal observado se llevaba adelante. Panel C: Mediana de puntuación clínica. Las barras representan los intervalos intercuartiles. 0 = sin signos clínicos; 1 = pelaje áspero; 2 = pelaje áspero, menos reactivo, pasivo durante la manipulación; 3 = pelaje áspero, enrollado, respiración dificultosa, pasivo durante la manipulación; 4 = pelaje áspero, enrollado, respiración dificultosa, no rueda de nuevo sobre el estómago cuando se tumba sobre su lomo. Los ratones observados con puntuación clínica 4 se sacrificaron en el mismo día.

La figura 15 muestra la eficacia profiláctica de los mAb CR8020, CR8041 y CR8043 en el modelo de exposición letal de ratón con gripe A/CH/NL/621557/03 (H7N7) adaptada a ratón. Los mAb se administraron por vía intravenosa en el día -1 antes de la exposición de ratones Balb/c hembra (n = 8/grupo) usando un intervalo de dosis de 10 a 1 mg/kg (CR8020) o 30 a 1 mg/kg (CR8041 y CR8043). El mAb de control se administró en el día -1 a 30 mg/kg (gris). En el día 0 se administró una exposición letal mediante inoculación intranasal con 25 DL₅₀ de A/CH/NL/621557/03 (H7N7) adaptada a ratón y los ratones se controlaron posteriormente durante 21 días. Panel A: Curvas de probabilidad de supervivencia de Kaplan-Meier. Panel B: Cambio medio de peso corporal (%) con respecto al día 0. Las barras representan el IC del 95 % de la media. Si un ratón moría/se sacrificaba durante el seguimiento del estudio, el último peso corporal observado se llevaba adelante. Panel C: Mediana de puntuación clínica. Las barras representan los intervalos intercuartiles. 0 = sin signos clínicos; 1 = pelaje áspero; 2 = pelaje áspero, menos reactivo, pasivo durante la manipulación; 3 = pelaje áspero, enrollado, respiración dificultosa, pasivo durante la manipulación; 4 = pelaje áspero, enrollado, respiración dificultosa, no rueda de nuevo sobre el estómago cuando se tumba sobre su lomo. Los ratones observados con puntuación clínica 4 se sacrificaron en el mismo día.

La figura 16 muestra la eficacia terapéutica de mAb CR8020 en el modelo de exposición letal de ratón con gripe A/CH/NL/621557/03 (H7N7) adaptada a ratón. Se administró una sola dosis de mAb CR8020 (15 mg/kg) por vía intravenosa en el día -1 antes de la exposición o en el día 1, 2, 3, 4, 5 o 6 después de la exposición en ratones Balb/c hembra (n = 8/grupo). Se administró mAb de control (15 mg/kg) en el día 1 después de la exposición. Los ratones se expusieron en el día 0 con 25 DL₅₀ de gripe A/CH/NL/621557/03 (H7N7) adaptada a ratón y se controlaron durante 21 días. Panel A: Curvas de probabilidad de supervivencia de Kaplan-Meier. Panel B: Cambio medio de peso corporal (%) con respecto al día 0. Las barras representan el IC del 95 % de la media. Si un ratón moría/se sacrificaba durante el seguimiento del estudio, el último peso corporal observado se llevaba adelante. Panel C: Mediana de puntuación clínica. Las barras representan los intervalos intercuartiles. 0 = sin signos clínicos; 1 = pelaje áspero; 2 = pelaje áspero, menos reactivo, pasivo durante la manipulación; 3 = pelaje áspero, enrollado, respiración dificultosa, pasivo durante la manipulación; 4 = pelaje áspero, enrollado, respiración dificultosa, no rueda de nuevo sobre el estómago cuando se tumba sobre su lomo. Los ratones observados con puntuación clínica 4 se sacrificaron en el mismo día.

Descripción de la invención

A continuación se dan definiciones de términos usados en la invención.

El término "incluido" o "incluyendo", como se usa en este documento, se considera seguido de las palabras "sin limitación".

Como se usa en este documento, la expresión "molécula de unión" se refiere a una inmunoglobulina intacta, incluyendo anticuerpos monoclonales, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados o humanos, o a un dominio de unión a antígeno y/o variable que comprende un fragmento de una inmunoglobulina que compite con la inmunoglobulina intacta por la unión específica al compañero de unión de la inmunoglobulina, por ejemplo, H3. Independientemente de la estructura, el fragmento de unión a antígeno se une con el mismo antígeno que reconoce la inmunoglobulina intacta. Un fragmento de unión a antígeno puede comprender un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200 o 250 residuos aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de la molécula de unión.

La expresión "molécula de unión", como se usa en este documento, incluye todas las clases y subclases de inmunoglobulina conocidas en la técnica. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las moléculas de unión pueden dividirse en las cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de estos pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Los fragmentos de unión a antígeno incluyen, entre otros, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, dAb, Fd, fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios bivalentes, anticuerpos fágicos monocatenarios, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, (poli)péptidos que contienen al menos un fragmento de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específica al (poli)péptido, etc. Los fragmentos anteriores pueden producirse sintéticamente o por escisión enzimática o química de

inmunoglobulinas intactas o pueden genomanipularse por técnicas de ADN recombinante. Los métodos de producción son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Antibodies: A Laboratory Manual*, editado por: E. Harlow y D. Lane (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. Una molécula de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma puede tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos a otro o pueden ser diferentes.

La molécula de unión puede ser una molécula de unión desnuda o sin conjugar, pero también puede ser parte de un inmunoconjugado. Una molécula de unión desnuda o sin conjugar pretende hacer referencia a una molécula de unión que no está conjugada, unida de forma funcional o asociada de otro modo física o funcionalmente con un resto efector o marca, tal como, entre otras, una sustancia tóxica, una sustancia radiactiva, un liposoma, una enzima. Se entenderá que las moléculas de unión desnudas o sin conjugar no excluyen moléculas de unión que se han estabilizado, multimerizado, humanizado o manipulado de cualquier otra manera, diferente de mediante fijación de un resto efector o marca. Por consiguiente, todas las moléculas de unión desnudas y sin conjugar modificadas de forma postraducciona se incluyen en las mismas, incluyendo cuando las modificaciones se hacen en el entorno de la célula productora de la molécula de unión natural, mediante una célula productora de molécula de unión recombinante, y se introducen artificialmente después de la preparación inicial de la molécula de unión. Por supuesto, la expresión molécula de unión desnuda o sin conjugar no excluye la capacidad de la molécula de unión de formar asociaciones funcionales con células efectoras y/o moléculas después de su administración al organismo, ya que algunas de dichas interacciones son necesarias para ejercer un efecto biológico. La ausencia de grupo efector o marca asociada, por lo tanto, se aplica en la definición a la molécula de unión desnuda o sin conjugar *in vitro*, no *in vivo*.

Como se usa en este documento, la expresión "muestra biológica" abarca una diversidad de tipos de muestra, incluyendo sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido tal como una pieza de biopsia o histocultivos, o células derivadas de los mismos y la descendencia de los mismos. La expresión también incluye muestras que se han manipulado de cualquier manera después de su adquisición, tal como por tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento de determinados componentes, tales como proteínas o polinucleótidos. La expresión abarca diversos tipos de muestras clínicas obtenidas de cualquier especie, y también incluye células en cultivo, sobrenadantes celulares y lisados celulares.

La expresión "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), como se usa en este documento, significa secuencias dentro de las regiones variables de moléculas de unión, tales como inmunoglobulinas, que habitualmente contribuyen en gran medida en el sitio de unión a antígeno que es de forma y distribución de carga complementarias al epítipo reconocido en el antígeno. Las regiones CDR pueden ser específicas para epítopos lineales, epítopos discontinuo o epítopos conformacionales de proteínas o fragmentos proteínicos, como presentes en la proteína en su conformación natural o, en algunos casos, como presentes en las proteínas desnaturalizadas, por ejemplo, por solubilización en SDS. Los epítopos también pueden consistir en modificaciones postraduccionales de las proteínas.

El término "eliminación", como se usa en este documento, indica un cambio en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos en que uno o más residuos aminoácídicos o nucleotídicos, respectivamente, están ausentes en comparación con la molécula de referencia, a menudo de origen natural.

La expresión "secuencia de ácido nucleico que regula la expresión", como se usa en este documento, se refiere a secuencias polinucleotídicas necesarias para y/o que afectan a la expresión de una secuencia codificante unida de forma funcional en un organismo hospedador particular. Las secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión, tales como, entre otras, secuencias apropiadas de inicio de la transcripción, terminación, promotoras, potenciadoras; secuencias represoras o activadoras; señales del procesamiento eficaz del ARN tales como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de traducción (por ejemplo, sitios de unión al ribosoma); secuencias que potencian la estabilidad proteínica; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas, pueden ser cualquier secuencia de ácido nucleico que muestre actividad en el organismo hospedador de elección y pueden obtenerse de genes que codifican proteínas, que son homólogas o heterólogas al organismo hospedador. La identificación y empleo de secuencias reguladoras de la expresión es de rutina para los expertos en la materia.

La expresión "variante funcional", como se usa en este documento, se refiere a una molécula de unión que comprende una secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos que está alterada por uno o más nucleótidos y/o aminoácidos en comparación con las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos de la molécula de unión de referencia y que aún puede competir por la unión al compañero de unión, por ejemplo H3N2, con la molécula de unión de referencia. En otras palabras, las modificaciones en la secuencia de aminoácidos y/o nucleótidos de la molécula de unión de referencia no afecta o altera significativamente las características de unión de la molécula de unión codificada por la secuencia de nucleótidos o que contiene la secuencia de aminoácidos, es decir, la molécula de unión todavía puede reconocer y unirse a su diana. La variante funcional puede tener modificaciones conservativas de la secuencia incluyendo sustituciones, adiciones y eliminaciones de nucleótidos y aminoácidos. Estas modificaciones pueden introducirse mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis aleatoria mediada por PCR, y pueden comprender nucleótidos y aminoácidos naturales, así como no naturales.

Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen aquellas en las que el residuo aminoacídico se reemplaza con un residuo aminoacídico que tiene propiedades estructurales o químicas similares. En la técnica se han definido las familias de residuos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con ramificaciones beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano). Estará claro para los expertos en la materia que también pueden emplearse otras clasificaciones de familias de residuos aminoacídicos distintas de la usada anteriormente. Además, una variante puede tener sustituciones no conservativas de aminoácidos, por ejemplo, el remplazo de un aminoácido con un residuo aminoacídico que tiene diferentes propiedades estructurales o químicas. Variaciones mínimas similares también pueden incluir eliminaciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. Pueden encontrarse directrices sobre la determinación de los residuos aminoacídicos que pueden sustituirse, insertarse o eliminarse sin anular la actividad inmunológica usando programas informáticos bien conocidos en la técnica.

Una mutación en una secuencia de nucleótidos puede ser una sola alteración realizada en un locus (una mutación puntual), tal como mutaciones de transición o transversión o, como alternativa, múltiples nucleótidos pueden insertarse, eliminarse o cambiarse en un solo locus. Además, puede realizarse una o más alteraciones en muchísimos locus dentro de una secuencia de nucleótidos. Las mutaciones puede realizarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. La expresión "subtipo del virus de la gripe", como se usa en este documento, se refiere a variantes del virus de la gripe A que se caracterizan por diversas combinaciones de las proteínas superficiales víricas hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N). De acuerdo con la presente invención, los subtipos de virus de la gripe pueden denominarse por su número H, tal como, por ejemplo, "virus de la gripe que comprende HA del subtipo H3", o "gripe H3", o mediante una combinación de un número H y un número N, tal como, por ejemplo, "virus de la gripe de subtipo H3N2" o "H3N2". El término "subtipo" incluye específicamente todas las "cepas" individuales dentro de cada subtipo, que habitualmente son el resultado de mutaciones y muestran diferentes perfiles patógenos. Dichas cepas también pueden denominarse como diversos "aislados" de un subtipo vírico. Por consiguiente, como se usa en este documento, los términos "cepas" y "aislados" pueden usarse indistintamente. La nomenclatura actual para cepas o aislados del virus de la gripe humana incluye la ubicación geográfica del primer aislamiento, el número de cepa y el año de aislamiento, habitualmente con la descripción antigénica de HA y NA dada en paréntesis, por ejemplo, A/Moscú/10/00 (H3N2). Las cepas no humanas también incluyen el hospedador de origen en la nomenclatura.

Los subtipos del virus de la gripe pueden clasificarse además por referencia a su grupo filogenético. El análisis filogenético (Fouchier *et al.*, 2005) ha demostrado una subdivisión de la HA que coincide en dos grupos principales (Air, 1981): entre otros, los subtipos H1, H2, H5 y H9 en el grupo filogenético 1 y, entre otros, los subtipos H3, H4 y H7 en el grupo filogenético 2 (figura 1).

El término "neutralizante", como se usa en este documento en relación con las moléculas de unión de la invención se refiere a moléculas de unión que inhiben que un virus de la gripe infecte de forma replicativa una célula diana, independientemente del mecanismo por el que se consiga la neutralización. Por tanto, la neutralización puede conseguirse, por ejemplo, inhibiendo la fijación o adhesión del virus a la superficie celular, o mediante inhibición de la fusión de las membranas vírica y celular después de la fijación del virus a la célula diana, y similares.

La expresión "neutralizante cruzado" o "neutralización cruzada", como se usa en este documento en relación a las moléculas de unión de la invención se refiere a la capacidad de las moléculas de unión de la invención de neutralizar virus de la gripe A de diferentes subtipos, tales como, por ejemplo, virus de la gripe que comprenden HA del subtipo H3, H7 y/o H10.

El término "hospedador", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a un organismo o una célula en que se ha introducido un vector tal como un vector de clonación o un vector de expresión. El organismo o célula puede ser procariota o eucariota. Preferiblemente, los hospedadores son células hospedadoras aisladas, por ejemplo, células hospedadoras en cultivo. La expresión "células hospedadoras" simplemente significa que las células se modifican para la (sobre)-expresión de las moléculas de unión de la invención e incluyen linfocitos B que originalmente expresan estas moléculas de unión y cuyas células se han modificado para que sobreexpresen la molécula de unión por inmortalización, amplificación, potenciación de la expresión, etc. Debe entenderse que el término hospedador pretende hacer referencia no solo al organismo o célula objeto particular, sino a la descendencia de dicho organismo o célula también. Como pueden producirse determinadas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia puede no ser, de hecho, idéntica al organismo o célula progenitora, pero aún se incluye dentro del alcance de la expresión "hospedador" como se usa en este documento.

El término "humanas", cuando se aplica a moléculas de unión como se define en este documento, se refiere a moléculas que se obtienen directamente de un ser humano o que se basan en una secuencia humana. Cuando una molécula de unión se obtiene de o se basa en una secuencia humana y posteriormente se modifica, aún tiene que considerarse humana como se usa a lo largo de toda la memoria descriptiva. En otras palabras, el término humanas, cuando se aplica a moléculas de unión, pretende incluir moléculas de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana o basadas en regiones variables o

constantes que existen en un ser humano o linfocito humano y se modifican de alguna forma. Por tanto, las moléculas de unión humanas pueden incluir residuos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana, que comprenden sustituciones y/o eliminaciones (por ejemplo, mutaciones introducidas, por ejemplo, por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). "Basada en", como se usa en este documento, se refiere a la situación de que una secuencia de ácido nucleico puede copiarse exactamente desde un molde, o con mutaciones mínimas, tal como por métodos de PCR propensa a errores, o prepararse sintéticamente haciendo coincidir el molde exactamente o con modificaciones mínimas. Las moléculas semisintéticas basadas en secuencias humanas también se consideran humanas como se usa en este documento.

El término "inserción", también conocido como el término "adición", indica un cambio en una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que provoca la adición de uno o más residuos aminoácidos o nucleotídicos, respectivamente, en comparación con la secuencia original.

El término "aisladas", cuando se aplica a moléculas de unión como se define en este documento, se refiere a moléculas de unión que están sustancialmente libres de otras proteínas o polipéptidos, particularmente libres de otras moléculas de unión que tienen diferentes especificidades antigénicas, y también están sustancialmente libres de otro material celular y/o productos químicos. Por ejemplo, cuando las moléculas de unión se producen de forma recombinante, preferiblemente están sustancialmente libres de componentes del medio de cultivo, y cuando las moléculas de unión se producen mediante síntesis química, preferiblemente están sustancialmente libres de precursores químicos u otros compuestos químicos, es decir, se separan de los precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. El término "aisladas", cuando se aplica a moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de unión como se define en este documento, pretende hacer referencia a moléculas de ácido nucleico en que las secuencias de nucleótidos que codifican las moléculas de unión están libres de otras secuencias de nucleótidos, particularmente secuencias de nucleótidos que codifican moléculas de unión que se unen a compañeros de unión distintos de H5N1. Además, el término "aisladas" se refiere a moléculas de ácido nucleico que se separan sustancialmente de otros componentes celulares que acompañan de forma natural a la molécula de ácido nucleico natural en su hospedador natural, por ejemplo, ribosomas, polimerasas o secuencias genómicas con las que está asociada de forma natural. Además, las moléculas de ácido nucleico "aisladas", tales como moléculas de ADNc, pueden estar sustancialmente libres de otro material celular, o medio de cultivo cuando se producen por técnicas recombinantes, o sustancialmente libres de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en este documento, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola especificidad. Un anticuerpo monoclonal presenta una sola especificidad y afinidad de unión por un epítipo particular. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a un anticuerpo que presenta una sola especificidad de unión, que tiene regiones variables y constante derivadas de o basadas en secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana o derivadas de secuencias completamente sintéticas. El método de preparación del anticuerpo monoclonal no es pertinente para la especificidad de unión.

La expresión "de origen natural", como se usa en este documento, aplicada a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado de forma intencionada de manera artificial en el laboratorio es de origen natural.

La expresión "molécula de ácido nucleico", como se usa en la presente invención, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos e incluye tanto hebras de sentido como de antisentido de ARN, ADNc, ADN genómico y formas sintéticas y polímeros mezclados de los anteriores. Un nucleótido se refiere a un ribonucleótido, desoxinucleótido o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término también incluye formas mono- y bicatenarias de ADN. Además, un polinucleótido puede incluir nucleótidos de origen natural o modificados o ambos ligados juntos mediante enlaces nucleotídicos de origen natural y/o no de origen natural. Las moléculas de ácido nucleico pueden modificarse química o bioquímicamente o pueden contener bases nucleotídicas no naturales o derivatizadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la materia. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), restos colgantes (por ejemplo, polipéptidos), intercalantes (por ejemplo, acridina, sorafenol, etc.), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anómicos, etc.). La expresión anterior también pretende incluir cualquier conformación topológica, incluyendo conformaciones monocatenarias, bicatenarias, parcialmente dobles, triples, en horquilla, circulares y cerradas. También se incluyen moléculas sintéticas que imitan polinucleótidos en su capacidad de unirse a una secuencia designada mediante unión de hidrógeno y otras interacciones químicas. Dichas moléculas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellas en que los enlaces peptídicos sustituyen los enlaces fosfato en la cadena principal de la molécula. Una referencia a una secuencia de ácido nucleico abarca su complemento salvo que se especifique de otro modo. Por tanto, debe entenderse que una referencia a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia particular abarca su hebra complementaria, con su secuencia complementaria. La hebra complementaria también es útil, por ejemplo, para tratamiento de antisentido, sondas de hibridación y cebadores de PCR.

La expresión "unida de forma funcional" se refiere a dos o más elementos de secuencia de ácido nucleico que normalmente están unidos físicamente y están en una relación funcional entre sí. Por ejemplo, un promotor está unido de forma funcional a una secuencia codificante si el promotor puede iniciar o regular la transcripción o expresión de una secuencia codificante, en cuyo caso la secuencia codificante debe entenderse "bajo el control de" el promotor.

Por "excipiente farmacéuticamente aceptable" se entiende cualquier sustancia inerte que se combina con una molécula activa tal como un fármaco, agente o molécula de unión para preparar una forma farmacéutica adecuada o conveniente. El "excipiente farmacéuticamente aceptable" es un excipiente que es atóxico para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y es compatible con otros ingredientes de la formulación que comprende el fármaco, agente o molécula de unión. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se aplican ampliamente en la técnica.

La expresión "que se une específicamente", como se usa en este documento, en referencia a la interacción de una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo, y su compañero de unión, por ejemplo, un antígeno, significa que la interacción depende de la presencia de una estructura particular, por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo, en el compañero de unión. En otras palabras, el anticuerpo se une preferentemente o reconoce el compañero de unión cuando el compañero de unión está presente en una mezcla de otras moléculas u organismos. La unión puede estar mediada por interacciones covalentes o no covalentes o una combinación de ambas. En otras palabras distintas, la expresión "que se une específicamente" significa que se une inmunoespecíficamente a un determinante antigénico o epítipo y que no se une inmunoespecíficamente a otros determinantes antigénicos o epítopos. Una molécula de unión que se une inmunoespecíficamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad como se determina por, por ejemplo, radioinmunoensayos (RIA), ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA), BIACORE u otros ensayos conocidos en la técnica. Las moléculas de unión o fragmentos de las mismas que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno puede tener reactividad cruzada con antígenos relacionados, que portan el mismo epítipo. Preferiblemente, las moléculas de unión o fragmentos de las mismas que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno no reaccionan de forma cruzada con otros antígenos.

Una "sustitución", como se usa en este documento, indica el remplazo de uno o más aminoácidos o nucleótidos por aminoácidos o nucleótidos diferentes, respectivamente.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de la molécula de unión como se define en este documento que es eficaz para prevenir, mejorar y/o tratar una afección resultante de infección con gripe del subtipo H3. Mejora, como se usa en este documento, puede hacer referencia a la reducción de síntomas de enfermedad visibles o perceptibles, viremia, o cualquier otra manifestación medible de infección por gripe.

El término "tratamiento" se refiere a tratamiento terapéutico, así como medidas profilácticas o preventivas para curar o detener o al menos retardar el progreso de la enfermedad. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya están afectados por una afección resultante de infección con virus de la gripe que comprende HA del subtipo H3, así como aquellos en los que tiene que prevenir infección con virus de la gripe que comprende HA del subtipo H3. Los sujetos parcial o totalmente recuperados de infección con gripe H3 podrían estar también en necesidad de tratamiento. La prevención abarca inhibir o reducir la propagación del virus de la gripe que comprende HA del subtipo H3 o inhibir o reducir la aparición, desarrollo o progresión de uno o más de los síntomas asociados con infección con gripe H3.

El término "vector" indica una molécula de ácido nucleico en que puede insertarse una segunda molécula de ácido nucleico para la introducción en un hospedador donde se replicará y, en algunos casos, se expresará. En otras palabras, un vector puede transportar una molécula de ácido nucleico a la que se ha ligado. Se contemplan vectores de clonación, así como de expresión por el término "vector", como se usa en este documento. Los vectores incluyen, aunque sin limitación, plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y cromosomas artificiales de levadura (YAC) y vectores derivados de bacteriófagos o virus vegetales o animales (incluyendo humanos). Los vectores comprenden un origen de replicación reconocido por el hospedador propuesto y, en el caso de vectores de expresión, un promotor y otras regiones reguladoras reconocidas por el hospedador. Un vector que contiene una segunda molécula de ácido nucleico se introduce en una célula por transformación, transfección o haciendo uso de mecanismo de entrada víricos. Determinados vectores tienen capacidad de replicación autónoma en un hospedador en que se introducen (por ejemplo, vectores que tienen un origen de replicación bacteriano pueden replicarse en bacterias). Otros vectores pueden integrarse en el genoma de un hospedador tras su introducción en el hospedador, y de ese modo se replican junto con el genoma hospedador.

Sumario de la invención

La invención proporciona moléculas de unión humanas que pueden unirse específicamente a cepas de virus de la gripe que comprenden HA del subtipo H3, incluyendo H3N2, y que muestran actividad neutralizante contra dicho virus de la gripe, y que tienen actividad neutralizante cruzada contra al menos un virus de la gripe que comprende HA del subtipo H7 y/o un virus de la gripe que comprende HA del subtipo H10, en las que la molécula de unión se une a un epítipo que comprende el aminoácido en la posición 19, 25, 27, 33 y 34 del polipéptido HA2 de la proteína HA H3. En una realización, las moléculas de unión de la invención sin únicas puesto que pueden neutralizar varias cepas, incluyendo al menos una o más de las recientes, preferiblemente todas las cepas conocidas, de virus de la gripe de

subtipo H3, el subtipo epidémico más común en seres humanos, con alta potencia. En una realización, las moléculas de unión se unen a un epítipo conservado en la región de tronco de la proteína HA H3. En una realización, las moléculas de unión pueden prevenir la escisión *in vitro* de la molécula HA0 precursora de HA. En una realización, las moléculas de unión de la presente invención pueden prevenir el cambio conformacional de la proteína HA requerida para la fusión de la membrana del virus de la gripe con la membrana del endosoma de una célula infectada.

La invención proporciona moléculas de unión que se unen a un epítipo en la proteína hemaglutinina que está compartida entre subtipo de gripe dentro del grupo filogenético 2 al que pertenecen los subtipos H3 y, por lo tanto, se refiere a moléculas de unión que reaccionan de forma cruzada entre subtipos basados en gripe H3, H7 y/o H10, y otros subtipos de gripe que contienen la proteína HA con estos epítipos particulares, preferiblemente todos los subtipos del grupo filogenético 2. Las moléculas de unión de la presente invención, por tanto, son únicas puesto que poseen actividad neutralizante cruzada contra uno o más subtipos diferentes de virus de la gripe A, tales como virus de la gripe que comprenden HA del subtipo H7 y/o H10. Preferiblemente, las moléculas de unión de la presente invención pueden neutralizar de forma cruzada todos los subtipos de virus de la gripe del grupo filogenético 2, que abarca los subtipos H3, H7 y H10 y, por tanto, pueden usarse como agente profiláctico, diagnóstico y/o de tratamiento universal para virus de la gripe que pertenecen al grupo filogenético 2, incluso independientemente del subtipo de gripe causante dentro de ese grupo filogenético.

Se supone que las moléculas de unión de acuerdo con la presente invención se unen a los epítipos conservados hasta ahora desconocidos que no son propensos o son mucho menos propensos a variaciones antigénicas menores o mayores. Por tanto, también se abarca el uso de las moléculas de unión de la invención para identificar y/o caracterizar estos epítipos. La invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican al menos la región de unión de las moléculas de unión humanas. La invención proporciona además el uso de las moléculas de unión humanas de la invención en la profilaxis y/o tratamiento de un sujeto que tiene, o está en riesgo de desarrollar, una infección de gripe H3, tal como una infección de gripe H3N2. Además, la invención se refiere al uso de las moléculas de unión humanas de la invención en el diagnóstico/detección de dicha infección de gripe.

Descripción detallada

En un primer aspecto, la presente invención abarca moléculas de unión humanas que pueden unirse específicamente a y que tienen actividad neutralizante contra virus de la gripe A, particularmente virus de la gripe A que comprende HA del subtipo H3, en particular H3N2, y que tienen actividad neutralizante cruzada contra al menos un virus de la gripe que comprende HA del subtipo H7, y/o un virus de la gripe que comprende HA del subtipo H10, en las que las moléculas de unión se unen a un epítipo que comprende el aminoácido en la posición 19, 25, 27, 33 y 34 del polipéptido HA2 de la proteína HA H3. En una realización, las moléculas de unión de la invención pueden unirse específicamente a y/o tienen actividad neutralizante contra varias cepas del virus de la gripe H3N2, preferiblemente dos o más cepas H3N2 diferentes, más preferiblemente tres o más, más preferiblemente cuatro o más, más preferiblemente cinco o más cepas H3N2 diferentes. Las cepas pueden obtenerse tanto de seres humanos como de animales no humanos, por ejemplo, aves. En una realización, las moléculas de unión se unen a y neutralizan al menos una o más de las cepas H3N2 recientes seleccionadas del grupo que consiste en A/Wisconsin/67/2005, A/Hiroshima/52/2005, A/Panamá/2007/99 y A/Johannesburgo/33/94. En otra realización, las moléculas de unión también se unen a y neutralizan la cepa H3N2 A/Hong Kong/1/68. Más preferiblemente, las moléculas de unión se unen a y tienen actividad neutralizante contra todas las cepas H3N2 de gripe entre los años 1968 y 2005. Preferiblemente, las moléculas de unión tienen actividad neutralizante contra al menos todos los aislados de origen natural del virus de la gripe H3N2 conocido antes del 20 de enero de 2010.

Las moléculas de unión de la invención pueden tener la capacidad de unirse específicamente a la subunidad HA0, HA1 y/o HA2 de la proteína HA. Pueden tener la capacidad de unirse específicamente a epítipos lineales o estructurales y/o conformacionales en la subunidad HA0, HA1 y/o HA2 de la proteína HA. La molécula HA puede purificarse de virus o producirse de forma recombinante y opcionalmente aislarse antes de su uso. Como alternativa, HA puede expresarse sobre la superficie de células. Preferiblemente, las moléculas de unión de la invención se unen a un epítipo que comprende uno o más de los aminoácidos en la posición 19, 25, 27, 33 y 34 del polipéptido HA2 de la proteína HA H3. En una realización, las moléculas de unión se unen a dicho epítipo en HA2, cuando el aminoácido en la posición 19 es ácido aspártico (D), el aminoácido en la posición 25 es glutamina (Q), el aminoácido en la posición 27 es glicina (G), el aminoácido en la posición 33 es glicina (G) y/o el aminoácido en la posición 34 es glutamina (numeración de HA2 empezando en la posición 1 justo después del residuo de arginina que constituye el sitio de escisión entre HA1 y HA2). En una realización, las moléculas de unión no se unen a dicho epítipo en HA2 cuando se ha cambiado uno o más de dichos aminoácidos.

En otro aspecto, la presente invención abarca moléculas de unión que pueden prevenir, al menos *in vitro*, la escisión con tripsina de la molécula HA0 precursora de HA H3 en HA1 y HA2.

En otro aspecto, la presente invención abarca moléculas de unión que pueden prevenir el cambio conformacional de la proteína HA H3, requerido para la fusión membranaria de la membrana del virus de la gripe y la membrana del endosoma de una célula infectada, al menos *in vitro*.

En otro aspecto, las moléculas de unión tienen alguna o todas las propiedades enumeradas anteriormente, es decir, actividad neutralizante cruzada, unión a un epítipo conservado en la región de trínco de HA2, inhibición *in vitro* de la escisión con tripsina de HAO y/o inhibición del cambio conformacional.

- 5 En una realización, las moléculas de unión de la invención tienen todas o algunas de las propiedades anteriores y, además, no pueden unirse a y/o neutralizar virus de la gripe A que comprende HA del subtipo H1, tal como H1N1.

10 Las moléculas de unión de la invención pueden tener la capacidad de unirse específicamente a, por ejemplo, virus de la gripe H3N2 que son viables, están vivos y/o infecciosos o que están en forma inactivada/atenuada. Los métodos para inactivar/atenuar virus, por ejemplo, virus de la gripe H3N2, son bien conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, tratamiento con formol, β -propiolactona (BPL), mertiolato y/o luz ultravioleta.

15 Las moléculas de unión de la invención también pueden tener la capacidad de unirse específicamente a uno o más fragmentos de los virus de la gripe, tales como, entre otras, una preparación de o más proteínas y/o (poli)péptidos derivados del subtipo H3N2 o una o más proteínas y/o polipéptidos de H3N2 producidos de forma recombinante. Para métodos de tratamiento y/o prevención de infecciones por H3N2, las moléculas de unión preferiblemente pueden unirse específicamente a proteínas accesibles en la superficie de H3N2 tales como las glucoproteínas superficiales, hemaglutinina (HA), que es necesaria para la fijación del virus y la liberación celular.

20 La secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos de proteínas de diversas cepas H3N2 puede encontrarse en la base de datos GenBank, la base de datos de secuencias de virus de la gripe del NCBI, la base de datos de secuencias de la gripe (ISD), la base de datos del EMBL y/o otras bases de datos. Pertenecen al alcance de los expertos en la materia encontrar dichas secuencias en las bases de datos respectivas.

25 En otra realización, las moléculas de unión de la invención pueden unirse específicamente a un fragmento de las proteínas y/o polipéptidos mencionados anteriormente, en las que el fragmento comprende al menos un epítipo reconocido por las moléculas de unión de la invención. Un "epítipo", como se usa en este documento, es un resto que puede unirse a una molécula de unión de la invención con afinidad suficientemente alta para formar un complejo de antígeno-molécula de unión detectable.

30 Las moléculas de unión de la invención pueden tener la capacidad o no de unirse específicamente a la parte extracelular de HA (también denominada en este documento HA soluble (sHA)).

35 Las moléculas de unión de la invención pueden ser moléculas de inmunoglobulinas intactas tales como anticuerpos policlonales o monoclonales o las moléculas de unión pueden ser fragmentos de unión a antígeno incluyendo, aunque sin limitación, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, dAb, Fd, fragmentos de región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios bivalentes, anticuerpos fágicos monocatenarios, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y (poli)péptidos que contienen al menos un fragmento de una inmunoglobulina, que es suficiente para conferir unión a antígeno específico a las cepas H3N2 del virus de la gripe o un fragmento de las mismas. En una realización preferida, las moléculas de unión de la invención son anticuerpos monoclonales humanos.

45 Las moléculas de unión de la invención pueden usarse en forma no aislada o aislada. Además, las moléculas de unión de la invención pueden usarse en solitario o en una mezcla que comprende al menos una molécula de unión (o variante o fragmento de la misma) de la invención. En otras palabras, las moléculas de unión pueden usarse en combinación, por ejemplo, como una composición farmacéutica que comprende dos o más moléculas de unión de la invención, variantes o fragmentos de las mismas. Por ejemplo, las moléculas de unión que tienen diferentes actividades, pero complementarias, pueden combinarse en una monoterapia para conseguir un efecto profiláctico, terapéutico o diagnóstico deseado, pero, como alternativa, las moléculas de unión que tengan actividades idénticas también pueden combinarse en una monoterapia para conseguir un efecto profiláctico, terapéutico o diagnóstico deseado. Opcionalmente, la mezcla comprende además al menos otro agente terapéutico. Preferiblemente, el agente terapéutico tal como, por ejemplo, inhibidores de M2 (por ejemplo, amantidina, rimantadina) y/o inhibidores de neuraminidasa (por ejemplo, zanamivir, oseltamivir) es útil en la profilaxis y/o tratamiento de una infección con virus de la gripe H3N2.

55 Típicamente, las moléculas de unión de acuerdo con la invención pueden unirse a sus compañeros de unión, es decir, virus de la gripe H3N2 o fragmentos de los mismos, con una constante de afinidad (valor de K_d) que es menor de $0,2 \times 10^{-4}$ M, $1,0 \times 10^{-5}$ M, $1,0 \times 10^{-6}$ M, $1,0 \times 10^{-7}$ M, preferiblemente menor de $1,0 \times 10^{-8}$ M, más preferiblemente menor de $1,0 \times 10^{-9}$ M, más preferiblemente menor de $1,0 \times 10^{-10}$ M, incluso más preferiblemente menor de $1,0 \times 10^{-11}$ M y en particular menor de $1,0 \times 10^{-12}$ M. Las constantes de afinidad pueden variar para los isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, la afinidad de unión para un isotipo IgM se refiere a una afinidad de unión de al menos aproximadamente $1,0 \times 10^{-7}$ M. Las constantes de afinidad pueden medirse, por ejemplo, usando resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, usando el sistema BIACORE (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia).

65 Típicamente, las moléculas de unión de acuerdo con la invención tienen una actividad neutralizante de 10 μ g/ml o menos, preferiblemente 5 μ g/ml o menos, más preferiblemente 2 μ g/ml o menos, incluso más preferiblemente 1 μ g/ml

o menos, como se determina en un ensayo de neutralización de virus *in vitro* (VNA) como se describe en el ejemplo 6.

Las moléculas de unión de acuerdo con la invención pueden unirse a virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo en forma soluble, tal como, por ejemplo, en una muestra o en suspensión o pueden unirse a virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo unido o fijado a un vehículo o sustrato, por ejemplo, placas de microvaloración, membranas y microesferas, etc. Los vehículos o sustratos pueden estar hechos de vidrio, plástico (por ejemplo, poliestireno), polisacáridos, nailon, nitrocelulosa o Teflon, etc. La superficie de dichos soportes puede ser sólida o porosa y de cualquier forma conveniente. Además, las moléculas de unión pueden unirse a virus de la gripe H3N2 en forma purificada/aislada o no purificada/no aislada.

Las moléculas de unión de la invención muestran actividad neutralizante. La actividad neutralizante puede medirse, por ejemplo, como se describe en este documento. Se describen ensayos alternativos que miden la actividad neutralizante en, por ejemplo, el Manual de la OMS sobre Diagnóstico y Vigilancia de la Gripe en Animales, Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2005, versión 2002.5.

La presente invención se refiere a una molécula de unión humana aislada que puede reconocer y unirse a un epítipo en la proteína hemaglutinina (HA) de la gripe, caracterizada por que dicha molécula de unión tiene actividad neutralizante contra un virus de la gripe A, que comprende HA del subtipo H3. Un ejemplo de un subtipo de gripe que contiene HA del subtipo H3 es H3N2. Son particularmente preferidas moléculas de unión que neutralizan el subtipo de gripe H3N2. En una realización, las moléculas de unión neutralizan al menos una o más de las cepas H3N2 recientes. En una realización, las moléculas de unión, por tanto, al menos se unen a y neutralizan una o más cepas H3N2 seleccionadas del grupo que consiste en A/Wisconsin/67/2005, A/Hiroshima/52/2005, A/Panamá/2007/99 y A/Johannesburgo/33/94. En otra realización, las moléculas de unión también se unen a y neutralizan la cepa H3N2 A/Hong Kong/1/68. Más preferiblemente, las moléculas de unión se unen a y tienen actividad neutralizante contra todas las cepas H3N2 de gripe entre los años 1968 y 2005, preferiblemente todas las cepas conocidas de dicho subtipo de virus de la gripe.

Las moléculas de unión de acuerdo con la invención también tienen actividad neutralizante contra virus de la gripe de otros subtipos de virus de la gripe A, preferiblemente al menos virus de la gripe que comprenden HA del subtipo H7, tal como la cepa A/Ánade real/Países Bajos/12/2000 y/o del subtipo H10, tal como la cepa A/Pollo/Alemania/N/49. Por tanto, se ha demostrado que algunas de las moléculas de unión de la presente invención neutralizan de forma cruzada estos subtipos de gripe. La invención, por tanto, proporciona moléculas de unión que se unen a un epítipo en la proteína hemaglutinina que está compartido y conservado entre subtipos de gripe y, por lo tanto, se refiere a moléculas de unión que reaccionan de forma cruzada entre subtipos basados en gripe H3, H7 y/o H10, y otros subtipos de gripe que contienen la proteína HA con estos epítopos particulares, preferiblemente todos los virus de la gripe del grupo filogenético 2. Las moléculas de unión neutralizantes cruzadas preferiblemente se unen a y neutralizan varias cepas de los subtipos H3, H7 y/o H10. En una realización, estas moléculas de unión neutralizantes cruzadas se unen a y neutralizan al menos una o más de las cepas H3N2 recientes seleccionadas del grupo que consiste en A/Wisconsin/67/2005, A/Hiroshima/52/2005, A/Johannesburgo/33/94 y A/Panamá/2007/99. En otra realización, las moléculas de unión también se unen a y neutralizan la cepa H3N2 A/Hong Kong/1/68. Más preferiblemente, las moléculas de unión se unen a y tienen actividad neutralizante contra todas las cepas H3N2 de gripe entre los años 1968 y 2005, preferiblemente todas las conocidas, e incluso más preferiblemente también las cepas H3N2 futuras. En una realización más, las moléculas de unión neutralizan sustancialmente todos los aislados de dichos otros subtipos de virus de la gripe.

En una realización, las moléculas de unión se unen a y neutralizan todos los subtipos de virus de la gripe del grupo filogenético 2.

Los expertos en la materia, basándose en lo que se ha divulgado en este documento, pueden determinar si un anticuerpo, de hecho, reacciona de forma cruzada con proteínas HA de diferentes subtipos y también pueden determinar si pueden neutralizar virus de la gripe de diferentes subtipos *in vivo*.

Los virus de la gripe infectan células por unión a residuos de ácido siálico sobre la superficie celular de células diana, y después de la transferencia a los endosomas, por fusión de sus membranas con las membranas endosómicas y liberación del complejo de genoma-transcriptasa en la célula. Tanto la unión al receptor como el proceso de fusión membranaria están mediados por la glucoproteína HA. La HA del virus de la gripe A comprende dos regiones estructuralmente distintas, es decir, una región de cabeza globular, que contiene un sitio de unión al receptor que es responsable de la fijación del virus a la célula diana, y está implicada en la actividad de hemaglutinación de HA, y una región de tronco, que contiene un péptido de fusión que es necesaria para la fusión membranaria entre la envuelta vírica y la membrana endosómica de la célula. La proteína HA es un trímero en el que cada monómero consiste en dos glucopéptidos ligados por disulfuro, HA1 y HA2, que se producen durante la infección por escisión proteolítica de un precursor (HA0). La escisión es necesaria para la infectividad del virus, ya que es necesaria para sensibilizar la HA para la fusión membranaria, para permitir el cambio conformacional. La activación de la molécula sensibilizada se produce a bajo pH en los endosomas, entre pH 5 y pH 6, y requiere cambios amplios en la estructura de HA. La estructura tridimensional de las conformaciones de HA sin escindir prefusión (I), escindida prefusión (II) y posfusión

(III) se muestran esquemáticamente en la figura 4. Cada una de las fases en la sensibilización y activación de HA para su participación en el proceso de fusión membranaria presenta una diana diferente para la inhibición, por ejemplo, por anticuerpos monoclonales.

En una realización de la presente invención, las moléculas de unión al menos pueden prevenir la escisión de la molécula HA0 precursora de HA en un ensayo *in vitro*, por ejemplo, un ensayo como se describe a continuación en los ejemplos. Como se explica anteriormente, la escisión de la molécula HA0 precursora de HA en HA1 y HA2 por las proteasas del hospedador es necesaria para activar la infectividad del virus. La prevención de la escisión de la molécula HA0 precursora de HA por las moléculas de unión de la invención, por tanto, puede prevenir la infección por el virus de la gripe.

En una realización, las moléculas de unión se unen a un epítipo que comprende el aminoácido en la posición 19, 25, 27, 33 y 34 del polipéptido HA2 de la proteína HA H3. En una realización, las moléculas de unión se unen a dicho epítipo en HA2, cuando el aminoácido en la posición 19 es ácido aspártico (D), el aminoácido en la posición 25 es glutamina (Q), el aminoácido en la posición 27 es glicina (G), el aminoácido en la posición 33 es glicina (G) y/o el aminoácido en la posición 34 es glutamina. Preferiblemente, las moléculas de unión no se unen a dicho epítipo en HA2 cuando se ha cambiado uno o más de dichos aminoácidos. La numeración de los aminoácidos se basa en la secuencia de hemaglutinina del número de la base de datos Uniprot Q91MA7 (SEQ ID NO: 193). Q91MA7 aporta la secuencia de longitud completa de HA inmadura de A/Hong Kong/1/1968. La secuencia de HA2 empieza en G346 de la proteína inmadura HA sin escindir. En la numeración anterior, la G346 es G1 en la secuencia de HA2.

Se prefiere una molécula de unión de acuerdo con la presente invención que se selecciona del grupo que consiste en:

- a) una molécula de unión que comprende una región CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO:109, una región CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO:110 y una región CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO:111,
- b) una molécula de unión que comprende una región CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO:138, una región CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO:139 y una región CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO:140, y
- c) una molécula de unión que comprende una región CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO:144, una región CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO:145 y una región CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO:146.

En una realización preferida, la molécula de unión de acuerdo con la invención es para su uso como medicamento y preferiblemente para el tratamiento diagnóstico, terapéutico y/o profiláctico de infección de gripe. Preferiblemente, el virus de la gripe que provoca la infección de gripe y que puede tratarse por las moléculas de unión de la presente invención, es virus de la gripe de subtipo H3N2. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión de acuerdo con la invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la invención se refiere a un uso de una molécula de unión de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para el diagnóstico, profilaxis y/o tratamiento de una infección por virus de la gripe. Dichas infecciones pueden producirse en pequeñas poblaciones, pero también pueden propagarse por todo el mundo en epidemias estacionales o, peor, en pandemias globales donde millones de individuos están en riesgo. La invención proporciona moléculas de unión que pueden neutralizar la infección de cepas de la gripe que provocan dichas epidemias estacionales, así como posibles pandemias. De forma importante, ahora puede preverse protección y tratamiento con las moléculas de unión de la presente invención con respecto a diversos subtipos de gripe, ya que se ha divulgado que las moléculas de unión de la presente invención pueden neutralizar de forma cruzada diversos subtipos de gripe del grupo filogenético 2, que abarca los subtipos H3, H7 y H10.

En una realización preferida, las moléculas de unión humanas de acuerdo con la invención se caracterizan por que las moléculas de unión humanas se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) una molécula de unión que comprende una región CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO:109, una región CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO:110 y una región CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO:111, una región CDR1 de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:112, una región CDR2 de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:113 y una región CDR3 de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:114,
- b) una molécula de unión que comprende una región CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO:138, una región CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO:139 y una región CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO:140, una región CDR1 de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:141, una región CDR2 de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:142 y una región CDR3 de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:143, y

- c) una molécula de unión que comprende una región CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO:144, una región CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO:145 y una región CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO:146, una región CDR1 de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:147, una región CDR2 de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 148 y una región CDR3 de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:149.

Las regiones CDR de las moléculas de unión de la invención se muestran en la tabla 1. Las regiones CDR son de acuerdo con Kabat *et al.* (1991) como se describe en Sequences of Proteins of Immunological Interest. En una realización de la presente invención, las moléculas de unión pueden comprender una, dos, tres, cuatro, cinco o las seis regiones CDR divulgadas en este documento. Preferiblemente, una molécula de unión de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos de las CDR divulgadas en este documento.

En otra realización más, las moléculas de unión de acuerdo con la invención comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:50 y SEQ ID NO:54. En una realización más, las moléculas de unión de acuerdo con la invención comprenden una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:52 y SEQ ID NO:56.

Otro aspecto de la presente divulgación incluye variantes funcionales de las moléculas de unión como se define en este documento. Se considera que las moléculas son variantes funcionales de una molécula de unión de acuerdo con la invención si las variantes pueden competir por unirse específicamente al virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo con las moléculas de unión "originales" o "de referencia". En otras palabras, cuando las variantes funcionales aún pueden unirse al mismo epítipo o uno solapante del virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo. En beneficio de esta solicitud, "original" y "de referencia" se usarán como sinónimos, lo que significa que la información de la molécula de referencia u original, o la propia molécula física puede formar la base para la variación. Preferiblemente, las variantes funcionales pueden competir por unirse específicamente a al menos dos (o más) cepas H3N2 diferentes de virus de la gripe o fragmentos de las mismas que se unen específicamente por las moléculas de unión de referencia. Además, se considera que las moléculas son variantes funcionales de una molécula de unión de acuerdo con la invención si tienen actividad neutralizante contra virus de la gripe H3N2, preferiblemente contra las al menos dos (o más) cepas H3N2 de virus de la gripe contra la que la molécula de unión original muestra actividad neutralizante. Las variantes funcionales incluyen, aunque sin limitación, derivados que son sustancialmente similares en la secuencia estructural primaria, incluyendo los que tienen modificaciones en el receptor de Fc u otras regiones implicadas con funciones efectoras, y/o que contienen, por ejemplo, modificaciones *in vitro* o *in vivo*, químicas y/o bioquímicas, que no se encuentran en la molécula de unión original. Dichas modificaciones incluyen, entre otras, acetilación, acilación, unión covalente de un nucleótido o derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, reticulación, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, hidroxilación, metilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación y similares.

Como alternativa, las variantes funcionales pueden ser moléculas de unión como se define en la presente invención, que comprenden una secuencia de aminoácidos que contiene sustituciones, inserciones, eliminaciones o combinaciones de las mismas de uno o más aminoácidos en comparación con las secuencias de aminoácidos de las moléculas de unión originales. Además, las variantes funcionales pueden comprender truncamientos de la secuencia de aminoácidos en cualquiera de los extremos amino o carboxílico o ambos. Las variantes funcionales de acuerdo con la invención pueden tener las mismas afinidades de unión o diferentes, ya sean mayores o menores, en comparación con la molécula de unión original, pero aún pueden unirse al virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo. Por ejemplo, las variantes funcionales de acuerdo con la invención pueden tener afinidades de unión aumentadas o disminuidas por el virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo en comparación con las moléculas de unión originales. Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables, incluyendo, aunque sin limitación, regiones flanqueantes, regiones hipervariables, en particular las regiones CDR3, están modificadas. En general, las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada comprenden tres regiones hipervariables, que comprenden tres CDR, y regiones más conservadas, las denominadas regiones flanqueantes (FR). Las regiones hipervariables comprenden residuos aminoacídicos de las CDR y residuos aminoacídicos de los bucles hipervariables. Las variantes funcionales destinadas a estar dentro del alcance de la presente invención tienen de al menos aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 99 %, preferiblemente de al menos aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 99 %, más preferiblemente de al menos aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 99 %, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente un 80 % a aproximadamente un 99 %, mucho más preferiblemente de al menos aproximadamente un 90 % a aproximadamente un 99 %, en particular de al menos aproximadamente un 95 % a aproximadamente un 99 % y, en particular, de al menos aproximadamente un 97 % a aproximadamente un 99 % de homología de secuencia de aminoácidos con las moléculas de unión originales definidas en este documento. Pueden usarse algoritmos informáticos tales como, entre otros, Gap o Bestfit, conocidos por los expertos en la materia, para alinear de forma óptima las secuencias de aminoácidos a comparar y para definir residuos aminoacídicos similares o idénticos. Las variantes funcionales pueden obtenerse alterando las moléculas de unión originales o partes de las mismas mediante métodos generales de biología molecular conocidos en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, PCR propensa a errores, mutagénesis dirigida por oligonucleótido, mutagénesis dirigida al sitio y reordenamiento de la cadena pesada y/o ligera. En una realización, las variantes funcionales de la invención tienen actividad neutralizante contra el virus de la gripe H3N2. La actividad neutralizante puede ser idéntica,

o mayor o menor en comparación con las moléculas de unión originales. De aquí en adelante, cuando se usa la expresión molécula de unión (humana), esta también abarca variantes funcionales de la molécula de unión (humana).

En otro aspecto más, la invención incluye inmunoconjugados, es decir, moléculas que comprenden al menos una molécula de unión como se define en este documento y que comprende además al menos una marca, tal como, entre otros, un resto/agente detectable. También se contemplan en la presente invención mezclas de inmunoconjugados de acuerdo con la invención o mezclas de al menos un inmunoconjugado de acuerdo con la invención y otra molécula, tal como un agente terapéutico u otra molécula de unión o inmunoconjugado. En una realización más, los inmunoconjugados de la invención pueden comprender más de una marca. Estas marcas pueden ser iguales o distintas entre sí y pueden unirse/conjugarse no covalentemente a las moléculas de unión. La una o más marcas también pueden unirse/conjugarse directamente a las moléculas de unión humanas a través de enlace covalente. Como alternativa, la una o más marcas pueden unirse/conjugarse a las moléculas de unión por medio de uno o más compuestos conectores. Las técnicas para conjugar marcas a moléculas de unión son bien conocidas por los expertos en la materia.

Las marcas de los inmunoconjugados de la presente invención pueden ser agentes terapéuticos, pero también pueden ser restos/agentes detectables. Las marcas adecuadas en tratamiento y/o prevención pueden ser toxinas o partes funcionales de las mismas, antibióticos, enzimas, otras moléculas de unión que potencian la fagocitosis o inmunoestimulación. Los inmunoconjugados que comprenden un agente detectable pueden usarse de forma diagnóstica para, por ejemplo, evaluar si un sujeto se ha infectado con una cepa H3N2 de virus de la gripe o controlar el desarrollo o progresión de una infección por virus de la gripe H3N2 como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de una pauta de tratamiento dada. Sin embargo, también pueden usarse con otros fines de detección y/o analíticos y/o diagnósticos. Los restos/agentes detectables incluyen, aunque sin limitación, enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Las marcas usadas para marcar las moléculas de unión con fines de detección y/o analíticos y/o diagnósticos dependen de las técnicas y/o métodos específicos de detección/análisis/diagnóstico usados tales como, entre otros, tinción inmunohistoquímica de muestras (de tejido), detección citométrica de flujo, detección citométrica por láser de barrido, inmunoensayos fluorescentes, ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), bioensayos (por ejemplo, ensayos de fagocitosis), aplicaciones de transferencia de Western, etc. Los marcadores adecuados para las técnicas y/o métodos de detección/análisis/diagnóstico conocidos en la técnica están al alcance de los expertos en la materia.

Además, las moléculas de unión humanas o inmunoconjugados de la invención también pueden fijarse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos *in vitro* o purificación de virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo. dichos soportes sólidos podrían ser porosos o no porosos, planos o no planos. Las moléculas de unión de la presente invención pueden fusionarse a secuencias marcadoras, tal como un péptido para facilitar la purificación. Ejemplos incluyen, aunque sin limitación, la marca de hexahistidina, la marca de hemaglutinina (HA), la marca myc o la marca flag. Como alternativa, un anticuerpo puede conjugarse a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo. En otro aspecto, las moléculas de unión de la invención pueden conjugarse/fijarse a uno o más antígenos. Preferiblemente, estos antígenos son antígenos que se reconocen por el sistema inmunitario de un sujeto al que se administra el conjugado de molécula de unión-antígeno. Los antígenos pueden ser idénticos, pero también pueden diferir entre sí. Los métodos de conjugación para fijar los antígenos y moléculas de unión son bien conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, el uso de agentes reticulantes. Las moléculas de unión de la invención se unirán al virus de la gripe H3N2 y los antígenos fijados a las moléculas de unión iniciarán un ataque potente de linfocitos T sobre el conjugado, que finalmente dará lugar a la destrucción del virus de la gripe H3N2.

A continuación de producir inmunoconjugados químicamente por conjugación, directa o indirectamente, mediante, por ejemplo, un conector, los inmunoconjugados pueden producirse como proteínas de fusión que comprenden las moléculas de unión de la invención y una marca adecuada. Las proteínas de fusión pueden producirse por métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, de forma recombinante construyendo moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las moléculas de unión en el mismo marco con secuencias de nucleótidos que codifican la una o más marcas adecuadas y después expresando las moléculas de ácido nucleico.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifica al menos una molécula de unión, variante funcional o inmunoconjugado de acuerdo con la invención. Dichas moléculas de ácido nucleico pueden usarse como intermedios con fines de clonación, por ejemplo, en el proceso de maduración de la afinidad como se describe anteriormente. En una realización preferida, las moléculas de ácido nucleico se aíslan o purifican.

Los expertos en la materia apreciarán que las variantes funcionales de estas moléculas de ácido nucleico también están destinadas a formar parte de la presente invención. Las variantes funcionales son secuencias de ácido nucleico que pueden traducirse directamente, usando el código genético convencional, para proporcionar una secuencia de aminoácidos idéntica a la traducida a partir de las moléculas de ácido nucleico originales.

Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico codifican moléculas de unión que comprenden las regiones CDR que se describen anteriormente. En una realización más, las moléculas de ácido nucleico codifican moléculas de unión que comprenden dos, tres, cuatro, cinco o las seis regiones CDR de las moléculas de unión de la invención.

En otra realización, las moléculas de ácido nucleico codifican moléculas de unión que comprenden una cadena pesada que comprende las secuencias variables de la cadena pesada que se describen anteriormente. En otra realización, las moléculas de ácido nucleico codifican moléculas de unión que comprenden una cadena ligera que comprende las secuencias variables de la cadena ligera que se describen anteriormente. Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de las moléculas de unión de la invención se dan a continuación.

Otro aspecto de la invención es proporcionar vectores, es decir, construcciones de ácido nucleico, que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Los vectores pueden obtenerse de plásmidos tales como, entre otros, F, R1, RP1, Col, pBR322, TOL, Ti, etc.; cósmidos; fagos tales como lambda, de tipo lambdaide, M13, Mu, Pl, P22, Q β , T de colas pares, T de colas impares, T2, T4, T7, etc.; virus de plantas. Los vectores pueden usarse para clonación y/o para expresión de las moléculas de unión de la invención e incluso podrían usarse con fines de genoterapia. Los vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención unidas de forma funcional a una o más moléculas de ácido nucleico reguladoras de la expresión también están cubiertos por la presente invención. La elección del vector depende de los procedimientos recombinantes seguidos y el hospedador usado. La introducción de vectores en células hospedadoras puede lograrse, entre otros, por transfección con fosfato de calcio, infección vírica, transfección mediada con DEAE-dextrano, transfección con lipofectamina o electroporación. Los vectores pueden replicarse de forma autónoma o pueden replicarse junto con el cromosoma en el que se han integrado. Preferiblemente, los vectores contienen uno o más marcadores de selección. La elección de los marcadores puede depender de las células hospedadoras de elección, aunque esto no es crucial para la invención como es bien conocido por los expertos en la materia. Incluyen, aunque sin limitación, kanamicina, neomicina, puromicina, higromicina, zeocina, gen de la timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-TK), gen de la dihidrofolato reductasa de ratón (dhfr). Los vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de unión humanas como se describe anteriormente unidas de forma funcional a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas o péptidos que pueden usarse para aislar las moléculas de unión humanas también están cubiertos por la invención. Estas proteínas o péptidos incluyen, aunque sin limitación, glutatión-S-transferasa, proteína de unión a maltosa, polihistidina de unión a metales, proteína fluorescente verde, luciferasa y beta-galactosidasa.

Los hospedadores que contienen una o más copias de los vectores mencionados anteriormente son un objeto adicional de la presente invención. Preferiblemente, los hospedadores son células hospedadoras. Las células hospedadoras incluyen, aunque sin limitación, células de mamífero, plantas, insectos, fúngicas o de origen bacteriano. Las células bacterianas incluyen, aunque sin limitación, células de bacterias grampositivas o bacterias gramnegativas tales como varias especies de los géneros *Escherichia*, tales como *E. coli*, y *Pseudomonas*. En el grupo de células fúngicas, preferiblemente se usan células de levadura. La expresión en levaduras puede conseguirse usando cepas de levadura tales como, entre otras, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hansenula polymorpha*. Además, pueden usarse células de insecto tales como células de *Drosophila* y Sf9 como células hospedadoras. Además de eso, las células hospedadoras pueden ser células vegetales tales como, entre otras, células de plantas de cultivo tales como plantas de silvicultura, o células de plantas que proporcionan alimento y materias primas tales como plantas de cereal o plantas medicinales, o células de plantas ornamentales, o células de cultivos de bulbos de flor. Las plantas o células vegetales transformadas (transgénicas) se producen por métodos conocidos, por ejemplo, transferencia génica mediada por *Agrobacterium*, transformación de discos foliares, transformación de protoplastos mediante transferencia de ADN inducida por polietilenglicol, electroporación, sonicación, microinyección o transferencia génica mediante biolística. Además, un sistema de expresión adecuado puede ser un sistema de baculovirus. Los sistemas de expresión que usan células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, células BHK, células NSO o células de melanoma de Bowes son preferidos en la presente invención. Las células de mamífero proporcionan proteínas expresadas con modificaciones postraduccionales que son muy similares a moléculas naturales de origen de mamífero. Como la presente invención se ocupa de moléculas que pueden tener que administrarse a seres humanos, sería particularmente preferido un sistema de expresión completamente humano. Por lo tanto, incluso más preferiblemente, las células hospedadoras son células humanas. Ejemplos de células humanas son, entre otras, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 y HEK293T. En realizaciones preferidas, las células productoras humanas comprenden al menos una parte funcional de una secuencia de ácido nucleico que codifica una región E1 de adenovirus en formato expresable. En realizaciones incluso más preferidas, dichas células hospedadoras se obtienen de una retina humana y se immortalizan con ácidos nucleicos que comprenden secuencias E1 adenovíricas, tales como células 911 o la línea celular depositada en la European Collection of Cell Cultures (ECACC), CAMR, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Gran Bretaña el 29 de febrero de 1996 con el número 96022940 y comercializadas con la marca PER.C6® (PER.C6 es una marca registrada de Crucell Holland B.V.). Para los fines de esta solicitud, "células PER.C6" se refiere a células depositadas con el número 96022940 o progenitores, pases anteriores o posteriores, así como descendientes de los progenitores de las células depositadas, así como derivados de cualquiera de los anteriores. La producción de proteínas recombinantes en células hospedadoras puede realizarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. El uso de las células comercializadas con la marca PER.C6® como plataforma de producción para proteínas de interés se ha descrito en el documento WO 00/63403.

Las moléculas de unión pueden prepararse mediante diversos medios. Un método de producción de una molécula de unión de acuerdo con la invención es una parte adicional de la invención. El método comprende las etapas de a) cultivar un hospedador de acuerdo con la invención en condiciones que dan lugar a la expresión de la molécula de unión, y b) opcionalmente, recuperar la molécula de unión expresada. Las moléculas de unión expresadas pueden recuperarse del extracto sin células, pero preferiblemente se recuperan del medio de cultivo. El método anterior de producción también puede usarse para generar variantes funcionales de las moléculas de unión y/o inmunoconjugados de la presente invención. Los métodos para recuperar proteínas, tales como moléculas de unión, de extractos sin células o el medio de cultivo son bien conocidos por los expertos en la materia. Las moléculas de unión, variantes funcionales y/o inmunoconjugados que se pueden obtener por el método descrito anteriormente también forman parte de la presente invención.

Como alternativa, a continuación de la expresión en hospedadores, tales como células hospedadoras, las moléculas de unión e inmunoconjugados de la invención pueden producirse sintéticamente mediante sintetizadores peptídicos convencionales o en sistemas de traducción sin células usando ácido nucleico de ARN derivado de moléculas de ADN de acuerdo con la invención. Las moléculas de unión e inmunoconjugados que se pueden obtener por los métodos de producción sintéticos o sistemas de traducción sin células descritos anteriormente también forman parte de la presente invención.

En otra realización más, las moléculas de unión de la presente invención también pueden producirse en mamíferos no humanos transgénicos tales como, entre otros, conejos, cabras o vacas, y secretarse en, por ejemplo, la leche de los mismos.

En otra realización alternativa más, las moléculas de unión de acuerdo con la presente invención, preferiblemente las moléculas de unión humanas que se unen específicamente al virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo, pueden generarse mediante mamíferos no humanos transgénicos, tales como, por ejemplo, ratones o conejos transgénicos, que expresan genes de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, los mamíferos no humanos transgénicos tienen un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera humana que codifican todo o una parte de las moléculas de unión humanas como se describe anteriormente. Los mamíferos no humanos transgénicos pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo. Los protocolos para inmunizar mamíferos no humanos están bien establecidos en la técnica. Véase *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, editado por: E. Harlow, D. Lane (1998), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York y *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., Nueva York. Los protocolos de inmunización a menudo incluyen múltiples inmunizaciones, con o sin adyuvantes tales como adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund, pero también pueden incluir inmunizaciones con ADN desnudo. En otra realización, las moléculas de unión humanas se producen por linfocitos B, células plasmáticas y/o de memoria derivadas de los animales transgénicos. En otra realización más, las moléculas de unión humanas se producen mediante hibridomas, que se preparan por fusión de linfocitos B obtenidos de los mamíferos no humanos transgénicos descritos anteriormente con células inmortalizadas. Los linfocitos B, células plasmáticas e hibridomas que pueden obtenerse de los mamíferos no humanos transgénicos descritos anteriormente y las moléculas de unión humanas que pueden obtenerse de los mamíferos no humanos transgénicos, linfocitos B, células plasmáticas y/o de memoria e hibridomas descritos anteriormente también forman parte de la presente invención.

En un aspecto más, la invención proporciona un método de identificación de una molécula de unión, tal como una molécula de unión humana, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo, que se une específicamente al virus de la gripe H3N2 o moléculas de ácido nucleico que codifican dichas moléculas de unión y comprende las etapas de: (a) poner en contacto una colección de moléculas de unión sobre la superficie de paquetes genéticos replicables con virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo en condiciones que dan lugar a unión, (b) seleccionar al menos una vez un paquete genético replicable que se une al virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo, (c) separar y recuperar el paquete genético replicable que se une al virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo de los paquetes genéticos replicables que no se unen al virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo. Un paquete genético replicable como se usa en este documento puede ser procariota o eucariota e incluye células, esporas, levaduras, bacterias, virus, (bacterió) fagos, ribosomas y polisomas. Un paquete genético replicable preferido es un fago. Las moléculas de unión, tales como, por ejemplo, Fv monocatenarios, se presentan en el paquete genético replicable, es decir, se fijan a un grupo o molécula ubicada en una superficie exterior del paquete genético replicable. El paquete genético replicable es una unidad cribable que comprende una molécula de unión a cribar ligada a una molécula de ácido nucleico que codifica la molécula de unión. La molécula de ácido nucleico debe ser replicable *in vivo* (por ejemplo, como un vector) o *in vitro* (por ejemplo, por PCR, transcripción y traducción). La replicación *in vivo* puede ser autónoma (como para una célula), con la ayuda de factores hospedadores (como para un virus) o con la ayuda tanto del hospedador como de virus auxiliar (como para un fagómido). Los paquetes genéticos replicables que presentan una colección de moléculas de unión se forman introduciendo moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de unión exógenas a presentar en los genomas de los paquetes genéticos replicables para formar proteínas de fusión con proteínas endógenas que normalmente se expresan a partir de la superficie exterior de los paquetes genéticos replicables. La expresión de las proteínas de fusión, el transporte hasta la superficie exterior y el ensamblaje

provocan la presentación de las moléculas de unión exógenas desde la superficie exterior de los paquetes genéticos replicables.

La etapa o etapas de selección en los métodos de acuerdo con la presente invención pueden realizarse con virus de la gripe H3N2 que están vivos y aún son infecciosos o que están inactivados. La inactivación del virus de la gripe H3N2 puede realizarse por métodos de inactivación vírica bien conocidos por los expertos en la materia tales como, entre otros, tratamiento con formol, β -propiolactona (BPL), mertiolato y/o luz ultravioleta. Los métodos para ensayar si el virus de la gripe H3N2 aún está vivo, es infeccioso y/o es viable o está parcial o completamente inactivado son bien conocidos por los expertos en la materia. El virus de la gripe H3N2 usado en el método anterior no tiene que estar en forma purificada, por ejemplo, puede estar presente en suero y/o sangre de un individuo infectado. El virus de la gripe H3N2 usado también puede aislarse de cultivo celular en un medio adecuado.

En una realización, el virus de la gripe H3N2 está en suspensión cuando se pone en contacto con los paquetes genéticos replicables. Como alternativa, también pueden acoplarse a un vehículo cuando tiene lugar el contacto. En una realización, puede tener lugar una primera selección y posterior selección frente a una cepa H3N2 de virus de la gripe. Como alternativa, la primera y posteriores rondas de selección pueden realizarse frente a cepas H3N2 diferentes de virus de la gripe. Como alternativa, la etapa o etapas de selección pueden realizarse en presencia de un fragmento de virus de la gripe H3N2 tal como, por ejemplo, preparaciones de membrana celular, proteínas o polipéptidos H3N2 recombinantes, proteínas de fusión que comprenden proteínas o polipéptidos H3N2, células que expresan proteínas o polipéptidos H3N2 recombinantes, y similares. También pueden usarse partes expuesta extracelularmente de estas proteínas o polipéptidos como material de selección. Los fragmentos de virus de la gripe H3N2 pueden inmovilizarse en un material adecuado antes de su uso o pueden usarse en suspensión. En una realización, la selección puede realizarse sobre diferentes fragmentos de virus de la gripe H3N2 o fragmentos de diferentes cepas H3N2 de virus de la gripe. Encontrar combinaciones de selección adecuadas se encuentra en el alcance de los expertos de la materia. Las selecciones pueden realizarse por ELISA o FACS.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método de obtención de una molécula de unión que se une específicamente a una cepa H3N2 de virus de la gripe o fragmento de la misma o una molécula de ácido nucleico que codifica dicha molécula de unión, en el que el método comprende las etapas de a) realizar el método descrito anteriormente de identificación de moléculas de unión, y b) aislar del paquete genético replicable recuperado la molécula de unión y/o la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula de unión. La colección de moléculas de unión sobre la superficie de los paquetes genéticos replicables puede ser una colección de scFv o Fab. Una vez se ha establecido o identificado un nuevo scFv o Fab con el método mencionado anteriormente de identificación de moléculas de unión o moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de unión, el ADN que codifica el scFv o Fab puede aislarse de las bacterias o fagos y combinarse con técnicas convencionales de biología molecular para generar construcciones que codifican scFv, scFv bivalentes, Fab o inmunoglobulinas humanas completas de una especificidad deseada (por ejemplo, IgG, IgA o IgM). Estas construcciones pueden transfectarse en líneas celulares adecuadas y finalmente pueden producirse anticuerpos monoclonales humanos completos (véase, Huls *et al.*, 1999; Boel *et al.*, 2000).

Como se menciona anteriormente, el paquete genético replicable preferido es un fago. Los métodos de presentación en fagos para identificar y obtener moléculas de unión (humanas), por ejemplo, anticuerpos monoclonales (humanos), son ahora métodos bien establecidos conocidos por los expertos en la materia. Se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.696.108; Burton y Barbas, 1994; de Kruif *et al.*, 1995b; y Phage Display: A Laboratory Manual. Editado por: CF Barbas, DR Burton, JK Scott y GJ Silverman (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. Para la construcción de colecciones de presentación en fagos, se expresan colecciones de genes de la región variable de la cadena pesada y ligera de anticuerpo monoclonal humano sobre la superficie de partículas de bacteriófago, preferiblemente bacteriófago filamentoso, en, por ejemplo, formato de Fv monocatenario (scFv) o Fab (véase de Kruif *et al.*, 1995b). Las colecciones grandes de fagos que expresan fragmentos de anticuerpo típicamente contienen más de $1,0 \times 10^9$ especificidades de anticuerpo y pueden ensamblarse a partir de las regiones V de inmunoglobulina expresadas en los linfocitos B de individuos inmunizados o no inmunizados. En una realización específica de la invención, la colección de fagos de moléculas de unión, preferiblemente colección de fagos de scFv, se prepara a partir de ARN aislado de células obtenidas a partir de un sujeto que se ha vacunado contra el virus de la gripe, se ha vacunado recientemente contra un patógeno no relacionado, ha padecido recientemente una infección con virus de la gripe H3N2 o de un individuo sano. El ARN puede aislarse, entre otros, de médula ósea o sangre periférica, preferiblemente, linfocitos de sangre periférica o linfocitos B aislados o incluso subpoblaciones de linfocitos B tales como linfocitos B de memoria, identificados como linfocitos B CD24+/CD27+. El sujeto puede ser un animal, preferiblemente un ser humano. En una realización preferida, las colecciones pueden ensamblarse a partir de regiones V de inmunoglobulina expresadas por linfocitos B de memoria de IgM, identificadas como células IgM+/CD24+/CD27+.

Como alternativa, las colecciones de presentación en fagos pueden construirse a partir de regiones variables de inmunoglobulina que se han ensamblado parcialmente *in vitro* para introducir diversidad de anticuerpo adicional en la colección (colecciones semisintéticas). Por ejemplo, las regiones variables ensambladas *in vitro* contienen tramos de ADN producido sintéticamente, aleatorizado o parcialmente aleatorizado en esas regiones de las moléculas que son importantes para la especificidad del anticuerpo, por ejemplo, regiones CDR. Los anticuerpos en fagos específicos

para el virus de la gripe H3N2 pueden seleccionarse de la colección exponiendo el virus o fragmento del mismo a una colección de fagos para permitir la unión de fagos que expresan fragmentos de anticuerpo específicos para el virus o fragmento del mismo. Los fagos no unidos se retiran por lavado y los fagos unidos se eluyen para infección de bacterias *E.coli* y posterior propagación. Habitualmente se requieren múltiples rondas de selección y propagación para enriquecer suficientemente los fagos que se unen específicamente al virus o fragmento del mismo. Si se desea, antes de exponer la colección de fagos al virus o fragmento del mismo, la colección de fagos en primer lugar puede reducirse exponiendo la colección de fagos a material no diana, tal como virus o fragmentos de los mismos de una cepa diferente, es decir, virus de la gripe que no son H3N2. Estos virus reductores o fragmentos de los mismos pueden unirse a una fase sólida o pueden estar en suspensión. Los fagos también pueden seleccionarse para la unión a antígenos complejos tales como mezclas complejas de proteínas o (poli)péptidos H3N2 opcionalmente complementados con otro material. También pueden usarse células hospedadoras que expresan una o más proteínas o (poli)péptidos de virus de la gripe H3N2 con fines de selección. Puede ampliarse un método de presentación en fagos que usa estas células hospedadoras y mejorarse reduciendo los ligandos no pertinentes durante el cribado mediante la adición de un exceso de células hospedadoras que comprenden moléculas que no son la diana o moléculas inespecíficas que son similar, pero no idénticas, a la diana, y de ese modo potenciar fuertemente la posibilidad de hallar moléculas de unión pertinentes. Por supuesto, la reducción puede realizarse antes, durante o después del cribado con virus o fragmentos de los mismos. El proceso se denomina proceso MABSTRACT® (MABSTRACT® es una marca registrada de Crucell Holland B.V., véase también la patente de Estados Unidos n.º 6.265.150).

En otro aspecto más, la invención proporciona un método de obtención de una molécula de unión que posiblemente tiene actividad neutralizante contra el virus de la gripe H3N2, en el que el método comprende las etapas de (a) realizar el método de obtención de una molécula de unión que se une específicamente al virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo o una molécula de ácido nucleico que codifica dicha molécula de unión como se describe anteriormente, y (b) verificar si la molécula de unión aislada tiene actividad neutralizante contra el virus, preferiblemente contra al menos una o más cepas H3N2 de virus de la gripe seleccionadas del grupo que consiste en A/Hong Kong/1/68, A/Johannesburgo/33/94, A/Panamá/2007/99, A/Wisconsin/67/2005 y A/Hiroshima/52/2005, preferiblemente todas las cepas de H3N2, en particular todas las cepas H3N2 conocidas y futuras. Los ensayos para verificar si una molécula de unión tiene actividad neutralizante son bien conocidos en la técnica (véase el Manual de la OMS sobre Diagnóstico y Vigilancia de la Gripe en Animales, Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2005, versión 2002.5).

En un aspecto más, la invención se refiere a una molécula de unión humana que tiene actividad neutralizante contra al menos el virus de la gripe A que comprende HA del subtipo H3, que se puede obtener mediante uno de los métodos que se describen anteriormente.

En otro aspecto más, la invención proporciona composiciones que comprenden al menos una molécula de unión, preferiblemente un anticuerpo monoclonal humano de acuerdo con la invención, al menos una variante funcional del mismo, al menos un inmunoconjugado de acuerdo con la invención y/o una combinación de los mismos. Además de eso, las composiciones pueden comprender, entre otros, moléculas estabilizantes, tales como albúmina o polietilenglicol, o sales. Preferiblemente, las sales usadas son sales que conservan la actividad biológica deseada de las moléculas de unión y no confieren ningún efecto toxicológico indeseado. Si es necesario, las moléculas de unión humanas de la invención pueden recubrirse en o sobre un material para protegerlas de la acción de ácidos u otras condiciones natural o no naturales que puedan inactivar las moléculas de unión.

En otro aspecto más, la invención proporciona composiciones que comprenden al menos una molécula de ácido nucleico como se define en la presente invención. Las composiciones pueden comprender soluciones acuosas tales como soluciones acuosas que contienen sales (por ejemplo, NaCl o sales como se describe anteriormente), detergentes (por ejemplo, SDS) y/u otros componentes adecuados.

Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una molécula de unión, tal como un anticuerpo monoclonal humano de la invención (o fragmento funcional o variante del mismo), al menos un inmunoconjugado de acuerdo con la invención, al menos una composición de acuerdo con la invención, o combinaciones de los mismos. La composición farmacéutica de la invención comprende además al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la materia. La composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender además al menos otro agente terapéutico. Los agentes adecuados también son bien conocidos por los expertos en la materia.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende al menos una molécula de unión adicional, es decir, la composición farmacéutica puede ser un cóctel o mezcla de moléculas de unión. La composición farmacéutica puede comprender al menos dos moléculas de unión de acuerdo con la invención, o al menos una molécula de unión de acuerdo con la invención y al menos una molécula adicional que se une a y/o neutraliza el virus de la gripe. En otra realización, la molécula de unión adicional puede formularse para administración separada simultánea o secuencial.

En una realización, las composiciones farmacéuticas pueden comprender dos o más moléculas de unión que tienen actividad neutralizante contra el virus de la gripe A que comprende HA del subtipo H3, tal como H3N2. En una realización, las moléculas de unión muestran actividad neutralizante sinérgica, cuando se usan en combinación. En

otras palabras, las composiciones pueden comprender al menos dos moléculas de unión que tienen actividad neutralizante, caracterizadas por que las moléculas de unión actúan sinérgicamente al neutralizar el virus de la gripe H3N2. Como se usa en este documento, el término "sinérgico" significa que el efecto combinado de las moléculas de unión, cuando se usan en combinación, es mayor que sus efectos aditivos cuando se usan individualmente. Las moléculas de unión de actúan sinérgicamente pueden unirse a diferentes estructuras en el mismo fragmento o distintos del virus de la gripe H3N2. Una manera de calcular la sinergia es por medio del índice de combinación. El concepto del índice de combinación (CI) se ha descrito por Chou y Talalay (1984). Las composiciones pueden comprender, por ejemplo, una molécula de unión que tiene actividad neutralizante y una molécula de unión no neutralizante específica de H3N2. Las moléculas de unión no neutralizantes y neutralizantes específicas de H3N2 también pueden actuar sinérgicamente al neutralizar el virus de la gripe H3N2.

En una realización, la composición farmacéutica puede comprender al menos dos moléculas de unión neutralizantes del virus de la gripe, en la que al menos una de las moléculas de unión puede neutralizar uno o más subtipos de virus de la gripe del grupo filogenético 1 y en la que al menos una de las moléculas de unión puede neutralizar uno o más subtipos de virus de la gripe del grupo filogenético 2.

En una realización, la composición farmacéutica puede comprender al menos una molécula de unión de acuerdo con la invención y al menos una molécula de unión adicional neutralizante del virus de la gripe.

En otra realización, la molécula de unión adicional neutralizante del virus de la gripe preferiblemente puede unirse a y neutralizar un virus de la gripe de un subtipo diferente, preferiblemente un virus de la gripe que comprende HA del subtipo H1, tal como H1N1, y/o HA del subtipo H5, tal como H5N1, tal como las moléculas de unión que se divulgan en el documento WO 2008/028946. Incluso más preferiblemente, dicha molécula de unión adicional es una molécula de unión neutralizante cruzada contra (todos) los subtipos de virus de la gripe del grupo filogenético 1, incluyendo H1, H2, H5, H9. En una realización preferida, la molécula de unión adicional es la molécula de unión identificada como CR6261 en el documento WO 2008/028946, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende los aminoácidos 1-121 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 186, o una variante funcional de la misma, y/o una región variable de la cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-112 de SEQ ID NO:188. En otra realización, la molécula de unión comprende una cadena pesada y ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 186 y SEQ ID NO: 188, respectivamente. Las moléculas de unión en la composición farmacéutica, por tanto, preferiblemente pueden reaccionar con virus de la gripe de diferentes subtipos. Las moléculas de unión deben ser de alta afinidad y deben tener amplia especificidad. Preferiblemente, ambas moléculas de unión son moléculas neutralizantes cruzadas puesto que cada una neutraliza virus de la gripe de diferentes subtipos. Además, preferiblemente neutralizan cuantas más cepas de cada uno de los diferentes subtipos de virus de la gripe como es posible.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender además al menos otro agente terapéutico, profiláctico y/o diagnóstico. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende al menos otro agente profiláctico y/o terapéutico. Preferiblemente, dichos agentes terapéuticos y/o profilácticos adicionales son agentes que pueden prevenir y/o tratar una infección por virus de la gripe H3N2 y/o una afección resultante de dicha infección. Los agentes terapéuticos y/o profilácticos incluyen, aunque sin limitación, agentes antivíricos. Dichos agentes pueden ser moléculas de unión, moléculas pequeñas, compuestos orgánicos o inorgánicos, enzimas, secuencias polinucleotídicas, péptidos antivíricos, etc. Otros agentes que se usan actualmente para tratar a pacientes infectados con virus de la gripe H3N2 son inhibidores de M2 (por ejemplo, amantidina, rimantadina) y/o inhibidores de neuraminidasa (por ejemplo, zanamivir, oseltamivir). Estos pueden usarse en combinación con las moléculas de unión de la invención. "En combinación", en este documento, significa simultáneamente, como formulaciones separadas, o como una sola formulación combinada, o de acuerdo con una pauta de administración secuencial, como formulaciones separadas, en cualquier orden. También podrían usarse agentes que pueden prevenir y/o tratar una infección con virus de la gripe H3N2 y/o una afección resultante de dicha infección, que están en fase experimental, como otros agentes terapéuticos y/o profilácticos útiles en la presente invención.

Las moléculas de unión o composiciones farmacéuticas de la invención pueden ensayarse en sistemas de modelo animal adecuados antes de su uso en seres humanos. Dichos sistemas de modelo animal incluyen, aunque sin limitación, ratón, hurón y mono.

Típicamente, las composiciones farmacéuticas deben ser estériles y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las moléculas de unión, inmunoconjugados, moléculas de ácido nucleico o composiciones de la presente invención pueden estar en forma de polvo para su reconstitución en el excipiente farmacéuticamente aceptable apropiado antes de o en el momento de la administración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada a esterilidad del mismo.

Como alternativa, las moléculas de unión, inmunoconjugados, moléculas de ácido nucleico o composiciones de la presente invención pueden estar en solución y el excipiente farmacéuticamente aceptable apropiado puede añadirse y/o mezclarse antes de o en el momento de la administración para proporcionar una forma farmacéutica inyectable

unitaria. Preferiblemente, el excipiente farmacéuticamente aceptable usado en la presente invención es adecuado para alta concentración de fármaco, puede mantener la fluidez apropiada y, si es necesario, puede retardar la absorción.

- 5 La elección de la vía de administración óptima de las composiciones farmacéuticas se verá influida por varios factores que incluyen las propiedades fisicoquímicas de las moléculas activas dentro de las composiciones, la urgencia de la situación clínica y la relación de las concentraciones plasmáticas de las moléculas activas con respecto al efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, si fuera necesario, las moléculas de unión de la invención pueden prepararse con vehículos que las protegerán frente a la rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada,
- 10 incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse, entre otros, polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Además, puede ser necesario recubrir las moléculas de unión con, o administrar conjuntamente las moléculas de unión con, un material o compuesto que evite la inactivación de las moléculas de unión humanas. Por ejemplo, las moléculas de unión pueden administrarse a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente.

Las vías de administración pueden dividirse en dos categorías principales, administración oral y parenteral. La vía preferida de administración es intravenosa o por inhalación.

- 20 Las formas farmacéuticas orales pueden formularse, entre otros, como comprimidos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos dispersables o gránulos, emulsiones, cápsulas duras, cápsulas de gelatina blandas, jarabes o elixires, píldoras, grageas, líquidos, geles o suspensiones espesas. Estas formulaciones pueden contener excipientes farmacéuticos incluyendo, aunque sin limitación, diluyentes inertes, agentes de granulación y disgregantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, conservantes, colorantes, agentes aromatizantes o edulcorantes, aceites vegetales o minerales, agentes humectantes, y agentes espesantes.

- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden formularse para administración parenteral. Las formulaciones para administración parenteral pueden estar, entre otros, en forma de soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles y atóxicas para inyección o infusión. Las soluciones o suspensiones pueden comprender agentes que son atóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas, tales como 1,3-butanodiol, solución de Ringer, solución de Hank, solución isotónica de cloruro de sodio, aceites, ácidos grasos, agentes anestésicos locales, conservantes, tampones, agentes que aumentan la viscosidad o la solubilidad, antioxidantes solubles en agua, antioxidantes liposolubles y agentes quelantes de metales.
- 30

- 35 En un aspecto más, las moléculas de unión tales como anticuerpos monoclonales humanos (fragmentos funcionales y variantes de los mismos), inmunoconjugados, composiciones o composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse como medicamento. De modo que, un método de diagnóstico, tratamiento y/o prevención de una infección por virus de la gripe H3N2 usando las moléculas de unión, inmunoconjugados, composiciones o composiciones farmacéuticas de la invención es otra parte de la presente invención. Las moléculas mencionadas anteriormente pueden usarse, entre otras cosas, en el diagnóstico, profilaxis, tratamiento o combinación de los mismos, de una infección por virus de la gripe H3N2. Son adecuadas para el tratamiento de pacientes aún sin tratar que padecen una infección por virus de la gripe H3N2 y pacientes que se han tratado o se tratan para una infección por virus de la gripe H3N2.
- 40

- 45 Las moléculas o composiciones mencionadas anteriormente pueden emplearse junto con otras moléculas útiles en diagnóstico, profilaxis y/o tratamiento. Pueden usarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por ejemplo, las moléculas de unión tales como anticuerpos monoclonales humanos (o variantes funcionales de los mismos), inmunoconjugados, composiciones o composiciones farmacéuticas de la invención puede administrarse conjuntamente con una vacuna contra el virus de la gripe H3N2 (si está disponible). Como alternativa, la vacuna también puede administrarse antes o después de la administración de las moléculas de la invención. En lugar de una vacuna, también pueden emplearse agente antivíricos junto con las moléculas de unión de la presente invención. Anteriormente se mencionan agentes antivíricos adecuados.
- 50

- Las moléculas típicamente se formulan en las composiciones y composiciones farmacéuticas de la invención en una cantidad terapéutica o diagnósticamente eficaz. Como alternativa, pueden formularse y administrarse por separado. Por ejemplo, las otras moléculas, tales como los agentes antivíricos, pueden aplicarse de forma sistémica, mientras que las moléculas de unión de la invención pueden aplicarse por vía intravenosa.
- 55

- El tratamiento puede estar dirigido a grupos de pacientes que son susceptible a infección por H3N2. Dichos grupos de pacientes incluyen, aunque sin limitación, por ejemplo, los ancianos (por ejemplo, ≥ 50 años de edad, ≥ 60 años de edad y preferiblemente ≥ 65 años de edad), los jóvenes (por ejemplo, ≤ 5 años de edad, ≤ 1 año de edad), pacientes hospitalizados y pacientes que se han tratado con un compuesto antivírico, pero que han mostrado una respuesta antivírica inadecuada.
- 60

- Las pautas posológicas pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Un intervalo de dosificación adecuado puede ser, por ejemplo, 0,1-100 mg/kg de peso corporal,
- 65

preferiblemente 1-50 mg/kg de peso corporal, preferiblemente 0,5-15 mg/kg de peso corporal. Además, por ejemplo, puede administrarse una única inyección intravenosa rápida, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o incrementarse de forma proporcional según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Las moléculas y composiciones de acuerdo con la presente invención son preferiblemente estériles. Los métodos para hacer que estas moléculas y composiciones sean estériles son bien conocidos en la técnica. Las otras moléculas útiles en diagnóstico, profilaxis y/o tratamiento pueden administrarse en una pauta posológica similar propuesta para las moléculas de unión de la invención. Si las otras moléculas se administran por separado, pueden administrarse a un paciente antes de (por ejemplo, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 18 h, 20 h, 22 h, 24 h, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 7 días, 2 semanas, 4 semanas o 6 semanas antes), simultáneamente con, o posterior a (por ejemplo, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 18 h, 20 h, 22 h, 24 h, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 7 días, 2 semanas, 4 semanas o 6 semanas después) la administración de una o más de las moléculas de unión humanas o composiciones farmacéuticas de la invención. La pauta posológica exacta habitualmente se escoge durante ensayos clínicos en pacientes humanos.

Las moléculas de unión humanas y composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión humanas son particularmente útiles, y a menudo se prefieren, cuando tienen que administrarse a seres humanos, como agentes terapéuticos *in vivo*, ya que la respuesta inmunitaria del destinatario al anticuerpo administrado a menudo será sustancialmente menor que la ocasionada mediante la administración de una molécula de unión monoclonal murina, quimérica o humanizada.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de las moléculas de unión tales como anticuerpos monoclonales humanos neutralizantes (fragmentos funcionales y variantes de los mismos), inmunoconjugados, moléculas de ácido nucleico, composiciones o composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para el diagnóstico, profilaxis, tratamiento o combinación de los mismos, de una infección por virus de la gripe H3N2.

A continuación de eso, los kits que comprenden al menos una molécula de unión tal como un anticuerpo monoclonal humano neutralizante (fragmentos funcionales y variantes de los mismos), al menos un inmunoconjugado, al menos una molécula de ácido nucleico, al menos una composición, al menos una composición farmacéutica, al menos un vector, al menos un hospedador de acuerdo con la invención o una combinación de los mismos también forma parte de la presente invención. Opcionalmente, los componentes descritos anteriormente de los kits de la invención se envasan en recipientes adecuados y se etiquetan para diagnóstico, profilaxis y/o tratamiento de las afecciones indicadas. Los componentes mencionados anteriormente pueden almacenarse en recipientes monodosis o multidosis como una solución acuosa, preferiblemente estéril, o como una formulación liofilizada, preferiblemente estéril, para reconstitución. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico y pueden tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). El kit puede comprender además más recipientes que comprenden un tampón farmacéuticamente aceptable. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, medio de cultivo para uno o más de los hospedadores adecuados y, posiblemente, incluso al menos otro agente terapéutico, profiláctico o diagnóstico. Asociadas con los kits puede haber instrucciones normalmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos, profilácticos o diagnósticos, que contienen información sobre, por ejemplo, las indicaciones, uso, dosificación, fabricación, administración, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos, profilácticos o diagnósticos.

Las moléculas de unión de acuerdo con la presente invención también pueden usarse ventajosamente como agente diagnóstico en un método *in vitro* para la detección del virus de la gripe del subtipo del grupo filogenético 2. La invención, por tanto, se refiere además a un método de detección de virus de la gripe de subtipo de grupo filogenético 2 de virus de la gripe en una muestra, en el que el método comprende las etapas de (a) poner en contacto una muestra con una cantidad diagnósticamente eficaz de una molécula de unión (fragmentos funcionales y variantes de la misma) o un inmunoconjugado de acuerdo con la invención, y (b) determinar si la molécula de unión o inmunoconjugado se une específicamente a una molécula de la muestra. La muestra puede ser una muestra biológica que incluye, aunque sin limitación, sangre, suero, deposiciones, esputo, aspirados nasofaríngeos, lavados bronquiales, orina, tejido u otro material biológico de sujetos (posiblemente) infectados, o una muestra no biológica tal como agua, bebida, etc. Los sujetos (posiblemente) infectados pueden ser sujetos humanos, pero también animales que se sospecha que son portadores del virus de la gripe del subtipo del grupo filogenético 2 de virus de la gripe podrían ensayarse para la presencia del virus usando las moléculas de unión humanas o inmunoconjugados de la invención. La muestra, en primer lugar, puede manipularse para hacer que sea más adecuada para el método de detección. Manipulación significa, entre otras cosas, tratar la muestra sospechosa de contener y/o que contiene el virus de tal manera que el virus se desintegre en componentes antigénicos tales como proteínas, (poli)péptidos u otros fragmentos antigénicos. Preferiblemente, las moléculas de unión humanas o inmunoconjugados de la invención se ponen en contacto con la muestra en condiciones que permiten la formación de un complejo inmunológico entre las moléculas de unión humanas y el virus o componentes antigénicos del mismo, que pueden estar presentes en la muestra. La formación de un complejo inmunológico, si lo hay, que indique la presencia del virus en la muestra, se detecta entonces y se mide mediante un medio adecuado. Dichos métodos incluyen, entre otros, inmunoensayos de unión homogéneos y

heterogéneos, tales como radioinmunoensayos (RIA), ELISA, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, FACS, BIACORE y análisis de transferencia de Western.

Técnicas de ensayo preferidas, especialmente para cribado clínico a gran escala de sueros y sangre de pacientes y productos derivados de la sangre son ELISA y técnicas de transferencia de Western. Los ensayos ELISA son particularmente preferidos. Para su uso como reactivos en estos ensayos, las moléculas de unión o inmunoconjugados de la invención se unen covalentemente a la superficie interior de pocillos de microvaloración. Las moléculas de unión o inmunoconjugados de la invención pueden unirse directamente al pocillo de microvaloración. Sin embargo, la unión máxima de las moléculas de unión o inmunoconjugados de la invención a los pocillos podría conseguirse pretratando los pocillos con polilisina antes de la adición de las moléculas de unión o inmunoconjugados de la invención. Además, las moléculas de unión o inmunoconjugados de la invención pueden fijarse covalentemente mediante un medio conocido a los pocillos. En general, las moléculas de unión o inmunoconjugados se usan entre 0,01 y 100 µg/ml para recubrimiento, aunque también pueden usarse cantidades mayores, así como menores. Entonces se añaden las muestras a los pocillos recubiertos con las moléculas de unión o inmunoconjugados de la invención.

Además, las moléculas de unión de la invención pueden usarse para identificar estructuras de unión específicas de virus de la gripe H3N2. Las estructuras de unión pueden ser epítopos en proteínas y/o polipéptidos. Pueden ser lineales, pero también estructurales y/o conformacionales. En una realización, las estructuras de unión pueden analizarse por medio de análisis PEPSCAN (véase, entre otros, los documentos WO 84/03564, WO 93/09872, Slootstra *et al.*, 1996). Como alternativa, puede cribarse una colección de péptidos aleatorios que comprende péptidos de una proteína de virus de la gripe H3N2 en busca de péptidos que puedan unirse a las moléculas de unión de la invención. Las estructuras de unión/péptidos/epítopos encontrados pueden usarse como vacunas y para el diagnóstico de infecciones por virus de la gripe H3N2. En el caso de que fragmentos distintos de proteínas y/o polipéptidos se unan por las moléculas de unión, las estructuras de unión pueden identificarse por espectrometría de masas, cromatografía de líquidos de alto rendimiento y resonancia magnética nuclear.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de cribado de una molécula de unión (o un fragmento funcional o variante de la misma) en busca de unión específica al mismo epítipo del virus de la gripe H3N2, que el epítipo unido por una molécula de unión humana de la invención, en el que el método comprende las etapas de (a) poner en contacto una molécula de unión a cribar, una molécula de unión de la invención y virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo, (b) medir si la molécula de unión a cribar puede competir por unirse específicamente al virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo con la molécula de unión de la invención. En una etapa adicional, puede determinarse si las moléculas de unión cribadas que pueden competir por unirse específicamente al virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo tienen actividad neutralizante. Una molécula de unión que puede competir por unirse específicamente al virus de la gripe H3N2 o un fragmento del mismo con la molécula de unión de la invención es otra parte de la presente invención. En el método de cribado descrito anteriormente, "que se une específicamente al mismo epítipo" también contempla la unión específica a sustancial o esencialmente el mismo epítipo que el epítipo unido por la molécula de unión de la invención. La capacidad de bloquear, o competir con, la unión de las moléculas de unión de la invención al virus de la gripe H3N2 típicamente indica que una molécula de unión a cribar se une a un epítipo o sitio de unión en el virus de la gripe H3N2 que solapa estructuralmente con el sitio de unión en el virus de la gripe H3N2 que se reconoce inmuno-específicamente por las moléculas de unión de la invención. Como alternativa, esto puede indicar que una molécula de unión a cribar se une a un epítipo o sitio de unión que está suficientemente próximo al sitio de unión reconocido inmuno-específicamente por las moléculas de unión de la invención para inhibir estéricamente o de otro modo la unión de las moléculas de unión de la invención al virus de la gripe H3N2.

En general, la inhibición competitiva se mide por medio de un ensayo, en el que una composición antigénica, es decir, una composición que comprende virus de la gripe H3N2 o fragmentos del mismo, se mezcla con moléculas de unión de referencia, es decir, las moléculas de unión de la invención, y moléculas de unión a cribar. Habitualmente, las moléculas de unión a cribar están presentes en exceso. Los protocolos basados en ELISA y transferencia de Western son adecuados para su uso en dichos estudios de competición simple. Usando anticuerpos secundarios de especie o isotipo, se podrán detectar solamente las moléculas de unión de referencia unidas, cuya unión se reducirá por la presencia de una molécula de unión a cribar que reconoce sustancialmente el mismo epítipo. En la realización de un estudio de competición de la molécula de unión entre una molécula de unión de referencia y cualquier molécula de unión a cribar (independientemente de la especie o isotipo), en primer lugar se puede marcar la molécula de unión de referencia con un marcador detectable, tal como, por ejemplo, biotina, un marcador enzimático, uno radiactivo u otro marcador para posibilitar la posterior identificación. Las moléculas de unión identificadas por estos ensayos de competición ("moléculas de unión competitivas" o "moléculas de unión reactivas cruzadas") incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y otros agentes de unión que se unen a un epítipo o sitio de unión unido por la molécula de unión de referencia, es decir, una molécula de unión de la invención, así como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y otros agentes de unión que se unen a un epítipo o sitio de unión suficientemente próximo a un epítipo unido por la molécula de unión de referencia para que se produzca unión competitiva entre las moléculas de unión a cribar y la molécula de unión de referencia. Preferiblemente, las moléculas de unión competitivas de la invención inhibirán, cuando estén presentes en exceso, la unión específica de una molécula de unión de referencia a una especie diana seleccionada en al menos un 10 %, preferiblemente en al menos un 25 %, más preferiblemente en al menos un 50 % y mucho más preferiblemente en al menos un 75 %-90 % o incluso mayor. La identificación de una o más moléculas de unión competitivas que se unen a aproximadamente, sustancialmente, esencialmente o al mismo

epítipo que las moléculas de unión de la invención es una simple cuestión técnica. Como la identificación de moléculas de unión competitivas se determina en comparación con una molécula de unión de referencia, es decir, una molécula de unión de la invención, se entenderá que realmente de ninguna manera se requiere determinar el epítipo al que la molécula de unión de referencia y la molécula de unión competitiva se unen para identificar una molécula de unión competitiva que se una al mismo o sustancialmente el mismo epítipo que la molécula de unión de referencia. La invención se ilustra además en los siguientes ejemplos y figuras. Los ejemplos no están destinados a limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1 Construcción de colecciones de presentación en fagos de scFv usando ARN extraído de linfocitos B de memoria

Se recogió sangre periférica de donadores sanos normales mediante venopunción en tubos de muestra con anticoagulante EDTA. Las colecciones de presentación en fagos de scFv se obtuvieron como se describe en el documento WO 2008/028946. Los linfocitos B de memoria (CD24+/CD27+) se separaron de linfocitos B vírgenes (CD24+/CD27-) y linfocitos T de memoria (CD24-/CD27+) y en una etapa siguiente, los linfocitos B de memoria de IgM (IgM+) se separaron de linfocitos B de memoria de cambio de clase (IgM-) usando la expresión de IgM. Se aisló el ARN de los linfocitos B de memoria de IgM y se preparó el ADNc.

Se aplicó una estrategia de amplificación por PCR de dos rondas usando los conjuntos de cebadores mostrados en las tablas 1 y 2 para aislar las regiones VH y VL de inmunoglobulina del repertorio donador respectivo.

La amplificación de la primera ronda sobre el ADNc respectivo usando los conjuntos de cebadores mencionados en la tabla 1 produjo 7, 6 y 9 productos de aproximadamente 650 pares de bases para, respectivamente, las regiones VH, Vkappa y Vlambda. Para la amplificación de la región VH de los linfocitos B de memoria de IgM, se usó el cebador constante OCM en combinación con OH1 a OH7. El programa de termociclado para las amplificaciones de la primera ronda fue: 2 min 96 °C (etapa de desnaturalización), 30 ciclos de 30 s 96 °C/30 s 55 °C/60 s 72 °C, 10 min 72 °C de elongación final y 4 °C de refrigeración. Los productos se cargaron en y se aislaron de un gel de agarosa al 1 % usando columnas de extracción de gel (Qiagen) y se eluyeron en 50 µl de Tris-HCl 1 mM pH 8,0. Un diez por ciento de los productos de la primera ronda (5 µl) se sometió a amplificación de la segunda ronda usando los cebadores mencionados en la tabla 2. Estos cebadores se prolongaron con sitios de restricción que posibilitan la clonación direccional de las respectivas regiones VL y VH en el vector de presentación en fagos PDV-C06. El programa de PCR para las amplificaciones de la segunda ronda fue como sigue: 2 min 96 °C (etapa de desnaturalización), 30 ciclos de 30 s 96 °C/30 s 60 °C/60 s 72 °C, 10 min 72 °C de elongación final y 4 °C de refrigeración. Los productos de la segunda ronda (~350 pares de bases) en primer lugar se combinaron de acuerdo con la existencia natural de segmentos J encontrados en productos génicos de inmunoglobulina, produciendo 7, 6 y 9 combinaciones para, respectivamente, las regiones variables VH, Vkappa y Vlambda (véanse las tablas 3 y 4). Para obtener una distribución normalizada de secuencias de inmunoglobulina en la colección inmunológica, las 6 combinaciones de la cadena ligera Vkappa y las 9 de Vlambda se mezclaron de acuerdo con los porcentajes mencionados en la tabla 3. Esta única combinación de VL final (3 µg) se digirió durante una noche con las enzimas de restricción Sall y NotI, se cargó en y se aisló de un gel de agarosa al 1,5 % (~350 pares de bases) usando columnas de extracción de gel Qiagen y se ligó en el vector PDV-C06 cortado con Sall-NotI (~5000 pares de bases) como sigue: 10 µl de vector PDV-C06 (50 ng/µl), 7 µl de inserto de VL (10 ng/µl), 5 µl de tampón de ligamiento 10X (NEB), 2,5 de ADN ligasa T4 (400 U/µl) (NEB), 25,5 µl de agua ultrapura (la relación de vector a inserto fue 1:2). El ligamiento se realizó durante una noche en un baño de agua de 16 °C. Después, el volumen se duplicó con agua, se extrajo con un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (75:24:1) (Invitrogen) seguido de extracción con cloroformo (Merck) y se precipitó con 1 µl de Pellet Paint (Novogen), 10 µl de acetato de sodio (3 M pH 5,0) y 100 µl de isopropanol durante 2 h a -20 °C. La muestra obtenida posteriormente se centrifugó a 20 000 x g durante 30 min a 4 °C. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70 % y se centrifugó durante 10 min a 20 000 x g a temperatura ambiente. Se retiró el etanol por aspiración al vacío y el sedimento se secó al aire durante varios min y después se disolvió en 50 µl de tampón que contenía Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Se usó 1 µl de mezcla de ligamiento para la transformación de 40 µl de células electrocompetentes TG-1 (Stratagene) en una cubeta de electroporación de 0,1 cm refrigerada (Biorad) usando un aparato Genepulser II (Biorad) configurado a 1,7 kV, 200 Ohm, 25 µF (constante de tiempo ~4,5 ms). Directamente después del impulso, las bacterias purgaron de la cubeta con 1000 µl de medio SOC (Invitrogen) que contenía glucosa al 5 % (p/v) (Sigma) a 37 °C y se transfirieron a un tubo de cultivo de fondo redondo de 15 ml. Se usaron otros 500 µl de SOC/glucosa para purgar las bacterias residuales de la cubeta y se añadieron al tubo de cultivo. Las bacterias se recuperaron cultivando durante exactamente una h a 37 °C en una incubadora de agitación a 220 rpm. Las bacterias transformados se sembraron sobre placas de Petri cuadradas de 240 mm grandes (NUNC) que contenían 200 ml de agar 2TY (16 g/l de triptona Bacto, 10 g/l de extracto de levadura Bacto, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de agar, pH 7,0) complementado con 50 µg/ml de ampicilina y glucosa al 5 % (p/v) (Sigma). Se sembró una dilución de 1 a 1000 con fines de recuento en placas de Petri de 15 cm que contenían el mismo medio. Este procedimiento de transformación se repitió secuencialmente veinte veces y la colección completa se sembró sobre un total de treinta placas de Petri cuadradas grandes y se cultivaron durante una noche en una estufa de cultivo de 37 °C. Típicamente, se obtuvieron aproximadamente 1×10^7 ufc usando el protocolo anterior. La colección intermedia de cadenas ligeras VL se recogió de las placas por raspado suave de las bacterias en 10 ml de medio 2TY por placa. La masa celular se determinó por medición de la DO 600 y se usó dos

veces la DO 500 de las bacterias para la preparación de ADN plasmídico Maxi usando dos columnas P500 Maxiprep (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

De forma análoga a las regiones variables VL, los productos VH-JH de la segunda ronda en primer lugar se mezclaron juntos para obtener la distribución de uso normal del segmento J (véase la tabla 4), produciendo 7 subcombinaciones de VH denominadas PH1 a PH7. Las combinaciones se mezclaron para adquirir una distribución de secuencias normalizada usando los porcentajes representados en la tabla 4, obteniendo una fracción de VH que se digirió con las enzimas de restricción SfiI y XhoI y se ligó en la colección intermedia de PDV-VL cortada con SfiI-XhoI obtenida como se describe anteriormente. La configuración de ligamiento, el método de purificación, la posterior transformación de TG1 y la recolección de bacterias fueron exactamente como se describe para la colección intermedia de VL (véase anteriormente). La colección final (aproximadamente 5×10^6 ufc) se comprobó para la frecuencia del inserto con una PCR de colonias usando un conjunto de cebadores que flanquean las regiones VH-VL insertadas. Más de un 95 % de las colonias mostraron un inserto de longitud correcta (véase la tabla 5). Los productos de la PCR de colonias se usaron para el posterior análisis de secuencias de ADN para comprobar la variación de secuencias y para evaluar el porcentaje de colonias que mostraban una ORF completa. Esto estuvo típicamente por encima de un 70 % (véase la tabla 5). También se analizó la frecuencia de mutaciones en los genes V. De las 50 secuencias, 47 (94 %) no estaban en la configuración de la línea germinal, indicativo de un proceso de maduración y coherente con el fenotipo de memoria de los linfocitos B usados como fuente de ARN para la colección. Finalmente, la colección se rescató y se amplificó usando fagos auxiliares CT (véase el documento WO 02/103012) y se usó para la sección de anticuerpos en fagos por métodos de barrido como se describe a continuación.

Ejemplo 2

Selección de fagos que portan fragmentos Fv monocatenarios contra los subtipos H3 y H7 de gripe A y gripe B.

Los fragmentos de anticuerpo se seleccionaron usando colecciones de presentación en fagos de anticuerpos construidas esencialmente como se describe anteriormente y tecnología de presentación en fagos general y tecnología MABSTRACT® esencialmente como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.265.150 y en el documento WO 98/15833. Además, los métodos y fagos auxiliares como se describe en el documento WO 02/103012 se usaron en la presente invención.

La selección se realizó frente a hemaglutinina recombinante (HA) del subtipo H3 de gripe A (A/Wisconsin/67/2005) y H7 (A/Países Bajos/219/2003) o gripe B (B/Ohio/01/2005). Los antígenos HA se diluyeron en PBS (5,0 µg/ ml), se añadieron a inmunotubos Nunc MaxiSorp™ (Nunc) y se incubaron durante una noche a 4 °C en una rueda giratoria. Los inmunotubos se vaciaron y se lavaron tres veces en tampón de bloqueo (2 % de leche desnatada en polvo (ELK) en PBS). Posteriormente, los inmunotubos se llenaron completamente con tampón de bloqueo y se incubaron durante 1-2 h a temperatura ambiente. Alícuotas de la colección de presentación en fagos (500-1000 µl, $0,5 \times 10^{13}$ - 1×10^{13} ufc, amplificados usando fago auxiliar CT (véase el documento WO 02/103012)) se bloquearon en tampón de bloqueo complementado con un 10 % de suero bovino fetal no inactivado con calor y un 2 % de suero de ratón durante 1-2 h a temperatura ambiente. La colección de fagos bloqueada se añadió a los inmunotubos, se incubó durante 2 h a temperatura ambiente, y se lavó con tampón de lavado (Tween-20 al 0,05 % (v/v) en PBS) para retirar los fagos no unidos. Los fagos unidos se eluyeron del antígeno respectivo por incubación con 1 ml de trietilamina (TEA) 100 mM durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los fagos eluidos se mezclaron con 0,5 ml de Tris-HCl 1 M pH 7,5 para neutralizar el pH. Esta mezcla se usó para infectar 5 ml de un cultivo de *E. coli* XL1-Blue que se había cultivado a 37 °C hasta una DO 600 nm de aproximadamente 0,3. Se dejó que los fagos infectaran las bacterias XL1-Blue durante 30 min a 37 °C. Después, la mezcla se centrifugó durante 10 min a 3000 x g a temperatura ambiente y el sedimento bacteriano se resuspendió en 0,5 ml de medio de extracto de levadura 2-triptona (2TY). La suspensión bacteriana obtenida se dividió sobre dos placas de agar 2TY complementado con tetraciclina, ampicilina y glucosa. Después de incubación durante una noche de las placas a 37 °C, las colonias se rasparon de las placas y se usaron para preparar una colección de fagos enriquecida, esencialmente como se describe por De Kruif *et al.* (1995a) y el documento WO 02/103012. En resumen, las bacterias raspadas se usaron para inocular medio 2TY que contenía ampicilina, tetraciclina y glucosa y se cultivaron a una temperatura de 37 °C hasta una DO 600 nm de ~0,3. Se añadieron fagos auxiliares CT y se dejó que infectaran las bacterias, tras lo que el medio se cambió a 2TY que contenía ampicilina, tetraciclina y kanamicina. La incubación se continuó durante una noche a 30 °C. El siguiente día, las bacterias se retiraron del medio 2TY por centrifugación, tras lo que los fagos en el medio se precipitaron usando polietilenglicol (PEG) 6000/NaCl. Finalmente, los fagos se disolvieron en 2 ml de PBS con seroalbúmina bovina (BSA) al 1 %, se esterilizaron con filtro y se usaron para la siguiente ronda de selección. La segunda ronda de selección se realiza sobre el mismo subtipo de HA o sobre HA de un subtipo diferente.

Se realizaron dos rondas consecutivas de selecciones antes del aislamiento de anticuerpos fágicos monocatenarios individuales. Después de la segunda ronda de selección, se usaron colonias de *E. coli* individuales para preparar anticuerpos fágicos monoclonales. Esencialmente, se cultivaron colonias individuales hasta fase logarítmica en formato de placa de 96 pocillos y se infectaron con fagos auxiliares VCS-M13, tras lo que se dejó que la producción de anticuerpos fágicos prosiguiera durante una noche. Los sobrenadantes que contenían anticuerpos fágicos se

usaron directamente en ELISA para unión a antígenos HA. Como alternativa, los anticuerpos fágicos se precipitaron con PEG/NaCl y se esterilizaron con filtro tanto para ELISA como para análisis de citometría de flujo.

Ejemplo 3

Validación de los anticuerpos fágicos monocatenarios específicos de HA

Los sobrenadantes seleccionados que contenían anticuerpos fágicos monocatenarios que se obtuvieron en los cribados descritos anteriormente se validaron en ELISA para la especificidad, es decir, unión a diferentes antígenos HA. Para este fin, las HA recombinantes expresadas en baculovirus H3 (A/Wisconsin/67/2005), H7 (A/Países Bajos/219/2003) y B (B/Ohio/01/2005) (Protein Sciences, CT, EE. UU.) se recubrieron sobre placas de ELISA Maxisorp™. Después del recubrimiento, las placas se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,1 % v/v y se bloquearon en PBS que contenía BSA al 3 % o ELK al 2 % durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos fágicos monocatenarios seleccionados se incubaron durante 1 h en un volumen igual de PBS que contenía ELK al 4 % para obtener anticuerpos fágicos bloqueados. Las placas se vaciaron, se lavaron tres veces con PBS/Tween-20 al 0,1 % y los anticuerpos fágicos monocatenarios bloqueados se añadieron a los pocillos. Se dejó que la incubación prosiguiera durante una h, las placas se lavaron con PBS/Tween-20 al 0,1 % y se detectaron los anticuerpos fágicos unidos (usando medición de DO 492 nm) usando un anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa. Como control, el procedimiento se realizó simultáneamente sin anticuerpo fágico monocatenario y con un anticuerpo fágico monocatenario de control negativo no relacionado. De las selecciones sobre los diferentes antígenos HA con las colecciones de linfocitos B de memoria de IgM, se obtuvieron 6 anticuerpos fágicos monocatenarios únicos específicos para HA H3 y HA H7 recombinantes (SC08-001, SC08-003, SC08-006, SC08-014, SC08-017 y SC08-018). Además, se aislaron 2 anticuerpos fágicos monocatenarios únicos específicos para HA H3 recombinante (SC08-015 y SC08-016) y 5 para HA H7 recombinante (SC08-007, SC08-009, SC08-010, SC08-011 y SC08-013). Véase la tabla 6.

Como alternativa, se usaron anticuerpos fágicos precipitados con PEG/NaCl y esterilizados con filtro para validar la unión y especificidad en ELISA. Para este fin, las HA recombinantes expresadas en baculovirus de gripe A H1 (A/Nueva Caledonia/20/1999), H3 (A/Wisconsin/67/2005), H5 (A/Vietnam/1203/2004), H7 (A/Países Bajos/219/2003) y gripe B (B/Ohio/01/2005, B/Malasia/2506/2004, B/Jilin/219/2003) (Protein Sciences, CT, EE. UU.) se recubrieron sobre placas de ELISA Maxisorp™. Después del recubrimiento, las placas se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,1 % v/v y se bloquearon en PBS que contenía BSA al 3 % o ELK al 2 % durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos fágicos monocatenarios seleccionados se incubaron durante 1 h en un volumen igual de PBS que contenía ELK al 4 % para obtener anticuerpos fágicos bloqueados. Las placas se vaciaron, se lavaron tres veces con PBS/Tween-20 al 0,1 % y los anticuerpos fágicos monocatenarios bloqueados se añadieron a los pocillos. Se dejó que la incubación prosiguiera durante una h, las placas se lavaron con PBS/Tween-20 al 0,1 % y se detectaron los anticuerpos fágicos unidos (usando medición de DO 492 nm) usando un anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa. Como control, el procedimiento se realizó simultáneamente sin anticuerpo fágico monocatenario y con un anticuerpo fágico monocatenario de control negativo. De las selecciones sobre los diferentes antígenos HA con las colecciones de linfocitos B de memoria de IgM, se obtuvieron 2 anticuerpos fágicos monocatenarios únicos específicos para HA H1, H3 y H7 recombinantes (SC08-001 y SC08-014). Además, se aislaron 6 anticuerpos fágicos monocatenarios únicos específicos para HA H3 recombinante (SC08-003, SC08-006, SC08-015, SC08-016, SC08-017 y SC08-018) y 5 para HA H7 recombinante (SC08-007, SC08-009, SC08-010, SC08-011 y SC08-013). Véase la tabla 7.

Como alternativa, se usaron anticuerpos fágicos precipitados con PEG/NaCl y esterilizados con filtro para validar la unión y especificidad por análisis FACS. Para este fin, se expresaron HA recombinantes de longitud completa de gripe A subtipos H1 (A/Nueva Caledonia/20/1999), H3 (A/Wisconsin/67/2005), H5 (TV), H7 (A/Países Bajos/219/2003) y gripe B (B/Ohio/01/2005) sobre la superficie de células PER.C6. Las células se incubaron con anticuerpos fágicos monocatenarios durante 1 h seguido de tres etapas de lavado con PBS + BSA al 0,1 %. Los fagos unidos se detectaron usando anticuerpo contra M13 conjugado con FITC. De las selecciones sobre los diferentes antígenos HA con las colecciones de linfocitos B de memoria de IgM, se aisló un anticuerpo fágico monocatenario específico para los subtipos de HA de gripe A H1, H3 y H7 (SC08-001). Además, se aislaron 6 anticuerpos fágicos monocatenarios únicos específicos para HA H3 (SC08-003, SC08-006, SC08-015, SC08-016, SC08-017 y SC08-018), 4 anticuerpos fágicos monocatenarios únicos específicos para HA H7 (SC08-007, SC08-010, SC08-011 y SC08-013). Véase la tabla 8. De estos, se usaron seis anticuerpos fágicos (SC08-001, SC08-003, SC08-015, SC08-016, SC08-017, SC08-018) para la construcción de inmunoglobulinas completamente humanas para mayor caracterización (véase el ejemplo 5).

Ejemplo 4

Selección y validación de clones de linfocitos B inmortalizados específicos de HA de la gripe A (H3N2)

Además de la presentación en fagos, las moléculas de unión de la presente invención también pueden aislarse mediante otros métodos, por ejemplo, usando linfocitos B inmortalizados, como se describe en, por ejemplo, el documento WO 2007067046. Se tiñeron células de memoria de IgM inmortalizadas (CD19+/CD27+, IgD+), derivadas de donadores vacunados, con HA H3 marcado con APC y las células individuales se clasificaron en cultivo de dilución

limitante. Después de la recuperación y expresión celular, los sobrenadantes de las células clasificadas por HA H3 se midieron por ELISA en fase sólida para la inmunorreactividad de H1, H3 y H7.

Posteriormente, los linfocitos B específicos de diana se caracterizaron para la actividad de unión y neutralización. Los linfocitos B se clonaron por dilución limitante para producir clones individuales. Los clones se sembraron en placas de cultivo y las células se cultivaron durante 14 días. Los sobrenadantes de los clones se cribaron para la producción de anticuerpos monoclonales anti-HA que se unen a células 293 transfectadas con HA que expresan HA derivada de H1, H3, H5 y H7. Como control para tinción específica o de fondo, se usaron células 293 no transfectadas.

Para determinar si los sobrenadantes del clon de linfocito B seleccionado que contienen anticuerpos IgM o IgG que se obtuvieron en los cribados descritos anteriormente pueden bloquear la infección con gripe A (H3N2), se realizó un ensayo de neutralización de virus (VNA) *in vitro*. El VNA se realizó sobre células MDCK (ATCC CCL-34). Se cultivaron células MDCK en medio de cultivo de células MDCK (medio MEM complementado con antibióticos, Hepes 20 mM y bicarbonato de sodio al 0,15 % (p/v) (medio MEM completo), complementado con suero bovino fetal al 10 % (v/v)). La cepa H3N2 (A/Wisconsin/67/2005), que se usó en el ensayo se diluyó hasta un valor cuantitativo de $5,7 \times 10^3$ DICT50/ml (dosis infecciosa para el 50 % del histocultivo por ml), con el valor cuantitativo calculado de acuerdo con el método de Spearman y Karber. Las preparaciones de IgG o IgM se diluyeron en serie en factor 2 (1:2 - 1:64) en medio MEM completo en pocillos cuadruplicados. Se mezclaron 25 µl de la dilución respectiva de IgG con 25 µl de suspensión de virus (100 DICT50/25 µl) y se incubaron durante una h a 37 °C. La suspensión entonces se transfirió por cuadruplicado en placas de 96 pocillos que contenían cultivos de MDCK confluentes en 50 µl de medio MEM completo. Antes de su uso, las células MDCK se sembraron a 3×10^4 células por pocillo en medio de cultivo de células MDCK, se cultivaron hasta que las células hubieron alcanzado la confluencia, se lavaron 300-350 µl de PBS, pH 7,4 y finalmente se añadieron 50 µl de medio MEM completo a cada pocillo. Las células inoculadas se cultivaron durante 3-4 días a 37 °C y se observaron diariamente para el desarrollo de efecto citopatógeno (CPE). El CPE se comparó con el control positivo.

De los 187 sobrenadantes de IgG ensayados, se encontró que 43 neutralizaban la cepa H3N2 (A/Wisconsin/67/2005) usada en este ensayo. De estos, 14 se usaron para la construcción de inmunoglobulinas IgG humanas como se describe en ejemplo 5.

Ejemplo 5

Construcción de moléculas de inmunoglobulina completamente humanas (anticuerpos monoclonales humanos) de los Fv monocatenarios y clones de linfocitos B seleccionados

De los clones de anticuerpos fágicos monocatenarios (scFv) específicos seleccionados se obtuvo el ADN plasmídico y se determinaron las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de acuerdo con técnicas convencionales. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera de los scFv se clonaron directamente mediante digestión de restricción para la expresión en los vectores de expresión de IgG plg-C911-HCgamma1 (véase SEQ ID NO: 189), plg-C909-Ckappa (véase SEQ ID NO: 190) o plg-C910-Clambda (véase SEQ ID NO: 191). Las regiones variables de la cadena pesada y ligera de los clones de linfocitos B se amplificaron por PCR y se clonaron directamente mediante digestión de restricción para la expresión en los vectores de expresión de IgG plg-C911-HCgamma1 (véase SEQ ID NO: 190), plg-C909-Ckappa (véase SEQ ID NO: 191) o plg-C910-Clambda (véase SEQ ID NO: 192). La identidad génica de VH y VL (véase Tomlinson IM *et al.* V-BASE Sequence Directory. Cambridge Reino Unido: MRC Centre for Protein Engineering (1997)) de los scFv se determinó (véase la tabla 9).

Se verificaron las secuencias de nucleótidos para todas las construcciones de acuerdo con técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. Las construcciones de expresión resultantes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de IgG1 humana se expresaron de forma transitoria en combinación en células 293T y se obtuvieron los sobrenadantes que contenían anticuerpos IgG1 humanos y se produjeron usando procedimientos convencionales de purificación. Los anticuerpos IgG1 humanos se valoraron en un intervalo de concentración entre 10 y 0,003 µg/ml frente a antígeno H3, H7 o B (datos no mostrados). Se incluyó un anticuerpo no relacionado como anticuerpo de control.

La secuencia de aminoácidos de las CDR de las cadenas pesada y ligera de las moléculas de inmunoglobulina seleccionadas se da en la tabla 9. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y ligera se dan a continuación. Las inmunoglobulinas comprenden la región constante de la cadena pesada y ligera de CR6261, como se da a continuación.

Ejemplo 6

Neutralización in vitro de virus de la gripe mediante IgG que se unen a H3N2 (ensayo de neutralización de virus)

Para determinar si las IgG seleccionadas podían bloquear la infección de gripe A (H3N2), se realizó un ensayo de neutralización de virus (VNA) *in vitro*. El VNA se realizó sobre células MDCK (ATCC CCL-34). Se cultivaron células

MDCK en medio de cultivo de células MDCK (medio MEM complementado con antibióticos, Hepes 20 mM y bicarbonato de sodio al 0,15 % (p/v) (medio MEM completo), complementado con suero bovino fetal al 10 % (v/v)). La cepa H3N2 (A/Wisconsin/67/2005), que se usó en el ensayo se diluyó hasta un valor cuantitativo de $5,7 \times 10^3$ DICT50/ml (dosis infecciosa para el 50 % del histocultivo por ml), con el valor cuantitativo calculado de acuerdo con el método de Spearman y Karber. Las preparaciones de IgG (200 µg/ml) se diluyeron en serie en factor 2 (1:2 - 1:512) en medio MEM completo en pocillos cuadruplicados. Se mezclaron 25 µl de la dilución respectiva de IgG con 25 µl de suspensión de virus (100 DICT50/25 µl) y se incubaron durante una h a 37 °C. La suspensión entonces se transfirió por cuadruplicado en placas de 96 pocillos que contenían cultivos de MDCK confluentes en 50 µl de medio MEM completo. Antes de su uso, las células MDCK se sembraron a 3×10^4 células por pocillo en medio de cultivo de células MDCK, se cultivaron hasta que las células hubieron alcanzado la confluencia, se lavaron 300-350 µl de PBS, pH 7,4 y finalmente se añadieron 50 µl de medio MEM completo a cada pocillo. Las células inoculadas se cultivaron durante 3-4 días a 37 °C y se observaron diariamente para el desarrollo de efecto citopatógeno (CPE). El CPE se comparó con el control positivo.

Los anticuerpos humanos anti-HA H3 y/o anti-HA H7 del ejemplo 5 se sometieron al VNA descrito anteriormente. De estos anticuerpos, todos los anticuerpos, excepto CR8040, CR8052 y CR8069, neutralizaron la cepa H3N2 A/Wisconsin/67/2005. Las concentraciones (en µg/ml) a las que estos anticuerpos protegen los cultivos MDCK frente al CPE se dan en la tabla 11.

Ejemplo 7

Reactividad de unión cruzada de IgG anti-H3N2

Los anticuerpos IgG neutralizantes de H3N2 descritos anteriormente se validaron en ELISA para la especificidad de unión, es decir, la unión a diferentes antígenos HA. Para este fin, las HA recombinantes expresadas en baculovirus H1 (A/Nueva Caledonia/20/1999), H3 (A/Wisconsin/67/2005, A/Nueva York/55/2004, A/Wyoming/3/2003) y H7 (A/Países Bajos/219/2003) (Protein Sciences, CT, EE. UU.) se recubrieron sobre placas de ELISA Maxisorp™. Después del recubrimiento, las placas se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,1 % v/v y se bloquearon en PBS que contenía BSA al 3 % o ELK al 2 % durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se vaciaron, se lavaron tres veces con PBS/Tween-20 al 0,1 % y los anticuerpos IgG se añadieron a los pocillos. Se dejó que la incubación prosiguiera durante una h, las placas se lavaron con PBS/Tween-20 al 0,1 % y se detectaron los anticuerpos unidos (usando medición de DO 492 nm) usando un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa. Como control, se usó una IgG no relacionada CR4098.

De los anticuerpos neutralizantes de H3N2 seleccionados, CR8001 muestra unión cruzada heterosubtípica a todas las HA recombinantes ensayadas, CR8020, CR8021, CR8041, CR8043 y CR8057 muestran unión cruzada heterosubtípica a las 3 HA H3 ensayadas, así como la HA H7. CR8003, CR8015, CR8016, CR8017, CR8018, CR8038, CR8039, CR8040, CR8049, CR8050, CR8052 y CR8069 muestran unión cruzada a las 3 HA H3 ensayadas. Un anticuerpo, CR8019, muestra unión a solamente 2 de las HA H3. Véase la tabla 12.

Además, los anticuerpos neutralizantes de H3N2 seleccionados se usaron para ensayar la unión heterosubtípica por análisis FACS. Para este fin, se expresaron HA recombinantes de longitud completa de gripe A subtipos H1 (A/Nueva Caledonia/20/1999), H3 (A/Wisconsin/67/2005) y H7 (A/Países Bajos/219/2003) sobre la superficie de células PER.C6. Las células se incubaron con anticuerpos IgG durante 1 h seguido de tres etapas de lavado con PBS + BSA al 0,1 %. Los anticuerpos unidos se detectaron usando anticuerpo antihumano conjugado con PE. Como control, se usaron células PER.C6 no transfectadas.

De los anticuerpos neutralizantes de H3N2, CR8001 muestra actividad de unión cruzada a los subtipos de HA de gripe A H1, H3 y H7, pero no células PER.C6 de tipo silvestre. Además, CR8020 y CR8041 muestran fuerte unión a HA tanto H3 como H7. CR8043 y CR8057 muestran fuerte unión a HA H3 y débil unión a HA H7. CR8055 mostró niveles bajos de tinción de fondo sobre células PER.C6. Los 13 anticuerpos restantes muestran unión a células transfectadas con H3 solamente. Véase la tabla 12.

Ejemplo 8

Actividad neutralizante cruzada de IgG anti-H3N2

Para determinar si las IgG seleccionadas podían bloquear múltiples cepas de gripe A, se realizaron ensayos de neutralización de virus (VNA) *in vitro* adicionales. Los VNA se realizaron sobre células MDCK (ATCC CCL-34). Se cultivaron células MDCK en medio de cultivo de células MDCK (medio MEM complementado con antibióticos, Hepes 20 mM y bicarbonato de sodio al 0,15 % (p/v) (medio MEM completo), complementado con suero bovino fetal al 10 % (v/v)). Las cepas H1N1 (A/Nueva Caledonia/20/1999, A/Brisbane/59/2007 y A/Islands Salomón/IVR-145), H3N2 (A/Hong Kong/1/68, A/Johannesburgo/33/94, A/Panamá/2000/1999, A/Hiroshima/52/2005 y A/Wisconsin/67/2005), H7N3 (A/Ánade real/Países Bajos/12/2000) y H10 (A/Pollo/Alemania/N/49) que se usaron en el ensayo se diluyeron todas hasta un valor cuantitativo de $5,7 \times 10^3$ DICT50/ml (dosis infecciosa para el 50 % del histocultivo por ml), con el valor cuantitativo calculado de acuerdo con el método de Spearman y Karber. Las preparaciones de IgG (80 µg/ml) se

diluyeron en serie en factor 2 (1:2 - 1:512) en medio MEM completo en pocillos cuadruplicados. Se mezclaron 25 µl de la dilución respectiva de IgG con 25 µl de suspensión de virus (100 DICT50/25 µl) y se incubaron durante una h a 37 °C. La suspensión entonces se transfirió por cuadruplicado en placas de 96 pocillos que contenían cultivos de MDCK confluyentes en 50 µl de medio MEM completo. Antes de su uso, las células MDCK se sembraron a 3×10^4 células por pocillo en medio de cultivo de células MDCK, se cultivaron hasta que las células hubieron alcanzado la confluencia, se lavaron 300-350 µl de PBS, pH 7,4 y finalmente se añadieron 50 µl de medio MEM completo a cada pocillo. Las células inoculadas se cultivaron durante 3-4 días a 37 °C y se observaron diariamente para el desarrollo de efecto citopatógeno (CPE). El CPE se comparó con el control positivo.

Del panel de anticuerpos neutralizantes de H3N2, CR8020 y CR8041 muestran actividad neutralizante cruzada heterosubtípica frente a todos los virus de gripe A de subtipos H3, H7 y H10 ensayados, pero no virus H1. Además, CR8043 muestra neutralización cruzada frente a todas las cepas de virus H3 y H10 ensayadas. CR8039, CR8041, CR8043 y CR8057 muestran neutralización cruzada de todas las cepas de virus H3 ensayadas. Unos 13 anticuerpos adicionales muestran neutralización cruzada frente a más de 1 de las cepas de virus H3 ensayadas. Véase la tabla 13.

Ejemplo 9

Los anticuerpos anti-H3N2 se unen a la conformación prefusión de HA

Para determinar si las IgG seleccionadas podían unirse a la conformación pre- o posfusión de la molécula de HA, se realizó un experimento de desplazamiento de pH *in vitro*.

Para este fin, se expresó HA recombinante de longitud completa de gripe A subtipo H3 (A/Wisconsin/67/2005) sobre la superficie de células PER.C6. Para ensayar la reactividad específica en diferentes conformaciones estructurales de HA, 3×10^5 células se trataron con 10 µg/ml tripsina-EDTA en DMEM durante 30 min a TA, se lavaron y se incubaron durante 5 min en PBS acidificado (pH 4,9), se lavaron y después se incubaron durante 20 min en presencia de DTT 20 mM a TA. Las células se dividieron en cada etapa y se resuspendieron las células adherentes sin tratar en EDTA al 0,05 %. Las fracciones celulares de cada tratamiento se incubaron con IgG anti-H3N2 CR8001, CR8020, CR8041, CR8043 y CR8057 durante 30 min. Las células entonces se incubaron durante 30 min con anticuerpo anti-IgG conjugado con ficoeritrina (Southern Biotech). Las células teñidas se analizaron usando un FACS Calibur con el programa informático CELLQuest Pro (Becton Dickinson). La unión por FACS de IgG1 a rHA H3 expresada en superficie se midió después de tratamiento secuencial con tripsina (barras a rayas), medio tamponado a pH 4,9 (barras blancas rellenas) y DTT (barras cruzadas) y se expresó como porcentaje de unión a rHA sin tratar (barras negras rellenas). Véase la figura 2. Los anticuerpos CR8001, CR8020, CR8041 y CR8043 muestran todos una disminución marcada en la unión después de desplazamiento del pH, lo que indica especificidad por un epítipo presente solamente antes del cambio conformacional inducido a bajo pH de la molécula de HA. El anticuerpo CR8057 mostró una disminución en la unión solamente después de tratamiento con DTT, lo que indica especificidad por un epítipo independiente de conformación disponible solamente cuando está presente HA1.

Ejemplo 10

El anticuerpo anti-H3N2 CR8041 previene la escisión de HA0

Para determinar si las IgG seleccionadas podían proteger la molécula de HA de la escisión con proteasa, se realizó un ensayo de susceptibilidad a proteasa *in vitro*.

Para este fin, 7,5 µg de HA recombinante soluble de gripe A subtipo H3 (A/Wisconsin/67/2005) (Protein Sciences, CT, EE. UU.) se sometieron a diferentes tratamientos de pH (4,9, 5,3 y 8,0) durante 1 hora a 37 °C. Después de incubación, se neutralizaron las reacciones. Las muestras se digirieron durante una noche con 0,5 µg de tripsina en presencia y ausencia de 7,5 µg de los fragmentos Fab CR8041 o CR8057. Las reacciones se interrumpieron mediante la adición de tampón de carga de SDS. Se añadieron 3 µl de agente reductor Nupage (Invitrogen) a cada muestra. Las muestras se procesaron en un gel de BisTris al 4-12 % en tampón MOPS 1x. Las bandas de proteína se visualizaron mediante tinción con azul coloidal (véase la figura 3). En ausencia de fragmentos Fab, la molécula de HA H3 se convierte fácilmente en su forma posfusión susceptible a proteasa a pH 4,9 o 5,3, pero no a pH 8,0. En presencia del fragmento Fab CR8057, no se inhibe la degradación de HA H3 y, por tanto, el cambio conformacional a pH 4,9. En contraste, la presencia de Fab CR8041 no solamente previene el cambio conformacional de HA H3 y la degradación a bajo pH, sino también la escisión independiente de pH de HA0 en HA1 y HA2. Estos resultados apuntan a un epítipo para CR8041 sobre, o cerca de, el sitio de escisión. Los experimentos de competición (resultados no mostrados) con el panel de anticuerpos anti-H3N2 indican un epítipo solapante y un mecanismo de trabajo similar para los anticuerpos CR8001, CR8020 y CR8043.

Ejemplo 11

Mecanismo de acción de las moléculas de unión de la invención

La glucoproteína HA es un trímero en el que cada monómero consiste en dos glucopéptidos ligados por disulfuro (denominados HA1 y HA2) que se producen durante la infección por escisión proteolítica de un precursor (HA0). La escisión es necesaria para la infectividad del virus, ya que es necesaria para sensibilizar la HA para la fusión membranaria, para permitir el cambio conformacional.

La activación de la molécula sensibilizada se produce a bajo pH en los endosomas, entre pH 5 y pH 6, y requiere cambios amplios en la estructura de HA. La estructura tridimensional de las conformaciones de HA sin escindir prefusión (I), escindida prefusión (II) y posfusión (III) se muestran esquemáticamente en la figura 4.

In vitro, los cambios conformacionales de la molécula de HA pueden imitarse usando células de mamífero con HA expresada en superficie. En primer lugar, la escisión proteolítica puede desencadenarse añadiendo tripsina a las células. En segundo lugar, el cambio conformacional pre- a posfusión puede conseguirse reduciendo el pH. Además, la parte HA1 de la molécula puede retirarse añadiendo un agente reductor como DTT. De esta manera, y mediante la adición de los anticuerpos en fases específicas, es posible investigar la fase en la que el anticuerpo interfiere con el proceso de infección. Para esto, se transfectaron células PER.C6[®] con una construcción de expresión de HA H3 que albergaba HA de A/Wisconsin/67/2005 y se sometieron a diferentes tratamientos como se describe en el ejemplo 10.

Para este experimento, en primer lugar las células se incubaron con mAb anti-H3 antes de la escisión con tripsina y posteriormente se trataron como se describe anteriormente (véase la figura 5).

La unión de los mAb anti-H3 se detectó con anticuerpo antihumano conjugado con PE de acuerdo con protocolos convencionales. Se midieron las señales de fluorescencia por análisis FACS. "Solamente células" significa la señal obtenida después de la unión de mAb a células sin tratar y se estableció al 100 %. Como puede observarse en la figura 5, los mAb aún se unen a HA después de los diferentes tratamientos. Como se mostró en el ejemplo 10 anterior que los mAb contra H3 CR8020, CR8041 y CR8043 solamente se unen al estado prefusión (es decir, antes del desplazamiento conformacional debido a un menor pH), se concluyó que la unión del anticuerpo, de hecho, inhibe la escisión por tripsina (véase también el ejemplo 10), al menos *in vitro* y, por tanto, también las etapas posteriores que dan lugar al cambio conformacional y la fusión. El anticuerpo CR8057 que se une a la parte HA1 de la molécula de HA cerca del sitio de fijación del receptor puede unirse a HA después del desplazamiento conformacional y, como se espera, se pierde cuando la parte HA1 se retira después de alteración de los enlaces disulfuro entre los dominios HA1 y HA2 mediante tratamiento con DTT.

La inhibición de la escisión con tripsina se confirmó posteriormente en un experimento *in vitro* diferente. En primer lugar, se realizó un experimento de transcurso temporal para determinar el tiempo que debe incubarse HA H3 con tripsina para conseguir una escisión apropiada de HA0 en HA1 y HA2. Para esto, se incubó HA H3 soluble recombinante (A/Wisconsin/67/2005; Protein Sciences, CT, EE. UU.) en tampón Tris.HCl 4 mM a pH 8,0 que contenía 6,7 µg/ml de tripsina y N-dodecil-β-maltósido al 1 %. La digestión con tripsina se detuvo en varios puntos temporales mediante la adición de BSA al 1 %. Las muestras se procesaron en gel de SDS-page (reducido) y se transfirieron de acuerdo con métodos convencionales. Las bandas de HA0, HA1 y HA2 se detectaron usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-H3HA (Protein Sciences, CT, EE. UU.). La figura 6 muestra que 2 h de incubación es suficiente para la escisión casi completa evidenciada por la aparición de las bandas de HA1 y HA2 en el gel reductor. Después, se incubó HA H3 soluble recombinante con CR8020, CR8041, CR8043 o CR8057 y posteriormente se sometió a escisión con tripsina a pH 8,0. La digestión con tripsina se detuvo de nuevo en varios puntos temporales añadiendo BSA al 1 %. Las muestras se procesaron en SDS-page (reducido) y se transfirieron. Las bandas de HA0, HA1 y HA2 se detectaron usando un anticuerpo policlonal anti-H3. Los resultados muestran que los tres mAb CR8020, CR8041 y CR8043 previenen la escisión con tripsina *in vitro* ya que la incubación de la HA H3 unida al anticuerpo con tripsina provoca la protección de la forma HA0 de HA en el gel (figura 7). En contraste, la incubación de HA H3 con un mAb de control (CR8057) en las mismas condiciones provoca la desaparición de la banda de HA0. Este experimento confirma los datos analizados en el ejemplo 10 para CR8041 y amplía esta observación de los anticuerpos CR8020 y CR8043. Las moléculas de unión de la invención, por tanto, previenen al menos la escisión con tripsina de la molécula HA0, al menos *in vitro*. Sin embargo, se aprecia que esto no excluye que los efectos inhibidores adicionales también estén mediados por los mAb CR8020, CR8041 y CR8043 que son más posteriores en el proceso de infección y provocan la interferencia con el desplazamiento conformacional inducido por pH y/o el proceso de fusión. Para investigar si este podría ser el caso, se repitió el experimento analizado anteriormente, pero ahora el anticuerpo CR8043, o el anticuerpo CR8057 como control, se añadió a las células que expresan HA H3 solamente después de la escisión con tripsina. Después de la incubación, las células se incubaron posteriormente en tampón de bajo pH como se describe en el ejemplo 10 y se trataron con DTT como se describe. Si el mecanismo de acción estuviera restringido a la inhibición de la escisión con tripsina, se esperaría que el mAb CR8043 perdiera la unión después de tratamiento de pH, ya que hemos establecido en el ejemplo 10 que los anticuerpos no se unen a la conformación posfusión de HA. En contraste, como puede observarse de la figura 8, la unión del mAb CR8043 aún se detecta después de la exposición a bajo pH y después del tratamiento con DTT, lo que indica que el desplazamiento conformacional inducido por pH también se inhibe por CR8043, al menos *in vitro*. CR8057, que ha demostrado unirse a la región HA1 de HA se comporta según lo esperado y ya no es detectable cuando la parte HA1 se pierde después de tratamiento con DTT.

Para investigar si los anticuerpos CR8020 y CR8041 también pueden bloquear el cambio conformacional inducido por pH de HA, se repitieron los experimentos analizados anteriormente. Ahora se añadieron los anticuerpos CR8020, CR8041 y CR8043, o el anticuerpo CR8057 como control, a las células que expresaban HA de subtipo H3 A/Hong Kong/1/1968, A/Hong Kong/24/1985 o A/Wisconsin/67/2005 después de todos los tratamientos descritos anteriormente, antes de la incubación a bajo pH o antes de la escisión con tripsina. Como se muestra anteriormente para HA H3 A/Wisconsin/67/2005, los anticuerpos CR8020, CR8041 y CR8043 reconocen un epítipo presente solamente antes del tratamiento de bajo pH. Este epítipo se conserva en las tres HA usadas en este experimento como puede observarse en la figura 9c. Si el mecanismo de acción estuviera restringido a la inhibición de la escisión con tripsina, se esperaría que los mAb CR8020, CR8041 y CR8043 perdieran la unión de HA ya escindida después de tratamiento de pH, ya que hemos establecido en el ejemplo 10 que los anticuerpos no se unen a la conformación posfusión de HA. En contraste, como puede observarse de la figura 9b, la unión del mAb aún se detecta después de la exposición a bajo pH y después del tratamiento con DTT sobre las tres HA H3 diferentes, lo que indica que el desplazamiento conformacional inducido por pH también se inhibe por CR8020, CR8041 y CR8043, al menos *in vitro*. CR8057 que ha demostrado unirse a la región HA1 altamente variable de HA, no muestra unión a las HA A/Hong Kong/1/1968 y A/Hong Kong/24/1985.

Ejemplo 12

Mutantes resistentes generados in vitro indican que la posición del epítipo coincide con una secuencia conservada en HA H3

Para investigar la región en HA a la que se une CR8020, CR8041 y CR8043, se intentó generar mutantes resistentes en cultivos *in vitro*. Se hicieron pases de virus A/Hong Kong/1/1968 en cultivos de células MDCK en presencia de cantidades limitantes de anticuerpos monoclonales. En primer lugar, se determinó la concentración de anticuerpo que provocaba una reducción de 3 log de la infección del virus después de inoculación de células MDCK con 100 unidades DICT50 mezcladas con diferentes cantidades de anticuerpo monoclonal e incubación durante 3 días. Esta concentración de anticuerpo se añadió al inóculo en pases en serie y después de cada pase, el virus se valoró en placa en ausencia y presencia de diferentes cantidades de anticuerpo para determinar si los virus aún eran sensibles a la neutralización mediada por anticuerpo. Este procedimiento se siguió para cada uno de los mAb CR8020, CR8041 y CR8043. De cada cultivo, pudieron aislarse virus resistentes mediante ensayo en placa y, de dos aislados de cada uno, se extrajo el ARN vírico y se usó para determinar la secuencia de HA. Los aminoácidos mutados observados fueron como sigue:

CR8020: D19N y Q27L en ambas placas analizadas;

CR8041: G33E en dos placas;

CR8043: R25M en una y Q34R en la otra placa.

Los tres anticuerpos monoclonales muestran mutaciones resistentes en un dominio similar en la parte HA2 de la región de trínco de HA adyacente al péptido de fusión. La comparación de secuencias de aminoácidos de virus H3N2 presentes en la base de datos de gripe del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/select.cgi>) en esta región revela una conservación sorprendente de la secuencia. La tabla 14 representa la variación de secuencia en la región HA2 entre los aminoácidos W14 y K39 con las mutaciones resistentes resaltadas. N = número de cepas que tienen una secuencia específica. Además, se indica el año de aislamiento (años), así como las cepas que fueron positivas en el ensayo en experimentos de neutralización con los anticuerpos contra H3 (Pa = A/Panamá/2000/1999; Wis = A/Wisconsin/67/2005; Hs = A/Hiroshima/52/2005; HK= A/Hong Kong/1/1968). De los 1363 virus H3 presentes en la base de datos que contenían la secuencia de HA2 mencionada, la mayoría (81 %) tenían secuencias que están presentes en cepas de virus que demostraron neutralizarse. De las secuencias restantes, la mayoría tienen aminoácidos que pueden considerarse cambios conservados. Para las otras mutaciones, se necesitará un ensayo de neutralización funcional para establecer si el cambio afecta a la funcionalidad del anticuerpo. De forma importante, tres cambios aminoacídicos que surgen en el experimento de virus resistente (R25, G33 y Q34) no existen en secuencias naturales de la gripe y las otras dos mutaciones aparecían solamente en combinación (D19 y Q27), una combinación que tampoco está presente en las secuencias naturales. Esto podría significar que las mutaciones tienen un efecto negativo sobre la capacidad del virus. En conjunto, se concluye que los anticuerpos interactúan con un epítipo sobre HA2 que está muy conservado entre los virus del subtipo H3, lo que confirma la amplia capacidad de neutralización de los anticuerpos monoclonales.

Ejemplo 13

Preparación de anticuerpos monoclonales para experimentos in vivo

Para posibilitar la caracterización y la posterior validación de las IgG como posibles anticuerpos terapéuticos *in vivo*, tienen que fabricarse y purificarse en cantidades suficientes. Las IgG se produjeron en células PER.C6® en una bolsa Wave-bag de 25 l y se recogió el cultivo. De la recolección aclarada, se purificó la IgG usando cromatografía de afinidad de Proteína A y una etapa de intercambio de tampón. El contenido de monómero de la IgG con intercambio de tampón

purificada es ~99 % tanto antes como después de filtración a esterilidad de 0,2 µm. Se realizaron ensayos de neutralización de virus (VNA) *in vitro* adicionales con las diferentes preparaciones de anticuerpo obtenidas, como se describe anteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 15.

5 **Ejemplo 14**

Actividad profiláctica de anticuerpos monoclonales IgG humanos contra exposición letal a H3N2 *in vivo*

10 Se ensayaron los mAb CR8020, CR8041 y CR8043 para la eficacia profiláctica en un modelo de exposición letal de ratón con virus de la gripe A/HK/1/68-MA20 (H3N2) en ratones 129X1/SvJ hembra (Jackson Labs) (MA = adaptado a ratón). El virus A/HK/1/68-MA20 se obtuvo de Prof. E.G. Brown, Universidad de Ottawa, Ottawa, Ontario, Canadá; Brown, E. G. *et al.* (2001). Se hizo un pase del virus en huevos de gallina con embrión desarrollado antes de su uso en los experimentos de ratón. Todos los ratones se aclimataron y se mantuvieron durante un periodo de al menos 4 días antes del inicio del experimento.

15 Los mAb se dosificaron a 30, 10, 3 y 1 mg/kg por vía intravenosa en la vena de la cola (*vena coccygeus*) en el día -1 antes de la exposición, suponiendo un peso promedio de 18 g por ratón y un volumen de dosis fijo de 0,2 ml. Los ratones (n = 8 por grupo) entonces se expusieron en el día 0 a 25 DL50 de virus A/HK/1/68-MA20 (H3N2) por inoculación intranasal. La dosis real del virus administrado se estimó valorando unas pocas muestras replicadas del inóculo que permanece después de completarse la inoculación de los animales. Los valores cuantitativos de virus (DICT50/ml) del inóculo se determinaron en células MDCK. Los resultados mostraron que no había producido inactivación del virus de manera no intencionada durante la preparación o administración del inóculo. Se determinaron los signos clínicos y los pesos corporales diariamente desde el día -1 antes de la exposición hasta el final del estudio en el día 21. Se puntuaron los signos clínicos con un sistema de puntuación (0 = sin signos clínicos; 1 = pelaje áspero; 2 = pelaje áspero, menos reactivo, pasivo durante la manipulación; 3 = pelaje áspero, enrollado, respiración dificultosa, pasivo durante la manipulación; 4 = pelaje áspero, enrollado, respiración dificultosa, no rueda de nuevo sobre el estómago cuando se tumba sobre su lomo). A una puntuación de 4 el animal se sacrificaba. Para analizar los niveles plasmáticos de mAb en el día 0 y determinar la presencia de anticuerpos inhibidores de hemaglutinación (HI) en el día 21, se extrajeron muestras de sangre de todos los ratones en D0, justo antes de la exposición, y en D21 después de la infección.

Los mAb se ensayaron en 2 experimentos separados. En cada experimento se llevó conjuntamente un grupo de anticuerpo de control negativo (CR3014), dosificado a 30 mg/kg. Se ensayó el mAb CR8020 en el primer experimento, los mAb CR8041 y CR8043 en el segundo. Todos los ratones estaban activos y parecían sanos sin mostrar signos de enfermedad durante el periodo de aclimatación. La figura 10 muestra las tasas de supervivencia de los ratones, después de la administración de mAb. Se observó una clara relación de dosis-respuesta, mostrando todos los grupos a los que se les dosificó CR8020, CR8041 o CR8043 a 30, 10 o 3 mg/kg un 100 % de supervivencia, mientras que a 1 mg/kg de CR8020 un 25 % de los ratones sobrevivieron y ninguno de los ratones sobrevivió en los grupos de 1 mg/kg de CR8041 y CR8043. Los dos grupos de mAb de control mostraron un 0 % de supervivencia. En el primer experimento, la administración del mAb CR8020 provocó una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de supervivencia a las cuatro concentraciones ensayadas, en comparación con el grupo de control ($p < 0,005$; ensayo del orden logarítmico). En el segundo experimento, la administración de los mAb CR8041 y CR8043 provocó también una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de supervivencia a las cuatro concentraciones ensayadas, en comparación con el grupo de control ($p < 0,001$ para ambos mAb; ensayo del orden logarítmico).

45 En la figura 11, se muestra el cambio en el peso corporal medio de los ratones durante el periodo de estudio de 21 días después de la administración del mAb. Como con las tasas de supervivencia, hay una clara relación inversa entre la pérdida de peso y la dosis de anticuerpo usada. Cuando se aumentaba la concentración de anticuerpo, disminuyó la pérdida de peso: los ratones en los grupos a los que se les dosificó CR8020, CR8041 o CR8043 a 30, 10 o 3 mg/kg mostraron un aumento en el peso corporal medio de aproximadamente un 10-15 % desde el día 0 - día 21, coherente con el aumento de peso relacionado con la edad, mientras que en los grupos de 1 mg/kg y en los grupos de mAb de control, el peso corporal medio de los ratones disminuyó en el periodo de estudio. Se analizaron los cambios de peso corporal en más detalle con el análisis del área bajo la curva (ABC). Para los fines de este análisis, el último peso corporal observado se llevó adelante hasta el día 21 si un ratón moría/se sacrificaba durante el seguimiento del estudio. En resumen, el peso por ratón en el día 0 se usó como valor inicial y se determinó el cambio de peso desde el día 0 hasta el día 21 con respecto a la medida inicial. El ABC se definió como la suma del área por encima y el área por debajo de la medida inicial. Los valores medios de ABC de los grupos de dosis de mAb se compararon con los grupos de control respectivos usando análisis de la varianza con ajuste de Dunnet para comparaciones múltiples (tabla 16). El análisis mostró que la media de ABC de los grupos de 3, 10 y 30 mg/kg de CR8020, CR8041 y CR8043 difería de forma estadísticamente significativa ($p < 0,001$) de la de los grupos de control correspondientes (tabla 16). Para los grupos de dosis de 1 mg/kg tanto de CR8041 como de CR8043, se encontró una diferencia estadísticamente significativa cuando se comparaba con el grupo de control ($p = 0,004$ y $p < 0,001$ respectivamente). Sin embargo, debido a los dos ratones supervivientes en el grupo de dosis de 1 mg/kg de CR8020, se observó un aumento en la variación del peso corporal y, por lo tanto, no pudo demostrarse diferencia estadística significativa cuando se comparaba con el grupo de control.

Se realizó análisis adicional para investigar una respuesta a la dosis en la reducción de la pérdida de peso comparando los valores medios de ABC por concentración de anticuerpo para cada anticuerpo usando análisis de la varianza con ajuste de Tukey para comparaciones múltiples (tabla 16). Para ambos mAb CR8020 y CR8041, la pérdida de peso corporal en los grupos de 1 mg/kg es de forma estadísticamente significativa mayor ($p < 0,001$) que en los respectivos grupos de 3 mg/kg, mientras que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de 3, 10 y 30 mg/kg ($p > 0,05$). Para mAb CR8043, la pérdida de peso en el grupo de 1 mg/kg fue de forma estadísticamente significativa mayor que en el grupo de 3 mg/kg ($p < 0,001$) y también la del grupo de 3 mg/kg fue significativamente mayor que la del grupo de 10 mg/kg ($p < 0,001$). La media de ABC de los grupos de 10 y 30 mg/kg de CR8043 no difirió significativamente ($p = 0,997$).

La medianas de puntuación clínica de los ratones se representan en la figura 12. Los ratones a los que se les dosificó CR8020, CR8041 o CR8043 a 30 y 10 mg/kg no mostraron ningún signo clínico, como se indica por una mediana de puntuación clínica de 0 en todo el periodo de estudio de 21 días de los 2 estudios. El mAb 8020 tampoco mostró puntuación clínica en el grupo de dosis de 3 mg/kg, mientras que en los grupos de dosis de 3 mg/kg de mAb 8041 y 8043 se observaron aumentos en la puntuación clínica hasta una mediana de puntuación de 1 y 3 respectivamente. En los grupos de dosis de 1 mg/kg de los tres mAb, las puntuaciones clínicas se aumentaron alcanzando una mediana de puntuación de 4 en todos los grupos. Los ratones observados con puntuación clínica 4 se sacrificaron en el mismo día. Los 2 ratones supervivientes en el grupo de dosis de 1 mg/kg de CR8020 se pusieron enfermos en el día 7 del estudio y mostraron una puntuación clínica máxima de 1 y 3 respectivamente. Ambos ratones se recuperaron completamente. De los grupos de dosis de 3 mg/kg de CR8041 y CR8043, el perfil de pérdida de peso corporal muestra un patrón similar al perfil de puntuación clínica.

Estos resultados muestran que al menos tres anticuerpos humanos anti-H3N2, identificados y desarrollados como se divulga en este documento (CR8020, CR8041 y CR8043) cada uno por separado pueden proporcionar protección contra una dosis letal de gripe H3N2 *in vivo*. Se observó una clara relación de dosis-respuesta entre la cantidad de cada anticuerpo administrado y la tasa de supervivencia. Los resultados muestran que los anticuerpos IgG anti-H3N2 CR8041 y 8043 podían prevenir la manifestación clínica de la infección por H3N2 en ratones cuando se administraban un día antes de la infección a una dosis de 10 mg/kg o mayor. El mAb CR8020 podía prevenir la manifestación clínica de la infección por H3N2 en ratones cuando se administraban un día antes de la infección a una dosis de 3 mg/kg o mayor.

Ejemplo 15

Actividad protectora y terapéutica de anticuerpos monoclonales IgG humanos contra exposición letal a H3N2 *in vivo*

Se realizó un estudio para ensayar el efecto terapéutico de los anticuerpos monoclonales divulgados en este documento, ejemplificados por CR8020, en un modelo posinfección, contra una exposición letal a virus de la gripe H3N2 A/HK/1/68-MA20 *in vivo*. A ratones ($n = 10$ por grupo) se les dosificó mAb CR8020 a 15 mg/kg por vía intravenosa en la vena de la cola (*vena coccygeus*) en el día -1 antes de la exposición (grupo 1; control positivo de profilaxis) o en el día 1, 2, 3, 4, 5 o 6 después de la exposición (grupos 2-7), suponiendo un peso promedio de 18 g por ratón y un volumen de dosis fijo de 0,2 ml. El grupo 8 recibió mAb CR3014 (15 mg/kg) de control negativo en el día 1 después de la exposición. Los ratones se expusieron en el día 0 con 25 DL50 (2,8 log DICT50) de virus A/HK/1/68-MA20 (H3N2) por inoculación intranasal. El lote y el tipo de virus, y la edad de los ratones fueron los mismos que los usados en el ejemplo 14. Se determinaron los signos clínicos y los pesos corporales diariamente desde el día -1 antes de la exposición hasta el final del estudio en el día 21.

La figura 13A muestra las tasas de supervivencia de los ratones, después de administración intravenosa de mAb CR8020 (15 mg/kg en todos los grupos) o mAb de control (15 mg/kg). Cuando se administraban 15 mg/kg de mAb CR8020 en el día 1 antes de la exposición o los días 1 o 2 después de la exposición, todos los animales sobrevivían a la exposición vírica, mientras que la tasa de supervivencia en el grupo de mAb de control era de un 0 %. Cuando se administraban 15 mg/kg de mAb CR8020 en el día 3 o 4 después de la exposición, se observó supervivencia de un 50 % y 10 %, respectivamente. El tiempo de supervivencia de cada uno de estos grupos era de forma estadísticamente significativa diferente en comparación con el grupo de control (grupo de día 3: $p < 0,001$ y grupo de día 4 $p = 0,002$; ensayo del orden logarítmico). Los grupos tratados con 15 mg/kg de CR8020 en el día 5 o 6 mostraron una tasa de supervivencia de un 0 %. No hubo diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de supervivencia de los grupos tratados en el día 5 o 6 en comparación con el grupo de control ($p = 0,648$ y $p = 0,342$, respectivamente; ensayo del orden logarítmico).

En la figura 13B, se muestra el cambio de peso corporal medio con respecto al día 0 de los ratones durante el periodo de estudio de 21 días. Como con las tasas de supervivencia, hay una clara relación entre la pérdida de peso y el tiempo de la administración de 15 mg/kg de mAb CR8020: cuando el tratamiento con 15 mg/kg de mAb CR8020 se administra a puntos temporales posteriores, aumenta la pérdida de peso.

Los cambios de peso corporal se analizaron estadísticamente en más detalle usando análisis de área bajo la curva (ABC) (tabla 17). Para análisis del área bajo la curva, el último peso corporal observado se llevó adelante hasta el día

21 si un ratón moría/se sacrificaba durante el seguimiento del estudio. En resumen, el peso por ratón en el día 0 se usó como valor inicial y se determinó el cambio de peso desde el día 0 hasta el día 21 con respecto a la medida inicial. El ABC se definió como la suma del área por encima y el área por debajo de la medida inicial.

La medianas de puntuación clínica de los ratones se representan en la figura 13C. De los ratones tratados con 15 mg/kg de CR8020 en el día -1 antes de la exposición, todos sobrevivieron y ninguno mostró ningún signo clínico durante el periodo de observación. Los ratones tratados con 15 mg/kg de CR8020 en el día 1 después de la exposición mostraron una supervivencia de un 100 %, sin embargo, 4 de los 10 animales mostraron signos clínicos, alcanzando una puntuación clínica máxima entre 1 y 3. De los animales tratados con 15 mg/kg de CR8020 en el día 2 después de la exposición, todos sobrevivieron. Sin embargo, 9 de los 10 animales mostraron signos clínicos que alcanzaron una puntuación clínica máxima de 2 o 3. Los animales tratados con 15 mg/kg de CR8020 en el día 3 después de la exposición mostraron una supervivencia de un 50 %. De los supervivientes ($n = 5$), todos los animales mostraron signos clínicos con una puntuación clínica máxima de 3. De los animales tratados con 15 mg/kg de CR8020 en el día 4 después de la exposición, todos los ratones murieron salvo uno. El ratón superviviente mostró signos clínicos que alcanzaron una puntuación clínica máxima de 2. Todos los ratones que sobrevivieron entre los grupos de tratamiento estaban libres de síntomas en el día 21.

Las puntuaciones clínicas se analizaron usando el procedimiento GENMOD (SAS) para ajustar un modelo para medidas repetidas con ratones como sujeto y datos medidos en una escala ordinal (tabla 18). Como las curvas tienen diferentes patrones, la variable "día" se introdujo como una variable de clase en este modelo. De los grupos tratados con 15 mg/kg de mAb CR8020 en el día -1 antes de la exposición y el día 1 y 2 después de la exposición en que un 100 % de los ratones sobrevivieron, la mediana de puntuación clínica fue significativamente diferente del grupo de mAb de control durante la mayor parte del periodo de estudio de 21 días ($p \leq 0,001$ para los 3 grupos). De los grupos tratados con 15 mg/kg de mAb CR8020 en el día 3 o el día 4 después de la exposición en que respectivamente un 50 % y un 10 % de los ratones sobrevivieron, la mediana de puntuación clínica también fue significativamente diferente del grupo de mAb de control durante la mayor parte del periodo de estudio de 21 días ($p < 0,05$ para ambos grupos). De los grupos tratados con 15 mg/kg de mAb CR8020 en el día 5 o día 6 después de la exposición, la mediana de puntuación clínica fue significativamente diferente del grupo de mAb de control en el día 3 solamente ($p \leq 0,001$). Esta diferencia, aunque estadísticamente diferente, no se considera relevante.

En conclusión, el tratamiento con 15 mg/kg de mAb CR8020 proporciona un 100 % de protección hasta el día 2 después de exposición en un modelo de ratón de H3N2 letal. Cuando se administra en el día 3 o día 4 después de la exposición, el tratamiento con 15 mg/kg de mAb CR8020 proporciona protección parcial. Cuando se administraba en el día 5 o día 6 después de la exposición, no se observaba efecto protector de 15 mg/kg de mAb CR8020 en el modelo de ratón de H3N2 letal.

Estos resultados muestran que un tratamiento posinfección con un anticuerpo monoclonal dirigido contra virus de la gripe H3N2, como se divulga en este documento y ejemplificado por el anticuerpo CR8020, puede salvar a sujetos mamíferos, como se muestra en este documento en ratones, después de exposición con una dosis letal de virus de la gripe H3N2. Incluso en una fase tardía, es decir, 4 días después de la infección, el anticuerpo puede proteger parcialmente a los ratones de la infección letal con virus de la gripe H3N2. Sorprendentemente, en el día 21 después de la infección, todos los animales tratados con anticuerpo supervivientes alcanzaron niveles normales de peso corporal y no mostraron ningún signo clínico restante.

Ejemplo 16

Actividad profiláctica de anticuerpos monoclonales IgG humanos contra exposición letal a H7N7 in vivo

Se realizó un estudio para ensayar el efecto profiláctico de los anticuerpos monoclonales divulgados en este documento, ejemplificados por CR8020, contra una exposición letal a virus de la gripe H7N7 *in vivo*. Se ensayó el mAb CR8020 para la eficacia profiláctica en un modelo de ratón de exposición letal con virus de la gripe A/Pollo/Países Bajos/621557/2003 (H7N7) adaptado a ratón (Central Veterinary Institute (CVI), Lelystad, Países Bajos). El virus A/CH/NL/621557/03 (H7N7) se adaptó a ratones después de 3 pases entre pulmones. El virus H7N7 de pase 3 adaptado a ratón se propagó en huevos de gallina con embrión desarrollado en laboratorio de CVI. Todos los ratones (Balb/c, hembra, edad de 6-8 semanas, $n = 8$ por grupo) se aclimataron y mantuvieron durante un periodo de al menos 4 días antes del inicio del experimento. El mAb CR8020 se dosificó a 30, 10, 3 o 1 mg/kg por vía intravenosa en la vena de la cola (*vena coccygeus*) en el día -1 antes de la exposición, suponiendo un peso promedio de 18 g por ratón y un volumen de dosis fijo de 0,2 ml. Se llevó conjuntamente un grupo de control al que se le dosificó 30 mg/kg de mAb de control negativo CR3014. Los ratones entonces se expusieron en el día 0 con 25 DL_{50} de virus A/CH/NL/621557/03 (H7N7) por inoculación intranasal. La dosis real del virus administrado se estimó valorando unas pocas muestras replicadas del inóculo que permanece después de completarse la inoculación de los animales. Los valores cuantitativos de virus ($DICT_{50}/ml$) del inóculo se determinaron en células MDCK. Se determinaron los signos clínicos y los pesos corporales diariamente desde el día -1 antes de la exposición hasta el final del estudio en el día 21 de la misma manera que se describe en el ejemplo 14. Para analizar los niveles plasmáticos de mAb en el día 0 y determinar la presencia de anticuerpos inhibidores de hemaglutinación (HI) en el día 21, se extrajeron muestras de sangre de todos los ratones en D0, justo antes de la exposición, y en D21 después de la infección.

Todos los ratones estaban activos y parecían sanos sin mostrar signos de enfermedad durante el periodo de aclimatación. La figura 14A muestra las tasas de supervivencia de los ratones, después de la administración de mAb. Los ratones a los que se les dosificó 1 mg/kg de mAb CR8020 o más mostraron una tasa de supervivencia de un 100 %, mientras que en el grupo de mAb de control sobrevivió un 0 %.

En la figura 14B, se muestra el cambio en el peso corporal medio de los ratones durante el periodo de estudio de 21 días después de la administración del mAb. En los grupos de 3, 10 y 30 mg/kg de mAb CR8020, los ratones no perdieron peso durante el periodo de estudio de 21 días, mientras que en los grupos de 1 mg/kg de mAb CR8020 y de mAb control se observó pérdida de peso, recuperándose el peso corporal medio de los ratones en el grupo de 1 mg/kg de mAb CR8020 hasta el nivel inicial en el día 21. Los cambios de peso corporal se analizaron en más detalle con análisis de área bajo la curva (ABC) (tabla 19). Para análisis del área bajo la curva, el último peso corporal observado se llevó adelante hasta el día 21 si un ratón moría/se sacrificaba durante el seguimiento del estudio. En resumen, el peso por ratón en el día 0 se usó como valor inicial y se determinó el cambio de peso desde el día 0 hasta el día 21 con respecto a la medida inicial. El ABC se definió como la suma del área por encima y el área por debajo de la medida inicial.

Hay una clara relación inversa entre la pérdida de peso y la dosis de anticuerpo usada. Cuando se aumentaba la concentración de anticuerpo, disminuía la pérdida de peso. La diferencia media en la pérdida de peso, en comparación con el mAb de control, fue de 47,44, 79,75, 86,71 y 80,48 g*día en los grupos de 1, 3, 10 y 30 mg/kg de mAb CR8020, respectivamente. Todas las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

La medianas de puntuación clínica de los ratones se representan en la figura 14C. Todos los animales, excepto uno o dos, dentro de cada grupo mostraron signos clínicos (puntuación = 1) en el día 1 después de la exposición. Esto probablemente no está relacionado con la exposición al virus, ya que un grupo no expuesto llevado conjuntamente en el estudio mostró un efecto similar en el día 1 (datos no mostrados).

De los ratones tratados con 3, 10 o 30 mg/kg de mAb CR8020 en el día -1 antes de la exposición, todos sobrevivieron y ninguno de los animales mostró ningún signo clínico durante el periodo de observación (desde el día 2 hasta el día 21 después de la infección). Los ratones tratados con 1 mg/kg de mAb CR8020 en el día -1 antes de la exposición, mostraron una tasa de supervivencia de un 100 %, pero 8 de los 8 ratones mostraron signos clínicos que alcanzaron una puntuación máxima de 3.

Estos resultados muestran que el anticuerpo humano anti-H3N2 CR8020, identificado y desarrollado como se divulga en este documento (CR8020) puede proporcionar protección heterosubtípica contra una dosis letal de gripe H7N7 *in vivo*. Cuando se administra un día antes de la infección a una dosis de 3 mg/kg o mayor, el mAb CR8020 podía prevenir completamente la manifestación clínica de infección de H7N7 en ratones. A una dosis de 1 mg/kg de CR8020 administrado un día antes de la infección, todos los ratones sobrevivieron a la exposición letal, y la pérdida de peso corporal y los signos clínicos observados se resolvieron completamente al final del periodo de estudio de 21 días.

Se realizó un segundo estudio para evaluar y comparar la eficacia profiláctica de mAb CR8020, CR8041 y CR8043 en el modelo de ratón de H7N7. Se ensayaron los mAb CR8020, CR8041 y CR8043 (producidos en células PER.C6®) para la eficacia profiláctica en el modelo de ratón de exposición letal con virus de la gripe A/Pollo/Países Bajos/621557/2003 (H7N7) adaptado a ratón (Central Veterinary Institute (CVI), Lelystad, Países Bajos). En resumen, todos los ratones (Balb/c, hembra, edad de 6-8 semanas, $n = 8$ por grupo) se aclimataron y mantuvieron durante un periodo de al menos 4 días antes del inicio del experimento. El mAb CR8020 se dosificó a 10, 3 o 1 mg/kg por vía intravenosa en la vena de la cola (*vena coccygeus*) en el día -1 antes de la exposición, suponiendo un peso promedio de 18 g por ratón y un volumen de dosis fijo de 0,2 ml. Los mAb CR8041 y CR8043 se dosificaron de la misma manera a 30, 10, 3 o 1 mg/kg. Se llevó conjuntamente un grupo de control al que se le dosificó 30 mg/kg de mAb de control negativo CR3014. Después de la administración del mAb, los ratones se expusieron en el día 0 con 25 DL₅₀ de virus A/CH/NL/621557/03 (H7N7) adaptado a ratón por inoculación intranasal. Se determinaron los signos clínicos y los pesos corporales diariamente desde el día -1 antes de la exposición hasta el final del estudio en el día 21.

En la figura 15 se representan las tasas de supervivencia, el % de cambio de peso corporal y las puntuaciones clínicas de los ratones, después de administración profiláctica de los mAb. Como se muestra en la figura 15A, se observó un 100 % de supervivencia en los grupos que recibieron 3 o 10 mg/kg de CR8020, 10 o 30 mg/kg de CR8041 y en el grupo que recibió 30 mg/kg de CR8043. En el grupo de mAb de control la tasa de supervivencia fue de un 0 %. La administración profiláctica de CR8020 a los tres niveles de dosis, y CR8041 a los cuatro niveles de dosis proporcionó una mejora estadísticamente significativa de tiempo de supervivencia, en comparación con el grupo de mAb de control (orden logarítmico, $p < 0,002$). La administración profiláctica de 1 mg/kg de CR8043 no produjo una mejora estadísticamente significativa del tiempo de supervivencia, en comparación con el grupo de mAb de control (orden logarítmico, $p = 0,692$). Aumentar la dosis de CR8043 hasta 3 mg/kg o más, produjo una mejora estadísticamente significativa de tiempo de supervivencia, en comparación con el grupo de mAb de control (orden logarítmico, $p \leq 0,034$).

En un análisis *a posteriori*, se compararon los tiempos de supervivencia de los grupos de dosis más baja de los mAb CR8020, CR8041 y CR8043. La administración profiláctica de 1 mg/kg de CR8020 produjo una mejora

estadísticamente significativa del tiempo de supervivencia, en comparación con 1 mg/kg de CR8041 y 1 mg/kg de CR8043 (orden logarítmico, respectivamente $p = 0,029$ y $p < 0,001$). Además, la administración profiláctica de 1 mg/kg de CR8041 produjo una mejora estadísticamente significativa del tiempo de supervivencia cuando se comparaba con 1 mg/kg de CR8043 (orden logarítmico, $p = 0,004$).

En la figura 15B se muestra el cambio del peso corporal medio de los ratones durante el periodo de estudio de 21 días después de administración profiláctica de los mAb. En los grupos de 1 mg/kg de mAb CR8020 y mAb CR8041 se observó una grave pérdida de peso comparable con la del grupo de mAb de control. En los grupos de dosis mayor de mAb CR8020 y CR8041, la pérdida de peso durante el periodo de estudio de 21 días fue limitada o inexistente. En los grupos a los que se les dosificó mAb CR8043 se observó una grave pérdida de peso en todos los grupos, recuperándose el peso corporal medio del grupo al que se le dosificó 30 mg/kg casi hasta el nivel inicial en el día 21. Los cambios de peso corporal se analizaron en más detalle con análisis de área bajo la curva (ABC) (tabla 21). Hay una clara relación inversa entre la pérdida de peso y la dosis de anticuerpo usada. Cuando se aumentaba la concentración de anticuerpo, disminuía la pérdida de peso. Con 1 mg/kg de CR8020 no hubo reducción estadísticamente significativa en la pérdida de peso en comparación con el grupo de control ($p = 0,356$). Aumentar la dosificación hasta 3 o 10 mg/kg provocó una reducción estadísticamente significativa en la pérdida de peso, en comparación con el grupo de control ($p < 0,001$ en ambos casos). Con 1 mg/kg de CR8041 no hubo reducción estadísticamente significativa en la pérdida de peso en comparación con el grupo de control ($p = 1$).

Aumentar la dosificación hasta 3, 10 o 30 mg/kg de CR8041 provocó una reducción estadísticamente significativa en la pérdida de peso, en comparación con el grupo de control ($p < 0,001$ en los 3 casos). Con 1, 3 o 10 mg/kg de CR8043 no hubo reducción estadísticamente significativa en la pérdida de peso en comparación con el grupo de control ($p = 0,997$, $0,510$ y $0,992$ respectivamente). Aumentar la dosificación hasta 30 mg/kg provocó una reducción estadísticamente significativa en la pérdida de peso, en comparación con el grupo de control ($p \leq 0,001$). En un análisis adicional de la media de ABC de los datos de cambio de peso corporal, los mAb CR8020, CR8041 y CR8043 se compararon usando un análisis de una variable de la varianza con el anticuerpo y las dosis incluidos en el modelo como factores fijos. Como no se incluyó una dosis de 30 mg/kg de CR8020 en el estudio, la comparación se limitó a las dosis de anticuerpo de 1, 3 y 10 mg/kg. Las diferencias entre los anticuerpos se estimaron usando medias marginales con ajuste de Sidak para comparaciones múltiples. Sobre las tres dosis de anticuerpo consideradas, el tratamiento con CR8020 produjo una reducción de forma estadísticamente significativa mejorada de la pérdida de peso en comparación con CR8041 y CR8043 (diferencia media en las medias marginales de 23,73 y 68,29 g*día, respectivamente $p = 0,013$ y $p < 0,001$). Además, el tratamiento con CR8041 produjo una reducción de forma estadísticamente significativa mejorada de la pérdida de peso en comparación con CR8043 (diferencia en las medias marginales de 44,56 g*día, $p < 0,001$).

La medianas de puntuación clínica de los ratones se representan en la figura 15C. Todos los ratones, excepto uno en el día 0 (grupo de 3 mg/kg de CR8020) mostraron signos clínicos (puntuación = 1, pelaje áspero) desde el día 0 - día 3. Este aumento no se observó en el periodo de aclimatación ni en el día -1. La causa de este puntuación clínica aumentada no está perfectamente clara. De los grupos tratados con 3 o 10 mg/kg de mAb CR8020 en el día -1 antes de la exposición, la mediana de puntuación clínica volvió a 0 en el día 9 después de la exposición, mientras que en el grupo de control, la mediana de puntuación clínica alcanzó 4 en el día 8, con todos los ratones muertos o sacrificados en el día 9. El grupo de 1 mg/kg de CR8020 mostró una mediana de puntuación clínica de 3 desde el día 4-13, volviendo a la puntuación 0 en el día 15. De los grupos tratados con 3, 10 o 30 mg/kg de mAb CR8041 en el día -1 antes de la exposición, la mediana de puntuación clínica volvió a 0 en el día 9, 10 o 12 después de la exposición, respectivamente. El grupo de 1 mg/kg de CR8041 alcanzó una mediana de puntuación clínica de 4 en el día 10 después de la exposición. De los grupos tratados con 1, 3 o 10 mg/kg de CR8043, la mediana de puntuación clínica alcanzó 4 en el día 9, 9 o 12, respectivamente, mientras que la mediana de puntuación clínica del grupo de 30 mg/kg de CR8043 alcanzó 3 desde el día 6-13 y volvió a 0 en el día 14.

Los resultados anteriores muestran claramente que los anticuerpos humanos anti-H3N2 CR8020, CR8041 y CR8043 pueden proporcionar protección heterosubtípica contra una dosis letal de gripe H7N7 *in vivo*. Se descubrió que el mAb CR8020 era el más potente de los tres mAb contra el virus de la gripe A/CH/NL/621557/03 (H7N7) adaptado a ratón, basándose en el resultado de los análisis *a posteriori* de los tiempos de supervivencia y cambio de peso corporal. A una dosis de 3 o 10 mg/kg de mAb CR8020 administrada un día antes de la infección, sobrevivió un 100 % de los ratones a la exposición letal y la manifestación clínica de la infección de H7N7 se redujo fuertemente. A una dosis de 1 mg/kg de CR8020 administrada un día antes de la infección, sobrevivió un 75 % de los ratones a la exposición letal en este experimento, y los signos clínicos de los ratones supervivientes se resolvieron completamente en el día 15 del periodo de estudio de 21 días.

Ejemplo 17

Actividad terapéutica de anticuerpos monoclonales IgG humanos contra exposición letal a H7N7 *in vivo*

Este estudio se realizó para evaluar la eficacia y ventana terapéutica del mAb CR8020 en el modelo de H7N7. Se ensayó el mAb CR8020 (producido en células PER.C6®) para la eficacia terapéutica en el modelo de ratón de exposición letal con virus de la gripe A/Pollo/Países Bajos/621557/2003 (H7N7) adaptado a ratón (Central Veterinary

Institute (CVI), Lelystad, Países Bajos). En resumen, todos los ratones (Balb/c, hembra, edad de 6-8 semanas, $n = 8$ por grupo) se aclimataron y mantuvieron durante un periodo de al menos 4 días antes del inicio del experimento. El mAb CR8020 se dosificó a 15 mg/kg por vía intravenosa en la vena de la cola (*vena coccygeus*) en el día -1 antes de la exposición (grupo 1; control positivo de profilaxis) o en el día 1, 2, 3, 4, 5 o 6 después de la exposición (grupos 2-7), suponiendo un peso promedio de 18 g por ratón y un volumen de dosis fijo de 0,2 ml. El grupo 8 recibió mAb CR3014 (15 mg/kg) de control negativo en el día 1 después de la exposición. Los ratones se expusieron en el día 0 con 25 DL₅₀ de virus A/CH/NL/621557/03 (H7N7) adaptado a ratón por inoculación intranasal. Se determinaron los signos clínicos y los pesos corporales diariamente desde el día -1 antes de la exposición hasta el final del estudio en el día 21.

La figura 16A muestra las tasas de supervivencia de los ratones, después de administración intravenosa de mAb CR8020 (15 mg/kg en todos los grupos) o mAb de control (15 mg/kg). Cuando se administraban 15 mg/kg de mAb CR8020 en el día 1 antes de la exposición o los días 1 o 3 después de la exposición, todos los animales sobrevivían a la exposición vírica, mientras que en el grupo de mAb de control la tasa de supervivencia era de un 0 %. Cuando se administraban 15 mg/kg de mAb CR8020 en los días 2 y 4, respectivamente se observó una supervivencia de un 87,5 % y 50 %. El tiempo de supervivencia de estos grupos de forma estadísticamente significativa diferente del del grupo de mAb de control ($p = 0,002$ y $p = 0,014$, respectivamente). Los grupos tratados con 15 mg/kg de CR8020 en el día 5 y 6 experimentaron una tasa de supervivencia de un 0 % y no hubo diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de supervivencia de estos grupos en comparación con el grupos de mAb de control ($p = 0,837$ y $p = 0,876$, respectivamente).

En la figura 16B, se muestra el cambio de peso corporal medio con respecto al día 0 de los ratones durante el periodo de estudio de 21 días. En general, la pérdida media de peso corporal aumenta cuando se administra mAb CR8020 en puntos temporales posteriores después de la exposición. Sin embargo, las curvas de peso corporal medio de los grupos de tratamiento de mAb CR8020 del día 2 y 3 se cruzan en el día 10, debido a la único ratón no superviviente en el grupo de tratamiento del día 2. El análisis del área bajo la curva de los cambios del peso corporal muestra una abrupta transición en la pérdida media de peso entre los tratamientos en los días -1 a 3 en comparación con el tratamiento en los días 4 a 6 (tabla 22). El tratamiento con 15 mg/kg de CR8020 en el día -1 antes de la exposición o el día 1, 2 o 3 después de la exposición provocó una reducción estadísticamente significativa en la pérdida de peso en comparación con el grupo de control ($p < 0,001$ para los 4 grupos). El tratamiento con 15 mg/kg de CR8020 en los días 4, 5 o 6 no provocó una reducción estadísticamente significativa en la pérdida de peso en comparación con el grupo de control ($p = 0,566$, $p = 0,979$ y $p = 0,858$, respectivamente).

La medianas de puntuación clínica de los ratones se representan en la figura 16C. De los animales tratados con 15 mg/kg de CR8020 en el día -1 antes de la exposición, todos sobrevivieron y ninguno de los animales mostró ningún signo clínico durante el periodo de observación. Los animales tratados en el día 1 después de la exposición mostraron una supervivencia de un 100 %, sin embargo, 7 de los 8 animales mostraron signos clínicos, alcanzando una puntuación clínica máxima de 1. El 8.^o animal alcanzó una puntuación clínica máxima de 3. De los animales tratados en el día 2 después de la exposición, todos los animales sobrevivieron salvo uno. Los animales supervivientes (7 de 8) mostraron signos clínicos que alcanzaron una puntuación clínica máxima de 1 ($n = 4$) o 3 ($n = 3$). Los animales tratados en el día 3 después de la exposición mostraron una supervivencia de un 100 % y todos los animales mostraron signos clínicos con una puntuación clínica máxima de 3. De los animales tratados en el día 4 después de la exposición, un 50 % sobrevivió a la exposición letal. Los animales supervivientes mostraron signos clínicos que alcanzaron una puntuación clínica máxima de 3. Los animales tratados en el día 5 o 6 después de la exposición no sobrevivieron. Las puntuaciones clínicas se analizaron usando el procedimiento GENMOD (SAS) para ajustar un modelo para medidas repetidas con ratones como sujeto y datos medidos en una escala ordinal (tabla 23). De los grupos tratados con 15 mg/kg de mAb CR8020 en el día -1 antes de la exposición y el día 1, 2, 3 o 4 después de la exposición, la mediana de puntuación clínica fue de forma estadísticamente significativa diferente del grupo de mAb de control durante la mayor parte del periodo de estudio de 21 días (día 8-21; $p \leq 0,038$ para los 4 grupos). Del grupo tratado con 15 mg/kg de mAb CR8020 en el día 5 después de la exposición, la mediana de puntuación clínica fue significativamente diferente del grupo de mAb de control en el día 8 solamente ($p \leq 0,001$). Esta diferencia, aunque estadísticamente diferente, no se considera relevante. La mediana de puntuación clínica del grupo de tratamiento del día 6 con 15 mg/kg de mAb CR8020 no fue estadísticamente diferente del grupo de control.

Este estudio muestra claramente que el tratamiento con 15 mg/kg de mAb CR8020 proporciona un 87,5-100 % de protección cuando se administra hasta el día 3 después de la exposición en un modelo de ratón de H7N7 letal. Cuando se administra en el día 4 después de la exposición, el tratamiento con 15 mg/kg de mAb CR8020 proporciona protección parcial. Cuando se administraba en el día 5 o día 6 después de la exposición, no se observaba efecto protector de 15 mg/kg de mAb CR8020 en el modelo de ratón de H7N7 letal. En otras palabras, cuando se administraba 4 días o más antes de la muerte, CR8020 proporcionaba protección en este modelo letal de ratón.

Ejemplo 18

Cóctel de anticuerpos monoclonales que neutraliza de forma eficaz múltiples subtipos de gripe de los grupos filogenéticos 1 y 2.

La vacuna contra la gripe estacional cada año consiste en dos preparaciones diferentes que inducen inmunidad contra las cepas de gripe A, una representante del subtipo H1 circulante y una representante de la cepa H3 circulante. La razón subyacente para esto es que las cepas de la gripe del subtipo H1 y H3 son tan diferentes que las vacunas preparadas de cada tipo no inducen protección contra el otro subtipo. De forma ideal, una preparación de anticuerpo monoclonal ampliamente protector para tratar la gripe sería eficaz contra las cepas de gripe tanto del grupo filogenético 1 (H1) como del grupo 2 (H3). Sin embargo, de nuevo debido a las diferencias de secuencia entre las moléculas de HA, dicho anticuerpo único es difícil de encontrar. Por ejemplo, el anticuerpo Fab28 descrito en el documento WO 2009/115972 se une a y neutraliza los subtipos H1 mucho mejor que los virus de subtipo H3 probablemente debido a la menor conservación del epítipo entre los virus del grupo 1 y el grupo 2 en comparación con virus dentro de un grupo filogenético. Para alcanzar el objetivo de un solo producto eficaz contra múltiples subtipos de gripe de ambos grupos filogenéticos, por tanto, puede tenerse que combinar dos o más anticuerpos diferentes en un cóctel. Para que sea exitosa, dicha preparación debe consistir en anticuerpos que interfieran entre sí.

Los anticuerpos que neutralizan de forma eficaz los virus de los subtipos H1, H5 y H9 se han descrito en el documento WO2008/028946, con los anticuerpos CR6261 y CR6323 como ejemplos típicos. La región de unión (epítipo) de CR6261 se ha dilucidado en detalle usando cocristalización de las moléculas de HA H1 o H5 y CR6261 (véanse también las entradas en la base de datos PDB 3GBM y 3GBM en <http://www.pdb.org> y Ekiert *et al.*, 2009). Para investigar si los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden usarse en combinación con los anticuerpos CR6261 descritos previamente, se ensayó si los anticuerpos podían unirse a subtipos de ambos grupos filogenéticos 1 y 2. Para esto, se hicieron experimentos de unión ELISA y FACS como se describe en el ejemplo 7 usando moléculas de HA de los subtipos H1 y H5, así como los subtipos H3 y H7 con CR6261, CR6323, CR8001, CR8020, CR8041 y CR8043. Los resultados se resumen en la tabla 20 y muestran que los anticuerpos que neutralizan ampliamente los virus del grupo 1 no se unen a virus del grupo 2 y viceversa. Como los anticuerpos no interfieren entre sí, puede esperarse que la potencia neutralizante de los anticuerpos contra los subtipos respectivos se mantenga provocando una neutralización resultante de los subtipos de ambos grupos 1 y 2.

Por lo tanto, un cóctel que comprende CR6261 y/o CR6323 por un lado y CR8020, CR8041 y/o CR8043 por el otro, sería activo contra virus de al menos ambos subtipos H1 y H3. Por tanto, es posible una protección eficaz contra los subtipos de gripe de los grupos filogenéticos 1 y 2 usando una preparación.

Ejemplo 19.

Cinética de unión de las moléculas de unión.

Se midieron las afinidades de fragmentos Fab escindidos con papaína de CR8020 y CR8043 usando el sistema Octet RED y biosensores de estreptavidina de ForteBio. Se biotinilaron antígenos de hemaglutinina de gripe de los subtipos H3 A/Wisconsin/67/2005 (Protein Science) y A/Brisbane/10/2007 (Protein Science) para su inmovilización en biosensores de estreptavidina (ForteBio). Los experimentos de unión de Fab se repitieron 5 veces usando un intervalo de concentración entre 2,3-150 nM y 0,16-30 nM para CR8020 y CR8043, respectivamente, en tampón cinético (ForteBio, 18.5032). La configuración experimental para las mediciones de afinidad del Octet fue como sigue: Inmovilización de la hemaglutinina biotinilada en biosensores de estreptavidina durante 1800 segundos, seguida de asociación de los Fab CR8020 y CR8043 diluidos en serie durante 1200 segundos y posterior disociación en tampón cinético durante 1800 segundos. Los datos de unión se analizaron con el programa informático Octet Analysis usando el modelo 1:1.

La constante de afinidad (valor de K_d) de las moléculas de unión para HA del subtipo H3 se muestra en la tabla 24.

ES 2 934 102 T3

Tabla 1: Amplificaciones de Vkappa, Vlambda y VH de la primera ronda

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos del cebador	SEQ ID NO:
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 (HuCIgM)	TGG AAG AGG CAC GTT CTT TTC TTT	221
* Mezcla en relación 1:1:1		
# Mezcla en relación 1:1		
X Mezcla en relación 1:1		
+ Mezcla en relación 1:1		

Tabla 2: Amplificaciones de Vkappa, Vlambda y VH de la segunda ronda

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos del cebador	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

ES 2 934 102 T3

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos del cebador	SEQ ID NO
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
OJK1 (HuJK1-NOT)	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT TTC CAC CTT 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

ES 2 934 102 T3

Nombre del cebador	Secuencia de nucleótidos del cebador	SEQ ID NO
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
* Mezcla en relación 1:1:1		
# Mezcla en relación 1:1		
+ Mezcla en relación 1:1		

Tabla 3. Resumen de amplificación de las regiones VL de la segunda ronda

Molde	Cebador 5'	Cebador 3'	Producto	Proporción en PK/PL (%)	Combinación	Proporción en 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

ES 2 934 102 T3

Molde	Cebador 5'	Cebador 3'	Producto	Proporción en PK/PL (%)	Combinación	Proporción en VL (%)
	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 %

Tabla 4. Resumen de amplificación de las regiones VH de la segunda ronda

Molde	Cebador 5'	Cebador 3'	Producto	Proporción en PK/PL (%)	Combinación	Proporción en 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

Molde	Cebador 5'	Cebador 3'	Producto	Proporción en PK/PL (%)	Combinación	Proporción en VH (%)
	OH7S	OJH2	H7J2	10		
	OH7S	OJH3	H7J3	60		
	OH7S	OJH4	H7J4	20		
					VH	100 %

Tabla 5: Características de las colecciones individuales de linfocitos B de memoria de IgM.

Colecciones de memoria de IgM						
Donador	Células		Colecciones			
	PBL totales (x 10 ⁶)	% de linfocitos B de memoria	Tamaño (x 10 ⁶)	% de frecuencia de inserto	% de ORF	% de únicas
Individuo 1			3	96	74	98
Individuo 2	72,5	1,7	5	98	79	98
Individuo 3	67,5	1,4	3	96	79	98
Individuo 4	132,5	2,3	6	98	69	99

- 5 **Tabla 6:** Actividad de unión cruzada de anticuerpos fágicos monocatenarios con moléculas de HA de diferentes subtipos de HA, medida por ELISA (valor cuantitativo de ELISA; DO 492 nm). X = no determinado; H3 = HA de subtipo H3; H7 = HA de subtipo H7; HB = HA de virus de la gripe B.

SC n.º	H3	H7	HB 10
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
sc08-016	1,112	0,164	x
sc08-017	1,158	0,285	x
sc08-018	0,711	0,221	x

- 10 **Tabla 7:** Actividad de unión cruzada de anticuerpos fágicos precipitados con PEG/NaCl y esterilizados en filtro a moléculas de HA de diferentes subtipos de HA, medida por ELISA (DO 492 nm). H1 = HA de subtipo H1, H3 = HA de subtipo H3; H5 = HA de subtipo H5; H7 = HA de subtipo H7; B(O) = HA de virus de la gripe B/Ohio/01/2005.

SC n.º	H1	H3	H5	H7	B(o)
sc08-001	+	+	-	+	-
sc08-003	-	+	-	-	-
sc08-006	-	+	-	-	-
sc08-007	-	-	-	+	-
sc08-009	-	-	-	+	-

SC n.º	H1	H3	H5	H7	B(o)
sc08-010	-	-	-	+	-
sc08-011	-	-	-	+	-
sc08-013	-	-	-	+	-
sc08-014	+	+	-	+	-
sc08-015	-	+	-	-	-
sc08-016	-	+	-	-	-
sc08-017	-	+	-	-	-
sc08-018	-	+	-	-	-

Tabla 8: Análisis FACS de anticuerpos fágicos precipitados con PEG/NaCl y esterilizados en filtro (expresados como IFM = intensidad de fluorescencia media). PER.C6 = células PER.C6 sin transfectar (control); mH1, mH3, mH5, mH7, mHB = HA unida a membrana de los subtipos H1, H3, H5, H7 y subtipos de gripe B respectivamente.

5

SC n.º	PER.C6	mH1	mH3	mH5	mH7	mHB
sc08-001	2	27	68	5	62	x
sc08-003	5	9	77	7	7	x
sc08-006	2	6	69	5	6	x
sc08-007	1	5	4	4	73	x
sc08-009	11	12	11	10	15	x
sc08-010	2	4	3	4	60	x
sc08-011	1	3	4	4	73	x
sc08-013	2	5	3	7	61	x
sc08-014	10	26	82	17	32	x
sc08-015	3	7	79	7	6	x
sc08-016	1	7	82	5	5	x
sc08-017	1	6	81	5	5	x
sc08-018	2	6	74	6	7	x

Tabla 9: Datos de las regiones CDR de las inmunoglobulinas específicas de HA (SEQ ID NO).

IgG n.º	Locus Vh	HCDR1	HCDR2	HCDR3	Locus Vi	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CR8001	3-53	SNYVS (81)	LIYTGTTY ADS VKG (82)	VSALRELQ WPNYAMDV (83)	1-4	SGTRSDV GGHNYVS (84)	EVSHRPS (85)	SSYTGEGLGV (86)
CR8003	3-7	SYWMS (87)	NMKQDGSEKY VDSVKG (88)	GSCDDSWT GCHDAFDI (89)	2-14	GGNNIGS KSVH (90)	DSARPS (91)	QVWESGSDLR LL (92)
CR8015	3-7	SYWMS (87)	NMKQDGSEKY VDSVKG (88)	GSCDDSWT GCHDAFDI (89)	2-14	GGDNIGR KSVH (93)	DNSDRPS (94)	HWGSSRDHY V (95)
CR8016	3-7	SYWMS (87)	NMKQDGSEKY VDSVKG (88)	GSCDDSWT GCHDAFDI (89)	1-13	TGSSSNIG AGYDVH (96)	GNN (97)RPS	QSYDSSLVYV (98)
CR8017	3-7	SYWMS (87)	NMKQDGSEKY VDSVKG (88)	GSCDDSWT GCHDAFDI (89)	2-13	QGDSLRS YYAS (99)	AKTNRPS (100)	NSRDSSGNHV V (101)
CR8018	3-7	SYWMS (87)	NMKQDGSEKY VDSVKG (88)	GSCDDSWT GCHDAFDI (89)	1-4	TGTSSDV GGYNYVS (102)	EVSHRPS (85)	SSYTGEGLGV (86)
CR8019	3-23	TSAMS (103)	GISGSGATTYYA GSVKG (104)	DTSLFEYDT SGFTAPGNA FDI (105)	012	RASQSI GYLN (106)	GASTLQS (107)	QQTYSPPYA (108)
CR8020	1-18	RFVVS (109)	WISAYNGDTYYA QKFAQ (110)	EPPLFYSSW SLDN (111)	A27	ARASQSV SMNYLA (112)	GASRRAT (113)	QYGTSPRT (114)
CR8021	3-23	AYAMN (115)	AIGSGSGSTYYA DSVKG (116)	GRDWTGGY FFDS (117)	B3	KSSQSIFY SSNNKNY (118)	WASTRES (119) LT	QYYSIPYT (120)
CR8038	3-23	GYAMS (121)	DIGSGGGTYYA DSVKG (122)	SSSWDRAY FFDS (123)	B3	KSSQSVLY SSIHKNYL (124)	WASTRES (119) A	QYYSRPPT (125)
CR8039	4-59	SYWVS (126)	YIYRGGTSYNP SLKS (127)	KDWGSAAG SVWYFDL (128)	1-2	TGTSSDV GGYNYVS (129)	EVSKRPS (130)	SSYAGSNLI (131)
CR8040	3-33	SYGMH (132)	FIWYDGSNKHYA DSMKG (133)	DGGYSTWE WYFDL (134)	A26	RASQGIG SNLH (135)	YASQSIT (136)	HQSSSLPT (137)
CR8041	1-18	SFGLS (138)	WISAYNGEIKYA QKFAQ (139)	EPPLYFSSW SLDF (140)	A27	ARASQSV SSNYLA (141)	GASRRAT (142)	QYDSSPRT (143)

IgG n.º	Locus Vh	HCDR1	HCDR2	HCDR3	Locus VI	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CR8043	1-03	AYSMH (144)	WINTAIGNTQYS QKFQD (145)	GASWDARG WSGY (146)	B3	KSSQSVF SSSTNKN YLA (147)	WSSTRES (148)	HQYYTAPWT (149)
CR8049	2-26	NTRMGV S (150)	HIFSNDTQSYRT SLKR (151)	IGSGYESSA YSTWLDP (152)	2-14	EGDTIGSK SVH (153)	NDRDRPS (154)	QWVESGGDQT V (155)
CR8050	4-34	DHYWS (156)	EVVHSGDTNYTP SLRN (157)	GRNVAWVG AIQRHYDY (158)	A27	RASQSVS RNYLA (159)	GASSRAT (160)	QHYGSVLVA (161)
CR8052	4-61	SGTYYW S (162)	DISYSGSTNYNP SLKS (163)	AMAAANYD RGGYNDYY YMDV (164)	012	RASQGIN TYLN (165)	AASTLQS (166)	QQSYSTAIT (167)
CR8055	3-33	TYGMH (168)	FIWYDGSNKH QDSVKG (169)	DGGYSTWE WYFDL (170)	A26	RASRSIGS DLH (171)	FASQSMS (172)	HQSSSLPLT (137)
CR8057	3-53	VIFMS (173)	IYIDDSITYYADS VKG (174)	ESGDFGDQ TGPYHYAM DV (175)	2-14	TGSSGDI GGYNAV'S (176)	EVTSRPS (177)	CSFADSNILI (178)
CR8069	3-43	DYTMH (179)	LISWDGGMSNY ADSVKG (180)	DIRPRMPAR HFMDV (181)	L2	RASQNVN YNLA (182)	VASTRAT (183)	QQYNNWPPA IT (184)

Tabla 10. Datos de las IgG específicas de HA. SEQ ID NO de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera

Nombre de IgG	SEQ ID NO de secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada	SEQ ID NO de secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada	SEQ ID NO de secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera	SEQ ID NO de secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera
CR8001	1	2	3	4
CR8003	5	6	7	8
CR8015	9	10	11	12
CR8016	13	14	15	16
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

Tabla 11: Neutralización *in vitro* del virus de la gripe H3N2 mediante IgG seleccionadas

Valor cuantitativo de neutralización SK50 (µg/ml)	
IgG n.º	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

Valor cuantitativo de neutralización SK50 (µg/ml)	
IgG n.º	A/Wisconsin/67/2005
CR8052	> 40
CR8055	1,07
CR8057	0,011
CR8069	ND

Tabla 12: Reactividad de unión cruzada de IgG anti-H3N2. NCal. = A/Nueva Caledonia/20/1999 (H1N1); Wisc. = A/Wisconsin/67/2005 (H3N2); NY. = A/Nueva York/55/2004 (H3N2); Wyo. = A/Wyoming/3/2003 (H3N2); Neth. = A/Países Bajos/219/2003 (H7N7); ND = no determinado.

5

IgG n.º	Unión en ELISA de IgG (valoración)					Unión FACS, [IgG] = 5 µg/ml, IFM			
	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	-	+	+	+	baja	7	8	943	15
CR8069	-	+	+	+	-	4	6	447	5

Tabla 13: Actividad de neutralización cruzada de IgG anti-H3N2; ND = no determinado

Valor cuantitativo de neutralización SK50 (µg/ml)										
IgG n.º	H1			H3					H7	H10
	A/Nueva Caledonia /20/1999	A/Brisbane/59/1007	A/Isias Salomón/IVR-145	A/Wisconsin/67/2005	A/Hiroshima/52/2005	A/Panamá/2000/1999	A/Johannesburgo/33/1994	A/Hong Kong/1/1968	A/Ánade real /Países Bajos/12/2000	A/Pollo/Alemania /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

Tabla 14: Conservación de secuencia alrededor de la región de unión de los mAb contra H3 CR8020, CR8041 y CR8043

	posición HA2																			N	Años	Cepas ensayadas								
	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	
Consenso	W	E	G	M	V	D	G	W	Y	G	F	R	H	Q	N	S	E	G	T	G	Q	A	A	D	L	K	655	1972-2008	Pa	
Grupo_1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	380	2004-2008	Hs-Wi
Grupo_2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	127	1999-2004	
Grupo_3	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	91	2007-2009	
Grupo_4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	69	1968-1997	HK
Grupo_5	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10	2007	
Grupo_6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	6	1999-2004	
Grupo_7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	2002-2007	
Grupo_8	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	3	2004	
Grupo_9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	1999	
Grupo_10	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	F	.	.	2	2009	
Grupo_11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	2003-2004	
Grupo_12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	2006	
Grupo_13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	F	.	.	.	1	2007	
Grupo_14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	1	2007	
Grupo_15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	X	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	1	2007	
Grupo_16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	1	2008	
Grupo_17	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	2003	
Grupo_18	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	2001	
Grupo_19	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1999	
Grupo_20	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1975	
Grupo_21	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	1	2008	
Grupo_22	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	2002	
Grupo_23	K	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	2002	

Tabla 15: Valores cuantitativos de neutralización sobre diversas cepas de gripe A

IgGn.º	H1	H3							H7	H10	
	3 cepas H1N1 (1999-2007)	A/Wisconsin/67/2005	A/Hiroshima/52/2005	A/Panamá/2000/1999	A/Johannesburgo/33/1994	A/Hong Kong/1/1968	A/HK/1/68-N20	A/HK/1/68-M20c	A/Anade real/Paises Bajos/12/2000	A/Pollo/NL/621557/03-ma	A/Pollo/Alemania/4/49
CR8001	>40	11,9	13,0	>40	6,5	7,1	5,26	td	>40	39,8	>40
CR8020	>40	3,5	3,5	5,0	2,0	1,8	1,8	1,8	2,5	27,6	6,6
CR8041	>40	3,3	3,5	5,0	1,6	1,7	1,8	1,7	38,0	258,0	37,2
CR8043	>40	1,6	1,8	4,2	1,2	0,8	1,8	1,2	>40	>40	6,6
CR8057	>40	0,005	0,003	0,01	>40	>40	>40	>40	>40	-	>250

Todos los valores cuantitativos SK50 en ug/ml; cepas adaptadas de ratón; cepa H7 "pandémica" Ma

Tabla 16. Área media bajo la curva de cambio de peso corporal desde la medida inicial en el día 0.

Estudio	Grupo	ABC media (g*día)	DT (g*día)	Valor de p^a (mAb frente a control)	Valor de p^b
1	30 mg/kg de control	-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 frente a 3 mg/kg)
	10 mg/kg CR8020	31,44	9,09	<0,001	0,454 (3 frente a 10 mg/kg)
	30 mg/kg CR8020	25,62	12,94	<0,001	ns
2	30 mg/kg de control	-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 frente a 3 mg/kg)
	10 mg/kg CR8041	35,23	11,06	<0,001	0,061 (3 frente a 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 frente a 3 mg/kg)

Estudio	Grupo	ABC media (g*día)	DT (g*día)	Valor de p^a (mAb frente a control)	Valor de p^b
	10 mg/kg de CR8043	31,57	7,90	<0,001	<0,001 (3 frente a 10 mg/kg)
	30 mg/kg de CR8043	27,72	6,61	<0,001	0,997 (10 frente a 30 mg/kg)

^aLos valores medios de ABC de los grupos de dosis de mAb se compararon con los grupos de Ab de control usando análisis de la varianza con ajuste de Dunnet para comparaciones múltiples.

^bLos valores medios de ABC por concentración de anticuerpo se compararon para cada anticuerpo usando análisis de la varianza con ajuste de Tukey para comparaciones múltiples.

ns = no estadísticamente significativo

Tabla 17. Área media bajo la curva de cambio de peso corporal desde la medida inicial en el día 0.

Grupo	ABC media (g*día)	DT (g*día)	Valor de p^a
15 mg/kg de CR8020 en el día -1	33,44	10,06	<0,001
15 mg/kg de CR8020 en el día 1	10,70	16,23	<0,001
15 mg/kg de CR8020 en el día 2	-15,23	11,60	<0,001
15 mg/kg de CR8020 en el día 3	-65,45	35,90	0,003
15 mg/kg de CR8020 en el día 4	-85,95	23,14	0,742
15 mg/kg de CR8020 en el día 5	-100,88	12,78	0,986
15 mg/kg de CR8020 en el día 6	-84,91	12,28	0,653
mAb de control en el día 1	-95,76	11,55	

^aLos valores medios de ABC de los grupos a los que se les dosificó 15 mg/kg de mAb CR8020 se compararon con el grupo de mAb control usando análisis de la varianza con ajuste de Dunnet para comparaciones múltiples en el análisis *a posteriori*. El tratamiento profiláctico con 15 mg/kg de mAb CR8020 provocó una reducción estadísticamente significativa en la pérdida de peso en comparación con el grupo de control ($p < 0,001$). El tratamiento terapéutico en el día 1, día 2 o día 3 con 15 mg/kg de mAb CR8020 también provocó una reducción estadísticamente significativa en la pérdida de peso en comparación con el grupo de control ($p < 0,001$, $p < 0,001$ y $p = 0,003$, respectivamente). El tratamiento en el día 4, día 5 o día 6 con 15 mg/kg de mAb CR8020 no provocó una reducción estadísticamente significativa en la pérdida de peso en comparación con el grupo de control ($p > 0,05$ para los tres grupos).

Tabla 18 Mediana de puntuaciones clínicas.

Se enumera el intervalo con diferencia significativa entre las puntuaciones clínicas en comparación con el grupo de mAb de control (por ejemplo, entre 15 mg/kg en el día -1 y el grupo de control, la diferencia en las puntuaciones clínicas es significativa desde el día 4 en adelante).		
	Con respecto al control	
Grupo	Intervalo (día(s))	p
15 mg/kg de CR8020 en el día -1	4-21	$\leq 0,001$
15 mg/kg de CR8020 en el día 1	2-21	$\leq 0,001$
15 mg/kg de CR8020 en el día 2	3, 5-21	$\leq 0,001$
15 mg/kg de CR8020 en el día 3	3, 5-21	$\leq 0,012$
15 mg/kg de CR8020 en el día 4	3, 5-21	$\leq 0,034$
15 mg/kg de CR8020 en el día 5	3	$\leq 0,001$
15 mg/kg de CR8020 en el día 6	3	$\leq 0,001$

Tabla 19. Área media bajo la curva de cambio de peso corporal desde la medida inicial en el día 0.

Grupo	ABC media (g*día)	DT (g*día)	Valor de p^a (mAb CR8020 frente a control)
30 mg/kg de control	-93,06	10,88	
1 mg/kg de CR8020	-45,61	15,05	<0,001
3 mg/kg de CR8020	-13,31	9,51	<0,001
10 mg/kg de CR8020	-6,35	12,40	<0,001
30 mg/kg de CR8020	-12,59	7,35	<0,001

^aLos valores medios de ABC de los grupos a los que se les dosificó mAb CR8020 se compararon con el grupo de mAb de control usando análisis de la varianza con ajuste de Dunnet para comparaciones múltiples en el análisis *a posteriori*.

Tabla 20: Sumario de propiedades de unión y neutralización de anticuerpos monoclonales específicos para HA del virus de la gripe.

	H1	H3		
	Unión	VNA	Unión	VNA
CR6261	+	+	-	-
CR6323	+	+	-	-
CR8001	+	-	+	+
CR8020	-	-	+	+
CR8041	-	-	+	+
CR8043	-	-	+	+

Tabla 21. Área media bajo la curva de cambio de peso corporal desde la medida inicial en el día 0.

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

^aLos valores medios de ABC de los grupos a los que se les dosificó mAb CR8020 se compararon con el grupo de mAb de control usando análisis de la varianza con ajuste de Dunnet para comparaciones múltiples en el análisis *a posteriori*.

Tabla 22. Área media bajo la curva de cambio de peso corporal desde la medida inicial en el día 0.

Grupo	ABC (g*día)	media	DT (g*día)	Valor de p (mAb frente a control) ^a
15 mg/kg de CR8020 en el día -1	-7,68		8,17	< 0,001
15 mg/kg de CR8020 en el día 1	-20,43		8,41	< 0,001
15 mg/kg de CR8020 en el día 2	-38,18		37,35	< 0,001
15 mg/kg de CR8020 en el día 3	-28,27		9,63	< 0,001
15 mg/kg de CR8020 en el día 4	-99,11		37,90	0,566
15 mg/kg de CR8020 en el día 5	-93,62		10,29	0,979
15 mg/kg de CR8020 en el día 6	-94,06		7,65	0,858
Anticuerpo de control en el día 1	-93,33		10,58	

^aLos valores medios de ABC se compararon usando el procedimiento RobustReg (SAS) que asigna menos peso a los valores atípicos.

Tabla 23. Mediana de puntuaciones clínicas.

Grupo	Con respecto al control	
	Intervalo (día(s))	p
15 mg/kg de CR8020 en el día -1	4-21	≤0,001
15 mg/kg de CR8020 en el día 1	2, 5-21	≤ 0,012
15 mg/kg de CR8020 en el día 2	6-21	≤ 0,038
15 mg/kg de CR8020 en el día 3	7-21	≤ 0,035
15 mg/kg de CR8020 en el día 4	5,6, 8-21	≤ 0,016
15 mg/kg de CR8020 en el día 5	8	<0,001
15 mg/kg de CR8020 en el día 6	-	≥ 0,449

Tabla 24. Cinética de unión

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

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y ligera:

>ADN VH SC08-001 (SEQ ID NO: 1)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCCTGATCCAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTG
GATTCACCGTCAGTAGCAACTACGTGAGCTGGGTCCGCCAGGCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTCTCACTTAT
TTACACGGGTGGTACCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACCTCAAGAAT
ACGGTGTTCCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACGCGGCCATGTATTACTGTGCGAGAGTGTACGATTAC
GGTTTTTGCAGTGGCCAACTACGCGATGGACGTC

>Proteína VH SC08-001 (SEQ ID NO: 2)

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYVSWVRQAPGKGLEWLSLIYTGTTYADSVKGRFTISRDN
TVFLQMNSLRAEDAAMYYCARVSALRFLQWPNYAMDV

>ADN VL SC08-001 (SEQ ID NO: 3)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACGGTCGATCACCATCTCCTGCTCTGGAACCC
GCAGTGACGTTGGTGGTCATAATTATGTCTCCTGGTACCAACAACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATTTA
TGAGGTCAGTCATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAGCACGGCCTCCCTGACC
ATCTCTGGCCTCCAGTCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCTTATACAGGTGAAGGCCCCCTAGGAGTG

>Proteína VL SC08-001 (SEQ ID NO: 4)

QSALTQPASVSGSPGRSITISCSGTRSDVGGHNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSHRPSGVSNRFGSGKSGSTASLT
ISGLQSEDEADYYCSSYTGEGLGV

>ADN VH SC08-003 (SEQ ID NO: 5)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGACCGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTACGCCTCTG
AATTCAGCTTCAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACAT
GAAGCAAGATGGAAGTGAGAAGTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACTCATTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGTTCTCTGTG
ACGATTCTTGACTGGTTGTCATGATGCTTTTGACATC

>Proteína VH SC08-003 (SEQ ID NO: 6)

EVQLVETGGDLVQPGGSLRLSCSASEFSFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANMKQDGSEKYYVDSVKGRFTISR
NSLYLQMNSLRGEDITAVYYCARGSCDDSWTGCHDAFDI

>ADN VL SC08-003 (SEQ ID NO: 7)

GTGTTGACGCAGCCGCCCTCGGTGTGAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTGCCTGTGGGGGAAACAACATTG
GGAGTAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCTGCTATGATGATAGCGCCCCG
GCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAATTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAG
GCCGGGATGAAGCCGACTATTACTGTGAGGTGTGGGAGAGTGGTAGTGATCTACGACTGCTT

>Proteína VL SC08-003 (SEQ ID NO: 8)

VLTQPPSVSVAPGQTARIACGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLYVYDSSARPSGIPERFSGSNSGNTATLTISR
VAGDEADYYCQVWESGSDLRL

>ADN VH SC08-015 (SEQ ID NO: 9)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTACGCCTCTG
AATTCAGCTTCAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACAT
GAAGCAAGATGGAAGTGAGAAGTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACTCATTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGTTCTCTGTG
ACGATTCTTGACTGGTTGTCATGATGCTTTTGACATC

>Proteína VH SC08-015 (SEQ ID NO: 10)

QVQLQESGGDLVQPGGSLRLSCSASEFSFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANMKQDGSEKYYVDSVKGRFTISR
NSLYLQMNSLRGEDITAVYYCARGSCDDSWTGCHDAFDI

>ADN VL SC08-015 (SEQ ID NO: 11)

GTGTTGACGCAGCCGCCCTCGGTGTGAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAAGATTACCTGTGGGGGAGACAACATTG
GAAGAAAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCCTGGGCCCTGTGCTGGTCTGCTCAATGATAATAGCGACCG
GCCCTCAGGGATCCCTGCGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAA
GCCGGGATGAGGCCGACTATTACTGTACGTGTGGGTAGTAGTCGTGACCATTATGTC

ES 2 934 102 T3

>Proteína VL SC08-015 (SEQ ID NO: 12)

VLTPPPSVSVAPGQTAKITCGGDNIGRKSVHWYQQKPLAPVLVNDNSDRPSGIPARFSGSNSGNTATLTISRVE
AGDEADYYCHVWGSSRDHYV

5 >ADN VH SC08-016 (SEQ ID NO: 13)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTCAGCCTCTG
AATTCAGCTTCAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACAT
GAAGCAAGATGGAAGTGAGAAGTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACTCATTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGTTCCTGTG
ACGATTCTTGGACTGGTTGTCATGATGCTTTTGACATC

10 >Proteína VH SC08-016 (SEQ ID NO: 14)

EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCSASEFSFSSYWMSWVRQAPGKLEWVANMKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNK
NSLYLQMNSLRGEDITAVYYCARGSCDDSWTGCHDAFDI

>ADN VL SC08-016 (SEQ ID NO: 15)

CAGTCTGTCTGACGACGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCACCATCTCCTGCACTGGGAGCA
GCTCCACATCGGGGCAGGTTATGATGTACACTGGTACCAGCAGCTTCAGGAACAGCCCCAACTCCTCATCTA
TGGAACAACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGATCCAGGTCTGGCCCTTTAGCCCTCCTGGCC
15 ATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCTATGACAGCAGCCTGAGTGTATTATGTC

>Proteína VL SC08-016 (SEQ ID NO: 16)

QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNNRPSGVPDFRSGSRSGPLALLA
ITGLQAEDEADYYCQSYDSSLVYV

20 >ADN VH SC08-017 (SEQ ID NO: 17)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTCAGCCTCTG
AATTCAGCTTCAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACAT
GAAGCAAGATGGAAGTGAGAAGTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACTCATTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGTTCCTGTG
ACGATTCTTGGACTGGTTGTCATGATGCTTTTGACATC

25 >Proteína VH SC08-017 (SEQ ID NO: 18)

EVQLVETGGDLVQPGGSLRLSCSASEFSFSSYWMSWVRQAPGKLEWVANMKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNK
NSLYLQMNSLRGEDITAVYYCARGSCDDSWTGCHDAFDI

>ADN VL SC08-017 (SEQ ID NO: 19)

30 TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACA
GCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTCTATCTATGCTAAAC
CAACCGGCCCTCAGGGATCCAGACCGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACTGCTTCCTTGACCATCACTGGG
GCTCAGGCGGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCCCGGGACAGCAGTGGTAACCATGTGGTA

>Proteína VL SC08-017 (SEQ ID NO: 20)

35 SSELTDPAVSVAGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYAKTNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITG
AQAEDEADYYCNSRDSSGNHV

>ADN VH SC08-018 (SEQ ID NO: 21)

40 GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGACTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTCAGCCTCTG
AATTCAGCTTCAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACAT
GAAGCAAGATGGAAGTGAGAAGTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACTCATTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGTTCCTGTG
ACGATTCTTGGACTGGTTGTCATGATGCTTTTGATATC

>Proteína VH SC08-018 (SEQ ID NO: 22)

EVQLVETGGDLVQPGGSLRLSCSASEFSFSSYWMSWVRQAPGKLEWVANMKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNK
NSLYLQMNSLRGEDITAVYYCARGSCDDSWTGCHDAFDI

>ADN VL SC08-018 (SEQ ID NO: 23)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCA
GCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAACTCATGATTTA
TGAGGTGAGTCATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAGCACGGCCTCCCTGACC
ATCTCTGGCCTCCAGTCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCTTATACAGGTGAAGGCCCCCTAGGAGTG

5 >Proteína VL SC08-018 (SEQ ID NO: 24)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSHRPSGVSNRFSGSKSGSTASLT
ISGLQSEDEADYYCSSYTGEPLGV

>ADN VH SC08-019 (SEQ ID NO: 25)

10 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGGAGCCTCTG
GAATCAGCGTTAGCACTTCTGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGTTCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTAT
TAGTGGTAGTGGTGTACACATACTACGCAGGCTCCGTGAAGGGTCGATTACCATCTCCAGAGACAAATCCAAG
AACACACTGCATCTGCAAATGAGCAGACTGAGAGCCGAGGACACGGCCATTTACTACTGTGCGAAAGATACCTCCT
TGTTTGAGTATGATACAAGTGGTTTTACGGCTCCCGCAATGCTTTTGATATC

>Proteína VH SC08-019 (SEQ ID NO: 26)

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGASGISVSTSAMSWVRQVPGKLEWVSGISGSGATYYAGSVKGRFTISRDKSK
NTLHLQMSRLRAEDTAIYYCAKDTSLFEYDTSGFTAPGNAFDI

>ADN VL SC08-019 (SEQ ID NO: 27)

20 GACATCCAGWTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGATGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAA
GTGAGAGCATTAGCGGCTATTTAAATTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAGCCCCTAACCTCCTGATCTATGGTGC
ATCCACTTTGCAGAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACC
AGTCTGCAACCTGAAGACTATGCAACTTACTACTGTCAACAGACTTACACCTCCCCTCCGTACGCT

>Proteína VL SC08-019 (SEQ ID NO: 28)

25 DIQXTQSPSSLSASVDDRVTITCRASQSIGYLNWYQQKPGKAPNLLIYGASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIT
SLQPEDYATYYCQQTYTSPPYA

>ADN VH SC08-020 (SEQ ID NO: 29)

30 CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGAGCTGAGGTGAAGACCCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCTG
GATACACCTTTACCAGGTTTGGTGTGAGCTGGATACGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATTGGATGGAT
CAGCGCTTACAATGTGACACATACTATGCACAGAAGTTCAGGCCAGAGTCACCATGACCACAGACATCCACG
ACCACAGCCTACATGGAGATGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAACCCCCC
TTTTTTACAGCAGCTGGTCTCTTGACAAC

>Proteína VH SC08-020 (SEQ ID NO: 30)

35 QVQLQQSGAEVKTPGASVKVSKASGYTFTRFGVSWIRQAPGQGLEWIGWISAYNGDTYYAQKFQARVMTTDTST
TTAYMEMRSLRSDTAVYYCAREPPLFYSSWSLDN

>ADN VL SC08-020 (SEQ ID NO: 31)

35 GAAATTGTGWTGACRCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCA
GTCAGAGTGTTAGCATGAACACTTAGCCTGGTTCCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGG
TGCGTCCCGCAGGGCCACTGGCATCCCCGACAGGATCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATC
AGCAGACTGGAGCCTGCAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGTCAGCAGTATGGTACCTCACCTCGGACG

>Proteína VL SC08-020 (SEQ ID NO: 32)

40 EIVXTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSMNYLAWFQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRISGSGSGTDFTLTI
SRLEPADFAVYYCQQYGTSPRT

>ADN VH SC08-021 (SEQ ID NO: 33)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGATACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTG
GATTCACCTTTAGCGCCTATGCCATGAACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTAT
TGGTGGTAGTGGCGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACTCCAAG

AAGATCCTGTATCTGCAAATGAACGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCATATATTACTGTGCGAAAGGCCGGGATT
GGACTGGGGTTACTTCTTTGACTCC

>Proteína VH SC08-021 (SEQ ID NO: 34)

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSAYAMNWVRQAPGKGLEWVSAIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKILYLQMNLRAEDTAIYYCAKGRDWTGGYFFDS

>ADN VL SC08-021 (SEQ ID NO: 35)

GACATCCAGWTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCA
GCCAGAGTATTTTCTACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAA
GCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGAGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGACAGAT
TTCACCTCTACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATACTATAGTATTCCCT
ACACT

>Proteína VL SC08-021 (SEQ ID NO: 36)

DIQXTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFYSSNNKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTISSLQAEDVAVYYCQYYISIPYT

>ADN VH SC08-038 (SEQ ID NO: 37)

GAGGTGCAGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTG
GATTCGCCTTTAGCGGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGATAT
TGGTGGTAGTGGTGGTGGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGCAGTAGCT
GGGACCGGGCCTACTTCTTTGACTCC

>Proteína VH SC08-038 (SEQ ID NO: 38)

VQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFASFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSDIGGSGGGTYYADSVKGRFTISRDN
AKNLTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSSSWDRAYFFDS

>ADN VL SC08-038 (SEQ ID NO: 39)

GATATTGTGATGACCCAGACTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCA
GCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCATCCATAAGAACTACTTAGCCTGGTACCAGCAAAAACCAGGACAGCCTCCTAA
GCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGACAGAT
TTCACCTCTACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGATCTCCTC
CAACT

>Proteína VL SC08-038 (SEQ ID NO: 40)

DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSIHKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTISSLQAEDVAVYYCQYYRSPPT

>ADN VH SC08-039 (SEQ ID NO: 41)

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACGTGCACTGTCTCTG
GCGGCTCCATCGGTAGTTACTACTGGAGCTGGATACGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGATATAT
CTATTACCGTGGGGGTACCAATTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTCGACACGTCCAAGAGC
CAGTTCACCTTGAAGCTGAACCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAAGGACTGGGGAT
CAGCGGCCGGAAGTGTCTGGTACTTCGATCTC

>Proteína VH SC08-039 (SEQ ID NO: 42)

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIGSYYSWIRQPPGKLEWIGYIYYRGGSTYNPSLKSRTISVDTSKS
QFTLKLNSVTAADTAVYYCARKDWGSAAGSVWYFDL

>ADN VL SC08-039 (SEQ ID NO: 43)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACTGGAACCA
GCAGTGACGTTGGTGGTTATAATTATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATTCCG
TGAGGTGAGTAAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGTTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACC
GTCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGAATACTACTGCAGCTCGTATGCAGGCAGCAACAATCTGATA

>Proteína VL SC08-039 (SEQ ID NO: 44)

QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIREVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLT
VSGLQAEDEAEYYCSSLNLI

>ADN VH SC08-040 (SEQ ID NO: 45)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTG
GATTCGCTTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGACCTTTAT
ATGGTATGATGGAAGTAATAAACTATGCAGACTCCATGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGATGGGGGAT
ATAGCACCTGGGAATGGTACTTCGATCTC

>Proteína VH SC08-040 (SEQ ID NO: 46)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVTFIWDGSKNHYADSMKGRFTISRDNK
NTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARDGGYSTWEWYFDL

>ADN VL SC08-040 (SEQ ID NO: 47)

GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCGGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAGAGTCACCATCACCTGCCGGGCCA
GTCAGGGCATTGGCAGTAACCTTACACTGGTACCAGCAGAAACCAGATCAGTCTCCAAAGTCCTCATCAAGTATGC
TTCCAGTCCATCACAGGGGTCCCTCGAGGTTAGTGGCAGGGGATCTGGGACAGATTTACCCCTCACCATCAAT
AGCCTGGAAGTTGAAGATGCTGCAGTGTATTACTGTCATCAGAGTAGTAGTTTACCGCTCACT

>Proteína VL SC08-040 (SEQ ID NO: 48)

EIVLTQSPDFQSVTPKERVITTCRASQIGISNLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSITGVPSRFSGRSGTDFTLTIN
SLEVEDAAVYYCHQSSSLPLT

>ADN VH SC08-041 (SEQ ID NO: 49)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCCAGGCTTCGG
GTTACACCTTTACCTCCTTTGGTCTCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCCTGAGTGGATGGATGGAT
CAGCGCTTACAATGGTGAAATAAAGTATGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCTCCATGACCACAGACACATCAACG
AGGACAGCCTACATGGAGGTGCGGAGCCTCAGACCTGACGACACGGCCGTATACTACTGTGCGAGAGAGCCCCC
TGTATTTAGTAGCTGGTCTCTCGACTTC

>Proteína VH SC08-041 (SEQ ID NO: 50)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYTFTSFGLSWVRQAPGQGPPEWMGWISAYNGEIKYAQKFQGRVSMTTDTST
RTAYMEVRSRLRPDDTAVYYCAREPPLYFSSWSLDF

>ADN VL SC08-041 (SEQ ID NO: 51)

GAAATTGTGTTGACGCACTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCA
GTCAGAGTGTAGCAGCACTACTTAGCCTGGTTCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGG
TGCATCAAGGAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATC
AGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGATAGCTCACCTCGGACG

>Proteína VL SC08-041 (SEQ ID NO: 52)

EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWFQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI
SRLEPEDFAVYYCQYDSSPRT

>ADN VH SC08-043 (SEQ ID NO: 53)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGCTTTCCTGCAAGGCTTCTG
GATACACCTTCACTGCCTATTTATGCAATTGGGTGCGCCAGGCCCGGACAAAGCCTTGAGTGGTTGGGATGGAT
CAACACTGCCATCGGTAACACACAATATTCACAGAAGTTCAGGACAGAGTCACCATACCAGGGACACATCTGCG
CGCACATCGTACATGGAACCTGAGCAGCCTGAGATCTGGAGACACGGCTGTCTATTTCTGTGCGAGAGGGGCTCTT
GGGACGCCCGTGGGTGGTCTGGCTAC

>Proteína VH SC08-043 (SEQ ID NO: 54)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTAYSMHWVRQAPGQSLEWLGWINTAIGNTQYSQKFQDRVITITRDTSA
RTSYMELSSLRSGDTAVYFCARGASWDARGWSGY

>ADN VL SC08-043 (SEQ ID NO: 55)

GACATCCAGWTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCA
GCCAGAGTGTTTTTCCAGCTCCACCAATAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAA
GGTGCTAATTTACTGGTCATCTACCCGGGAATCCGGGTCCCTGACCGATTCACTGCCAGCGGGTCTGGGACAGAT
TTCACCTCTACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGCAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCACCAATATTATACTGCTCCGT
GGACG

>Proteína VL SC08-043 (SEQ ID NO: 56)

DIQXTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFSSSTNKNYLAWYQQKPGQPPKVLIIYWSSTRESGVPDRFSASGSGTD
FTLTISSLQAADVAVYYCHQYYTAPWT

>ADN VH SC08-049 (SEQ ID NO: 57)

CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTACTGGTGAAGCCCAAAGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCGTCTCTG
GGTTCTCACTCAGCAACACTAGAATGGGTGTGAGTTGGATCCGTGAGCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGC
GCACATCTTTTCGAACGACGAAACATCCTACAGGACATCTCTGAAGAGGAGGCTCACCATCTCCAGGACATCTCC
AAAAGTCAGGTGGTCCTTTCTATGACCAACGTGGACCCTGCAGACACAGCCACATATTTTTGTGCACGGATCGGGT
CTGGCTATGAGAGTAGTGCTTACTCCACCTGGCTCGACCCC

>Proteína VH SC08-049 (SEQ ID NO: 58)

QVTLKESGPVLVKPKETLTLCTVSGFSLNTRMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSNDETSYRTSLKRRLTISQDIS
KSQVVLMTNVDPADTATYFCARIGSGYESSAYSTWLDP

>ADN VL SC08-049 (SEQ ID NO: 59)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTGAGTGGCCCCAGGGCAGACGGCCAGGCTCACCTGTGAGGGAGACA
CAATTGGCAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAGGCCAGGCCAGGCCCCCTGTGTTGGTTCGTCTATAATGATCG
CGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGCGCACGGCCACCCTGACCATCAGCAGG
GTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTTCTGTGAGTGTGGGAGAGTGGAGGTGATCAGACTGTC

>Proteína VL SC08-049 (SEQ ID NO: 60)

QSVLTQPPSVSVAPGQTARLTCEGDTIGSKSVHWYQQRPQAPVLVYVNDRDRPSGIPERFSGSNSGRATLTISR
VEAGDEADYFCQVWESGGDQTV

>ADN VH SC08-050 (SEQ ID NO: 61)

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTATTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTGTATG
GTGGGTGCTTCACTGATCACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGTCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGTGAAGT
CGTTCATAGTGGAGACACCAACTACACCCGTCCTCAGAAATCGAGTTTCCATATCGGTGCACTCGTCCAAGAAT
CAGTTCTCCCTGAGGCTGGGTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGAGGCAGGAATGTTG
CGGTAGTTGGTGTATTACAGAGGCACTATGACTAC

>Proteína VH SC08-050 (SEQ ID NO: 62)

QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFTHDHYWSWIRQSPGKGLEWIGEVVHSGDTNYTPSLNRVSIQVDSK
QFSLRLGVTAAADTAVYYCARGRNVAVVGAIQRYDY

>ADN VL SC08-050 (SEQ ID NO: 63)

GAAATTGTGATGACGCACTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCA
GTCAGAGTGTTAGCAGAACTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCTGGCTCCCAGGCTCCTCATCTCTGG
TGCATCGAGCAGGGCCACTGGCGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGGGGGTCTGACACAGACTTCACTCTCACCATC
AGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCCGTGTATTACTGTGAGCACTATGGTTCGGTCTTGTAGCT

>Proteína VL SC08-050 (SEQ ID NO: 64)

EIVMTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSRNYLAWYQQKPLAPRLISGASSRATGVPDRFSGRSDTDFTLTI
SRLEPEDFAVYYCQHYGSLVA

>ADN VH SC08-052 (SEQ ID NO: 65)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTG
GTGGCTCCGTCAGCAGTGGTACTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGG
GGATATCTCTTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATTCTAGAGACACGTCC
AAGAACCTGGTCTCCCTGAAGCTGACCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGCATTACTGTGCGAGAGCGATGG
CGGCTTATAATTATGACAGGGGTGGTTATAACGACTACTACTACATGGACGTC

>Proteína VH SC08-052 (SEQ ID NO: 66)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGTYYSWIRQPPGKGLEWIGDISYSGSTNYPNPSLKSRVTISRDT
KNLVS LKLT SVTAADTAVHYCARAMAAYNYDRGGYNDYYMDV

>ADN VL SC08-052 (SEQ ID NO: 67)

GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGCGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAA
GTCAGGGCATTAAACACCTATTTAAATTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAGGCCCTAAGGTCCTGATCTTTGCTGC
ATCCACTTTGCAAAGTGGAGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGTTCTGGGACAGAATTCATCTCAACATCAAC
AATCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACTGCGATCACT

>Proteína VL SC08-052 (SEQ ID NO: 68)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGINTYLNWYQQKPGKAPKVLIFAASLTQSGVPSRFSGSGSGTEFTLNIN
NLQPEDFATYYCQSYSTAIT

>ADN VH SC08-055 (SEQ ID NO: 69)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCGGCGTCTG
GATTCAGCTTCACCACCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCTTTAT
TTGGTATGATGGAAGTAACAACTATCAAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAGGACAATTC AAC
AACATGTTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGTCGCCGACACGGCTGTTTATTACTGTGTGAGAGATGGGGAT
ATAGCACCTGGGAATGGTACTTCGATCTC

>Proteína VH SC08-055 (SEQ ID NO: 70)

EVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFSFTTYGMHWVRQAPGKLEWVAFIWDGNSNKHYQDSVKGRFTISKDNSN
NMLYLQMDSLRVADTAVYYCVRDGGYSTWEWYFDL

>ADN VL SC08-055 (SEQ ID NO: 71)

GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGGCTCCAAAGGAGAAAGTCACCATCACCTGCCGGGCCA
GTCGGAGCATTGGTAGTGACTTGCACTGGTTTCAGCAGAGGCCAGATCAGTCTCAAAGCTCCTCATCAAGTTTGC
TTCCAGTCCATGTCAGGGGTCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGAGAGATTTACCCTCACCATCAGT
AGCCTGGAGGCTGAAGATGCTGCTACGTATTACTGTATCAGAGTAGTAGTTACCGCTCACT

>Proteína VL SC08-055 (SEQ ID NO: 72)

EIVLTQSPDFQSVAPKEKVTITCRASRSIGSDLHWFQRPDQSPKLLIKFASQSMGVPSPRFSGSGSGRDFTLTIS
SLEAEDAATYYCHQSSSLPLT

>ADN VH SC08-057 (SEQ ID NO: 73)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTCCAACCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTG
GGTTCACCGACAGTGTATCTTCATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGTGTCTCAATTAT
TTATATCGATGATTCCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGACACAATTCATGGGC
ACAGTGTCTTCTTGAATGAACAGCCTGAGACCTGACGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGACAGAGAGCGGAGACT
TTGGTGACCAAACGGGTCCCTATCATTACTACGCTATGGACGTC

>Proteína VH SC08-057 (SEQ ID NO: 74)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTDSVIFMSWVRQAPGKLECVSIIYIDDSITYYADSVKGRFTISRHN
SMGTVFLEMNSLRPDDTAVYYCATESGDFGDTGPYHYAMDV

>ADN VL SC08-057 (SEQ ID NO: 75)

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAAGCA
GCGGTGACATTGGTGGTTATAACGCTGTCTCCTGGTACCAACACACCCAGGCAAAGCCCCAACTGATGATTTA
TGAGGTCACTAGTCGGCCCTCAGGGGTTTCCGATCGCTTCTCTGCGTCCAGGTCTGGCGACACGGCCCTCCCTGACT
GTCTCTGGTCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTCACTATTACTGCTGCTCATTTCAGACAGCAACATTTTGATT

>Proteína VL SC08-057 (SEQ ID NO: 76)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSGDIGGYNAVSWYQHHPGKAPKLMIEVTSRPSGVSDRFSASRSGDTASLT
VSGLQAEDEAHYYCCSFADSNILI

5 >ADN VH SC08-069 (SEQ ID NO: 77)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGTCGTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTG
GCTTCACGTTTGAGGATTATACCATGCACTGGGTCCGTCAAGTCCGGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTGCGCTCAT
TAGTTGGGATGGCGGTATGTCAAATATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACAGCAAA
AACTCTCTGTATCTGCAAGTGAGCAGTCTGAGAAGTGAAGACACCGCCCTGTATTACTGTGCAAAAGATATACGAC
CCCGTATGCCAGCTCGTCACTTTATGGACGTC

>Proteína VH SC08-069 (SEQ ID NO: 78)

10 EVQLVETGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTTFEDYTMHWVRQVPGKLEWVALISWDGGMNYSVSKGRFTISRDNK
NSLYLQVSSLRSEDALYYCAKDIRPRMPARHFMDV

>ADN VL SC08-069 (SEQ ID NO: 79)

15 GAAATTGTGTTGACGAGTCTCCAGCCACCTGTCTGTGTCTCCGGGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCA
GTCAGAAATGTCAACTACAACCTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGTTGC
ATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGC
AGTCTGCAGTCTGAAGATTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCGGCGATCACT

>Proteína VL SC08-069 (SEQ ID NO: 80)

20 EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQNVNINLAWYQQKPGQAPRLLIYVASTRATGIPDRFSGSGSGTEFTLTIS
SLQSEDAFVYYCQQYNWPPAIT

>ADN HC CR6261 (SEQ ID NO: 185)

gaggtgcagc	tggtggagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	ggtgaaagtc	60
tcttgcgaag	cttctggagg	ccccttcgcg	agctatgcta	tcagctgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcctgagtg	gatgggaggg	atcatcccta	tttttggtac	aacaaaatac	180
gcaccgaagt	tccagggcag	agtcacgatt	accgcggacg	atttcgcggg	cacagtttac	240
atggagctga	gcagcctgcg	atctgaggac	acggccatgt	actactgtgc	gaaacatatg	300
gggtaccagg	tgcgcgaaac	tatggacgtc	tggggcaaag	ggaccacggt	caccgtctcg	360
agtgcctagc	ccaagggccc	cagcgtgttc	cccctggccc	ccagcagcaa	gagcaccagc	420
ggcgggcacag	ccgcccctggg	ctgcctggtg	aaggactact	tccccgagcc	cgtgaccgtg	480
agctggaaca	gcggcgccctt	gaccagcggc	gtgcacacct	tccccgccgt	gctgcagagc	540
agcggcctgt	acagcctgag	cagcgtggtg	accgtgccca	gcagcagcct	gggcacccag	600
acctacatct	gcaacgtgaa	ccacaagccc	agcaacacca	aggtggacaa	acgcgtggag	660
cccaagagct	gcgacaagac	ccacacctgc	ccccctgccc	ctgcccccca	gctgctgggc	720
ggaccctccg	tgttccctgtt	cccccccaag	cccaaggaca	ccctcatgat	cagccgggac	780
cccaggtga	cctgcgtggt	ggtggacgtg	agccaagagg	accccaggt	gaagttcaac	840
tggtagctgg	acggcgtgga	ggtgcacaac	gccaagacca	agccccggga	ggagcagtac	900
aacagcacct	accgggtggt	gagcgtgctc	accgtgctgc	accaggactg	gctgaacggc	960
aaggagtaca	agtgcgaagt	gagcaacaag	gcctgcctg	cccccatcga	gaagaccatc	1020
agcaaggcca	agggccagcc	ccgggagccc	caggtgtaca	ccctgcccc	cagccgggag	1080
gagatgacca	agaaccaggt	gtccctcacc	tgtctggtga	agggcttcta	ccccagcgac	1140
atcgccgtgg	agtgggagag	caacggccag	ccgagaaca	actacaagac	cacccccct	1200
gtgctggaca	gcgacggcag	cttcttcctg	taacgaagc	tcaccgtgga	caagagccgg	1260
tggcagcagg	gcaacgtgtt	cagctgcagc	gtgatgcacg	aggccctgca	caaccactac	1320
accagaaga	gcctgagcct	gagccccggc	aag			1353

25 >Proteína HC CR6261 (SEQ ID NO: 186)

EVQLVESGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGPFRRSYAISWVR
QAPGQGPPEWMGGIIPIFGTTKYAPKFQGRVTITADDFAG
GTVYMELESSLRSEDTAMYCYCAKHMGYQVRETM DVWGKG
TTVTVSSASTKGPSVFPFLAPSSSKSTSGGTAAALGCLVKD
YFPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLS SVV
TVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKV D K R V E P K S C D K T H
TCP 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
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQD 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
AKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IANVEWESNGQPENNNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDK
SRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>ADN LC CR6261 (SEQ ID NO: 187)

cagtctgtgt	tgacgcagcc	gccctcagtg	tctgcggccc	caggacagaa	ggtcaccatc	60
tcctgctctg	gaagcagctc	caacattggg	aatgattatg	tatcctggta	ccagcagctc	120
ccaggaacag	ccccaaaact	cctcatttat	gacaataata	agcgaccctc	agggattcct	180
gaccgattct	ctggctccaa	gtctggcacg	tcagccaccc	tgggcatcac	cggactccag	240
actggggacg	aggccaacta	ttactgcgca	acatgggatc	gccgcccagc	tgcttatgtt	300
gtcttcggcg	gagggaccaa	gctgaccgtc	ctaggtgcgg	ccgcaggcca	gccaagggcc	360
gctcccagcg	tgaccctgtt	ccccccctcc	tccgaggagc	tgcaggccaa	caaggccacc	420
ctgggtgtgc	tcatacagca	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

5

>Proteína LC CR6261 (SEQ ID NO: 188)

QSVLTQPPSVSAAPGQKV T I S C S G S S S N I G N D Y V S W Y Q
QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGI P D R F S G S K S G T S A T L G I
TGLQTGDEANYCYCATWD R R P T A Y V V F G G G T K L T V L G A A
AGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA
VTVAWKA 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
PEQWKSHRSYS C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S

10

Vector plg-C911-HCgamma1 (SEQ ID NO:190)

tcgacggatc	gggagatctc	ccgatccccc	atggtgcact	ctcagtagaa	tctgctctga	60
tgccgcatag	ttaaagccagt	atctgctccc	tgcttggtgtg	ttggagggtcg	ctgagtagtg	120
cgcgagcaaa	atttaagcta	caacaaggca	aggcttgacc	gacaattgca	tgaagaatct	180
gcttaggggt	aggcgttttg	cgctgcttcg	ctaggtggtc	aatattggcc	attagccata	240
ttattcattg	gttatatagc	ataaatcaat	attggctatt	ggccattgca	tacgttgat	300
ccatatcata	atatgtacat	ttatatggc	tcatgtccaa	cattaccgcc	atgttgacat	360
tgattattga	ctagttatta	atagtaatca	attacgggg	cattagttca	tagcccatat	420
atggagtcc	gcgttacata	acttacggta	aatggccgc	ctggctgacc	gccaacgac	480
ccccgccc	tgacgtcaat	aatgacgtat	gttcccatag	taacgccaat	agggactttc	540
cattgacgtc	aatgggtgga	gtattttacg	taaaactgcc	acttggcagt	acatcaagt	600
tatcatatgc	caagtacgcc	ccctattgac	gtcaatgacg	gtaaatggc	cgcctggcat	660
tatgccagc	acatgacctt	atgggacttt	cctacttggc	agtagatcta	cgtattagtc	720
atcgctatta	ccatggtgat	gcggttttgg	cagtacatca	atgggcgtgg	atagcggttt	780
gactcacggg	gatttccaag	tctccacccc	attgacgtca	atgggagttt	gttttggcac	840
caaaatcaac	gggactttcc	aaaatgtcgt	aacaactccg	ccccattgac	gcaaatgggc	900
ggttaggcgtg	tacggtggga	ggtctatata	agcagagctc	gttttagtgaa	ccgtcagatc	960
gcctggagac	gccatccacg	ctgttttgac	ctccatagaa	gacaccggga	ccgatccagc	1020
ctccgcggcc	gggaacgggtg	cattggaagc	tggcctggat	atcctgactc	tcttaggtag	1080
ccttgacagaa	gttggtcgtg	aggcactggg	caggtaagta	tcaagggttac	aagacagggt	1140
taaggagatc	aatagaaaact	gggcttgcg	agacagagaa	gactcttgcg	tttctgatag	1200
gcacctattg	gtcttactga	catccacttt	gcctttctct	ccacaggtgt	ccactcccag	1260
ttcaattaca	gctcgccacc	atgggatgga	gctgtatcat	cctcttcttg	gtactgctgc	1320

tggccagacc	ggccagtgac	cttgaccggt	gcaccacttt	tgatgatgtt	caagctccta	1380
attacactca	acatacttca	tctatgaggg	gggtttacta	tctgatgaa	atTTTTtagat	1440
cggacactct	ttatTTtaact	caggattttat	ttcttccatt	ttatttcta	gttacagggt	1500
ttcatactat	taatcatacg	tttggaacc	ctgtcatacc	ttttaaggat	ggtatTTtatt	1560
ttgctgccac	agagaaatca	aatgTTgtcc	gtggttgggt	ttttggttct	accatgaaca	1620
acaagtcaca	gtcggTgatt	attattaaca	attctactaa	tgttgttata	cgagcatgta	1680
actttgaatt	gtgtgacaac	cctttctttg	ctgtttctaa	acccatgggt	acacagacac	1740
atactatgat	attcgataat	gcattttaatt	gcactttcga	gtacatatct	gatgcctttt	1800
cgcttgatgt	ttcagaaaag	tcaggtaatt	ttaaacactt	acgagagttt	gtgtttaaaa	1860
ataaagatgg	gtttctctat	gtttataagg	gctatcaacc	tatagatgta	gttcgtgatc	1920
taccttctgg	ttttaacact	ttgaaaccta	tttttaagtt	gcctcttgg	attaacatta	1980
caaatTTtag	agccattctt	acagcctttt	cacctgctca	agacatttgg	ggcacgtcag	2040
ctgcagccta	ttttgttggc	tattttaagc	caactacatt	tatgctcaag	tatgatgaa	2100
atggtacaat	cacagatgct	gttgattgtt	ctcaaaatcc	acttgctgaa	ctcaaagtct	2160
ctgttaagag	ctttgagatt	gacaaaggaa	tttaccagac	ctctaatttc	agggttgttc	2220
cctcaggaga	tgTTgtgaga	ttccctaata	ttacaaactt	gtgtcctttt	ggagagggtt	2280
ttaatgctac	taaattccct	tctgtctatg	catgggagag	aaaaaaaaatt	tctaattgtg	2340
ttgctgatta	ctctgtgctc	tacaactcaa	catttttttc	aaccttttaag	tgctatggcg	2400
ttttctgccac	taagTTgaat	gatctttgct	tctccaatgt	ctatgcagat	tcttttgtag	2460
tcaagggaga	tgatgtaaga	caaatagcgc	caggacaaac	tggtgttatt	gctgattata	2520
attataaatt	gccagatgat	ttcatgggtt	gtgtccttgc	ttggaatact	aggaacattg	2580
atgctacttc	aactggtaat	tataattata	aatataggta	tcttagacat	ggcaagctta	2640
ggccctttga	gagagacata	tctaattgtc	ctttctcccc	tgatggcaaa	ccttgcaccc	2700
cacctgctct	taattgttat	tgGCCattaa	atgattatgg	tttttacacc	actactggca	2760
ttggctacca	accttacaga	gttgtagtac	tttcttttga	actttttaa	gcaccggcca	2820
cgttttTgtg	acccaaaatta	tccactgacc	ttattaagaa	ccagtgtgtc	aatTTtaatt	2880
ttaatggact	cactggtaact	ggtgtgttaa	ctccttcttc	aaagagattt	caaccatttc	2940
aacaatttgg	ccgtgatgtt	tctgatttca	ctgattccgt	tgcagatcct	aaaacatctg	3000
aaatattaga	catttccact	tgctcttttg	ggggtgtaag	tgtaattaca	cctggaacaa	3060
atgcttcatc	tgaagttgct	gttctatatc	aagatgttaa	ctgcactgat	gtttctacag	3120
caattcatgc	agatcaactc	acaccagctt	ggcgcataata	ttctactgga	aacaatgtat	3180
tccagactca	ggcaggctgt	cttataggag	ctgagcatgt	cgacacttct	tatgagtgcg	3240
acattcctat	tggagctggc	atttTgtgcta	gttaccatac	agtttcttta	ttacgtagta	3300
ctagccaaaa	atctattgtg	gcttataacta	tgtcttttagg	tgctgatagt	tcaattgctt	3360
actctaataa	caccattgct	atacctacta	acttttcaat	tagcattact	acagaagtaa	3420
tgctgttttc	tatggctaaa	acctccgtag	attgtaatat	gtacatctgc	ggagattcta	3480
ctgaatgtgc	taatttTgctt	ctccaatatg	gtagcttttg	cacacaacta	aatcgtgcac	3540
tctcagggtat	tgctgtgaa	caggatcgca	acacacgtga	agtgttccgt	caagtcaaac	3600
aaatgtacaa	aaCCCCaact	ttgaaatatt	ttggTgggtt	taatttttca	caaatattac	3660
ctgaccctct	aaagccaaact	aagaggtctt	ttattgagga	cttgctcttt	aataagggtga	3720
cactcgetga	tgctggcttc	atgaagcaat	atggcgaatg	cctagggtgat	attaatgcta	3780
gagatctcat	ttgtgcgcag	aagttcaatg	gacttacagt	gttgccacct	ctgctcactg	3840
atgatatgat	tgtgcctac	actgctgctc	tagttagtgg	tactgccact	gctggatgga	3900
catttggTgc	tggcgctgct	cttcaaatac	cttttTgctat	gcaaatggca	tataggttca	3960
atggcattgg	agttacccaa	aatgttctct	atgagaacca	aaaacaaatc	gccaaccaat	4020
ttaacaaggc	gatttagtaa	attcaagaat	cacttacaac	aacatcaact	gcattgggca	4080
agctgcaaga	cgTTgttaac	cagaatgctc	aagcattaaa	cacacttgtt	aaacaactta	4140
gctctaattt	tggtgcaatt	tcaagtgtgc	taaatgatat	cctttccgca	cttgataaag	4200
tcgaggcgga	ggtacaaatt	gacaggttaa	ttacaggcag	acttcaaagc	cttcaaacct	4260
atgtaacaca	acaactaatc	agggctgctg	aaatcagggc	ttctgtcaat	cttgctgcta	4320
ctaaaatgtc	tgagtgtgtt	cttggaacaat	caaaaagagt	tgacttttTgt	ggaaagggtg	4380
accaccttat	gtccttccca	caagcagccc	cgcattgggt	tgtcttcccta	catgtcacgt	4440
atgtgccatc	ccaggagagg	aacttcacca	cagcgcacgc	aatTTgtcat	gaaggcaaa	4500
catacttccc	tcgtgaagg	gtttttTgtgt	ttaatggcac	ttcttgggtt	attacacaga	4560
ggaacttctt	ttctccacaa	ataattacta	cagacaatac	atTTgtctca	ggaaattgtg	4620
atgtcgttat	tggcattcatt	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
agcaatatat	taaatggcct	ctcgacgaac	aaaaactcat	ctcagaagag	gatctgaatg	4920

ES 2 934 102 T3

ctgtgggcca	ggacacgcag	gaggtcatcg	tggtgccaca	ctccttgccc	tttaaggtgg	4980
tggtgatctc	agccatcctg	gccttggtgg	tgctcaccat	catctccctt	atcatcctca	5040
tcattgctttg	gcagaagaag	ccacgttagg	cggccgctcg	agtgcctagca	ccaagggccc	5100
cagcgtgttc	cccctggccc	ccagcagcaa	gagcaccagc	ggcggcacag	ccgccttggg	5160
ctgctgtggtg	aaggactact	tcccagagcc	cgtgaccgtg	agctggaaca	gcggcgccct	5220
gaccagcggc	gtgcacacct	tcccgcctgt	gctgcagagc	agcggcctgt	acagcctgag	5280
cagcgtggtg	accgtgcccc	gcagcagcct	gggcacccag	acctacatct	gcaacgtgaa	5340
ccacaagccc	agcaacacca	aggtggacaa	acgcgtggag	cccaagagct	gcgacaagac	5400
ccacacctgc	ccccctgccc	ctgcccccca	gctgctgggc	ggaccctccg	tgctcctggt	5460
cccccccaag	cccaaggaca	ccctcatgat	cagccggacc	cccgaggtga	cctgcgtggt	5520
ggtggacgtg	agccacgagg	accccgaggt	gaagttcaac	tggtacgtgg	acggcgtgga	5580
ggtgcacaac	gccaaagcca	agccccggga	ggagcagtag	aacagcacct	accgggtggt	5640
gagcgtgctc	accgtgctgc	accaggactg	gctgaacggc	aaggagtaca	agtgcgaagg	5700
gagcaacaag	gcccctgcctg	ccccatcgca	gaagaccatc	agcaaggcca	aggcgagccc	5760
ccgggagccc	caggtgtaca	ccctgcccc	cagccgggag	gagatgacca	agaaccaggt	5820
gtccctcacc	tgtctgtgga	agggtctcta	ccccagcgac	atcgccgtgg	agtgggagag	5880
caacggccag	cccagaaaca	actacaagac	cacccccctt	gtgctggaca	gcgacggcag	5940
cttcttctctg	tacagcaagc	tcaccgtgga	caagagccgg	tggcagcagg	gcaacgtggt	6000
cagctgcagc	gtgatgcacg	aggccctgca	caaccactac	accagaaga	gctgagcct	6060
gagccccggc	aagtataaat	ctagagggcc	cgttttaaacc	cgctgatcag	cctcgactgt	6120
gccttctagt	tgccagccat	ctgttggttg	cccctcccc	gtgccttcc	tgacctgga	6180
aggtgccact	cccactgtcc	tttctctaata	aaatgaggaa	attgcatcgc	attgtctgag	6240
taggtgtcat	tctattctgg	gggtggtgg	ggggcaggac	agcaaggggg	aggattggga	6300
agacaatagc	aggcatgctg	gggatgcgtg	gggtctctatg	gcttctgagg	cggaaagaa	6360
cagctggggc	tctaggggg	atccccacgc	gcccgtgtagc	ggcgcatata	gcgcggcggg	6420
tgtggtggtt	acgcgcagcg	tgaccgctac	acttgccagc	gcccctagcgc	ccgctccttt	6480
cgctttcttc	ccttctcttc	tcgccacgtt	cgccggcttt	ccccgtcaag	ctctaaatcg	6540
ggggctccct	ttagggttcc	gatttagtgc	tttacggcac	ctcgaccca	aaaaacttga	6600
ttagggtgat	gggtcacgta	gtgggccatc	gcccctgata	acgggttttc	gccctttgac	6660
gttgaggctc	acgttcttta	atagtggact	cttggtccaa	actggaacaa	cactcaaccc	6720
tattctcggtc	tattcttttg	atttataagg	gattttgccc	atttcggcct	attggttaaa	6780
aaatgagctg	atttaacaaa	aatttaacgc	gaattaattc	tgtggaatgt	gtgtcagtta	6840
gggtgtggaa	agtcgccagg	ctccccagca	ggcagaagta	tgcaaaagcat	gcactcctaa	6900
tagtcagcaa	ccagggtgtg	aaagtcccca	gggtccccc	caggcagaag	tatgcaaagc	6960
atgcattctca	attagtcagc	aaccatagtc	ccgcccctaa	ctccgcccct	cccggcccct	7020
actccgccca	gttccgccca	ttctccgcc	catggctgac	taattttttt	tatttatgca	7080
gagggccgag	ccgcctctgc	ctctgagcta	ttccagaagt	agtgaggagg	cttttttgga	7140
ggcctaggct	tttgcaaaaa	gctcccggga	gcttgatat	ccatttttcg	atctgataca	7200
gagacaggat	gaggatcggt	tcgcatgatt	gaacaagatg	gattgcacgc	aggttctccg	7260
gccgcttggt	tgagaggtct	attcggtct	gactgggcac	aacagacaat	cggtctgctc	7320
gatgccgccc	gtgtccggct	gtcagcgcag	gggcgcccgg	ttctttttgt	caagaccgac	7380
ctgtccgggt	ccctgaatga	actgcaggac	gaggcagcgc	ggctatcgtg	gctggccacg	7440
acgggcgttc	cttgccgcag	tgtgctcgac	gttgctcactg	aagcgggaag	ggactggctg	7500
ctattggggc	aagtgccggg	gcaggatctc	ctgtcatctc	accttgctcc	tgccgagaaa	7560
gtatccatca	tggtctgatg	aatgcggcgg	ctgcatacgc	ttgatccggc	tacctgccc	7620
ttcgaccacc	aagcgaacaa	tcgcatcgag	cgagcacgta	ctcggatgga	agccgggtct	7680
gtcgatcagg	atgatctgga	cgaagagcat	caggggctcg	cgccagccga	actgttcgcc	7740
aggctcaagg	cgcgcatgcc	cgacggcgag	gatctcgtcg	tgacccatgg	cgatgcctgc	7800
ttgccgaata	tcatggtgga	aaatggccgc	ttttctggat	tcactgactg	tgccgggctg	7860
ggtgtggcgg	accgctatca	ggacatagcg	ttggctaccc	gtgatattgc	tgaagagctt	7920
ggcggcgaat	gggctgaccg	cttccctcgtg	ctttacggta	tcgccgctcc	cgatttcgag	7980
cgcatcgctc	tctatcgctc	tcttgacgag	ttcttctgag	cgggactctg	gggttcgaaa	8040
tgaccgacca	agcgacgccc	aacctgccat	cacgagatct	cgattccacc	gccgccttct	8100
atgaaagggt	gggcttcgga	atcgttttcc	gggacgcggg	ctggatgato	ctccagcgcg	8160
gggatctcat	gctggagtgc	ttcgccacc	ccaacttggt	tattgcagct	tataatggtt	8220
acaaataaag	caatagcatc	acaaatttca	caaataaagc	atttttttca	ctgcatttca	8280
gttgtggttt	gtccaaaactc	atcaatgtat	cttatcatgt	ctgtataccg	tcgacctcta	8340
gctagagctt	ggcgtaatac	tggtcatagc	tggttctctg	gtgaaattgt	tatccgctca	8400
caattccaca	caacatacga	gccggaagca	taaagtgtaa	agcctggggg	gcctaattgag	8460
tgagctaact	cacattaatt	gcgttgcgct	cactgcccgc	tttccagctg	ggaacctgt	8520

ES 2 934 102 T3

cgtgccagct	gcattaatga	atcggccaaac	gcgcggggag	aggcgggttg	cgtattgggc	8580
gctcttcgc	ttcctcgctc	actgactcgc	tgcgctcggt	cgttcggctg	cggcgagcgg	8640
tatcagctca	ctcaaaggcg	gtaatacggg	tatccacaga	atcaggggat	aacgcaggaa	8700
agaacatgtg	agcaaaaggc	cagcaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	gcgttgctgg	8760
cgtttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacaa	aaatcgacgc	tcaagtcaga	8820
ggtggcgaaa	cccgacagga	ctataaagat	accaggcggt	tccccctgga	agctccctcg	8880
tgcgctctcc	tgttccgacc	ctgccgctta	ccggatacct	gtccgccttt	ctcccttcgg	8940
gaagcgtggc	gctttctcat	agctcacgct	gtaggtatct	cagttcgggtg	taggtcgttc	9000
gctccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	ccgttcagcc	cgaccgctgc	gccttatccg	9060
gtaactatcg	tcttgagtc	aaccgcgtaa	gacacgactt	atcgccactg	gcagcagcca	9120
ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggtatg	taggcgggtg	tacagagttc	ttgaagtggg	9180
ggcctaacta	cggctacact	agaagaacag	tatttgggat	ctgcgctctg	ctgaagccag	9240
ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	gctggtagcg	9300
gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	9360
tgatcttttc	tacgggggtc	gacgctcagt	ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggatttttg	9420
tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	agatcctttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	9480
aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaactt	ggtctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	9540
aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	gttcatccat	agttgcctga	ctccccgtcg	9600
tgtagataac	tacgatacgg	gagggcttac	catctggccc	cagtgcctga	atgataccgc	9660
gagaccacag	ctcaccggct	ccagatttat	cagcaataaa	ccagccagcc	ggaagggcgg	9720
agcgcagaag	tggtcctgca	actttatccg	cctccatcca	gtctattaat	tggtgcgggg	9780
aagctagagt	aagtagttcg	ccagtttaata	gtttgcgcaa	cgttgttgcc	attgctacag	9840
gcacgtgggt	gtcacgctcg	tcgttttggt	tggtctcatt	cagctccggg	tcccaacgat	9900
caaggcgagt	tacatgatcc	cccatgttgt	gcaaaaaagc	ggttagctcc	ttcgtgcctc	9960
cgatcgttgt	cagaagtaag	ttggcccgag	tggtatcact	catggttatg	gcagcactgc	10020
ataattctct	tactgtcatg	ccatccgtaa	gatgcttttc	tgtgactggg	gagtactcaa	10080
ccaagtcat	ctgagaatag	tgtatgcggc	gaccgagttg	ctcttgcccg	gcgtcaatac	10140
gggataatac	cgcgccacat	agcagaactt	taaaagtgtc	catcattgga	aaacgttctt	10200
cggggcgaaa	actctcaagg	atcttacgcg	tggtgagatc	cagttcgatg	taaccactc	10260
gtgcacccaa	ctgatcttca	gcacctttta	ctttcaccag	cgtttctggg	tgagcaaaaa	10320
caggaaggca	aaatgccgca	aaaaagggaa	taagggcgac	acggaaatgt	tgaatactca	10380
tactcttctc	ttttcaatat	tattgaagca	tttatcaggg	ttattgtctc	atgagcggat	10440
acatatattga	atgtattttg	aaaaataaac	aaataggggt	tccgcgcaca	tttccccgaa	10500
aagtgccacc	tgacg					10515

Vector plg-C909-Ckappa (SEQ ID NO:191)

tcgacggatc	gggagatctc	ccgatccccc	atggtgcact	ctcagtacaa	tctgctctga	60
tgccgcatag	ttaagccagt	atctgctccc	tgcttggtg	ttggaggctg	ctgagtagtg	120
cgcgagcaaa	atttaagcta	caacaaggca	aggcttgacc	gacaattgtt	aattaacatg	180
aagaatctgc	ttagggttag	gcgttttgcg	ctgcttcgct	agggtgtcaa	tattggccat	240
tagccatatt	attcattggg	tatatagcat	aatcaatat	tggtatttgg	ccattgcata	300
cgttgtatcc	atatacata	atgtacattt	atatggctc	atgtccaaca	ttaccgcat	360
gttgacattg	attattgact	agttattaat	agtaataaat	tacgggggtca	ttagttcata	420
gcccataat	ggagttccgc	gttacataac	ttacggtaaa	tgccccgcct	ggctgaccgc	480
ccaacgaccc	ccgcccattg	acgtcaataa	tgacgtatgt	tcccatagta	acgccaatag	540
ggactttcca	ttgacgtcaa	tggttgagg	atttacggta	aactgccac	ttggcagtag	600
atcaagtgt	tcatatgcca	agtacgcccc	ctattgacgt	caatgacggt	aatggcccc	660
cctggcatta	tgcccagtac	atgaccttat	gggactttcc	tacttggcag	tacatctaag	720
tattagtcac	cgtattatcc	atggtgatgc	ggttttggca	gtacatcaat	gggcgtggat	780
agcgggttga	ctcacgggga	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	gtcgtgaggc	actgggcagg	taagtatcaa	ggttacaaga	caggtttaag	1140
gagatcaata	gaaactgggc	ttgtcgagac	agagaagact	cttgcgtttc	tgatagggac	1200
ctattggtct	tactgacatc	cactttgcct	ttctctccac	agggtgtccac	tcccagttca	1260
attacagctc	gccaccatgc	ggctgccgcg	ccagctgctg	ggccttctca	tgctgtgggt	1320
gccccgctcg	agatctatcg	atgcatgcca	tggtaccaag	cttgccacca	tgagcagcag	1380

ES 2 934 102 T3

ctcttggctg	ctgctgagcc	tggtggccgt	gacagccgcc	cagagcacca	tcgaggagca	1440
ggccaagacc	ttcctggaca	agtccaacca	cgaggccgag	gacctgttct	accagagcag	1500
cctggccagc	tggaactaca	acaccaacat	caccgaggag	aacgtgcaga	acatgaacaa	1560
cgccggcgac	aagtggagcg	ccttcttgaa	ggagcagagc	acactggccc	agatgtaccc	1620
cctgcaggag	atccagaacc	tgaccgtgaa	gctgcagctg	caggccctgc	agcagaacgg	1680
cagcagcgtg	ctgagcggag	acaagagcaa	gcggtgaaac	accatcctga	acaccatgtc	1740
caccatctac	agcaccggca	aagtgtgcaa	ccccgacaac	ccccaggagt	gcctgtgtgt	1800
ggagcccgcc	ctgaacgaga	tcatggccaa	cagcctggac	tacaacgagc	ggctgtgggc	1860
ctgggagagc	tgggcgagcg	aagtgggcaa	gcagctgcgg	cccctgtacg	aggagtacgt	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	cccatcggct	gcctgcccgc	2160
ccacctgctg	ggcgacatgt	ggggccggtt	ctggaccaac	ctgtacagcc	tgaccgtgcc	2220
cttcggccag	aagcccaaca	tcgacgtgac	cgacgccatg	gtggaccagg	cctgggacgc	2280
ccagcggatc	ttcaaggagg	ccgagaagtt	cttcgtgagc	gtgggcctgc	ccaacatgac	2340
ccagggtttt	tgggagaaca	gcatgctgac	cgaccccgcc	aatgtgcaga	aggccgtgtg	2400
ccaccccacc	gcctgggacc	tgggcaaggg	cgacttcgag	atcctgatgt	gcaccaaagt	2460
gaccatggac	gacttcctga	ccgccacca	cgagatgggc	cacatccagt	acgacatggc	2520
ctacgccgcc	cagcccttcc	tgctgcggaa	cgccgccaac	gagggctttc	acgaggccgt	2580
gggcgagatc	atgagcctga	gcgccgccac	ccccaaagcac	ctgaagagca	tcggcctgct	2640
gagcccccgc	ttccaggagg	acaacgagac	cgagatcaac	ttcctgtctga	agcaggccct	2700
gaccatcgtg	ggcacccctgc	ccttcaccta	catgctggag	aagtggcggt	ggtgggtgtt	2760
taaggggcag	atcccccaagg	accagtggat	gaagaagtgg	tgggagatga	agcgggagat	2820
cgtgggcgtg	gtggagcccg	tgccccacga	cgagacctac	tgcgaccccg	ccagcctgtt	2880
ccacgtgagc	aacgactact	ccttcctccg	gtactacacc	cggaccctgt	accagttcca	2940
gttcacagg	gccctgtgcc	aggccgccaa	gcacgagggc	cccctgcaca	agtgcgacat	3000
cagcaacagc	accgaggccg	gacagaaact	gttcaacatg	ctgcggctgg	gcaagagcga	3060
gccctggacc	ctggccctgg	agaatgttgt	gggcgccaa	aacatgaatg	tgcccccctt	3120
gctgaactac	ttcgagcccc	tgttcacctg	gctgaaggac	cagaacaaga	acagcttcgt	3180
gggctggagc	accgactgga	gcccctacgc	cgaccagagc	atcaaagtgc	ggatcagcct	3240
gaagagcgcc	ctggggcaca	aggcctacga	gtggaaacgac	aacgagatgt	acctgttccg	3300
gagcagcgtg	gcctatgcca	tgccgcagta	cttctgaaa	gtgaagaacc	agatgatcct	3360
gttcggcgag	gaggacgtga	gagtggccaa	cctgaagccc	cggatcagct	tcaacttctt	3420
cgtgaccgcc	cccaagaacg	tgagcgacat	catcccccg	accgaagtgg	agaaggccat	3480
ccggatgagc	cggagccgga	tcaacgacgc	cttcgggctg	aacgacaaat	ccctggagtt	3540
cctgggcatac	cagccccacc	tgggccctcc	caaccagccc	cccgtagca	tctggctgat	3600
cgtgtttggc	gtggtgatgg	gcgtgatcgt	ggtgggaatc	gtgatcctga	tcttcaccgg	3660
catccgggac	cggaaagaaga	agaacaaggc	ccggagcggc	gagaacccct	acgccagcat	3720
cgatatcagc	aagggcgaga	acaaccccgg	cttcacagaac	accgacgagc	tgagaccag	3780
cttctgataa	tctagaacga	gctcgaattc	gaagcttctg	cagacgcgtc	gacgtcatat	3840
ggatccgata	tcgccgtggc	ggccgcaccc	agcgtgttca	tcttccccc	ctccgacgag	3900
cagctgaaga	gcggcaccgc	cagcgtggtg	tgccctgctga	acaacttcta	ccccggggag	3960
gccaagggtg	agtggaaagt	ggacaacgcc	ctgcagagcg	gcaacagcca	ggagagcgtg	4020
accgagcagg	acagcaagga	ctccacctac	agcctgagca	gcacccctac	cctgagcaag	4080
gccgactacg	agaagcaca	ggtgtacgcc	tgcgagggtga	cccaccaggg	cctgagcagc	4140
cccgtgacca	agagcttcaa	ccggggcgag	tgtaaataga	cttaagttaa	aacgcgtgat	4200
cagcctcgac	tgtgccttct	agttgccagc	catctgttgt	ttgcccctcc	cccggtgcct	4260
ccttgaccct	ggaaggtgcc	actcccactg	tcctttccta	ataaaatgag	gaaattgcat	4320
cgcattgtct	gagtaggtgt	cattctattc	tggggggtgg	ggtggggcag	gacagcaagg	4380
gggaggattg	ggaagacaat	agcaggcatg	ctggggatgc	ggtgggctct	atggcttctg	4440
aggcggaagg	aaccagctgg	ggctctaggg	ggtatcccca	cgcgccctgt	agcggcgcat	4500
taagcgcgcc	gggtgtggtg	gttacgcgca	gcgtgaccgc	tacacttgcc	agcgccctag	4560
cgcgcgctcc	tttcgcttcc	ttcccttcc	ttctcgccac	gttcgcgggc	tttccccgtc	4620
aagctctaaa	tcgggggctc	cctttagggt	tccgatttag	tgcctttacg	cacctcgacc	4680
ccaaaaaact	tgattagggt	gatgggtcac	gtagtgggcc	atcgccctga	tagacggttt	4740
ttcgcctctt	gaegtgtggg	tccaagttct	ttaatagtgg	actcttgttc	caaaactggaa	4800
caacactcaa	ccctatctcg	gtctattctt	ttgatattata	agggattttg	gccatttcgg	4860
cctattgggt	aaaaaatgag	ctgatttaac	aaaaatttaa	cgcgaattaa	ttctgtggaa	4920

ES 2 934 102 T3

tgtgtgtcag	ttaggggtgtg	gaaagtcccc	aggctcccca	gcaggcagaa	gtatgcaaa	4980
catgcatctc	aattagtcag	caaccagggtg	tggaaagtcc	ccagggtccc	cagcaggcag	5040
aagtatgcaa	agcatgcata	tcaattagtc	agcaaccata	gtcccccccc	taactccgcc	5100
catcccgccc	ctaactccgc	ccagttccgc	ccattctccg	ccccatggt	gactaatttt	5160
ttttatttat	gcagaggccg	aggccgcctc	tgccctctgag	ctattccaga	agtagtgagg	5220
aggctttttt	ggaggcctag	gcttttgcaa	aaagctcccg	ggagcttgta	tatccatttt	5280
cggatctgat	cagcacgtga	tgaaaaagcc	tgaactcacc	gcgacgtctg	tcgagaagtt	5340
tctgatcgaa	aagttcgaca	gcgtctccga	cctgatgcag	ctctcggagg	gcgaagaatc	5400
tcgtgctttc	agcttcgatg	taggagggcg	tggatatgtc	ctgcgggtaa	atagctgcgc	5460
cgatgggttc	tacaaagatc	gttatgttta	tcggcacttt	gcacgcgcgc	cgctcccgat	5520
tccggaagtg	cttgacattg	gggaattcag	cgagagcctg	acctattgca	tctcccgccg	5580
tgcacagggg	gtcacgttgc	aagacctgcc	tgaaaaccgaa	ctgcccgcctg	ttctgcagcc	5640
ggctgcggag	gccatggatg	cgatcgctgc	ggccgatctt	agccagacga	gcgggttcgg	5700
cccatttcgga	ccacaaggaa	tcggtcaata	cactacatgg	cgtgatttca	tatgcgcgat	5760
tgctgatccc	catgtgtatc	actggcaaac	tgtgatggac	gacaccgtca	gtgcgtccgt	5820
cgcgcaggct	ctcgatgagc	tgatgctttg	ggccgaggac	tgccccgaag	tcgggcacct	5880
cgtgcaecgc	gatttcggct	ccaacaatgt	cctgacggac	aatggccgca	taacagcggg	5940
cattgactgg	agcgaggcga	tggtcgggga	ttcccaatac	gaggtcgcca	acatcttctt	6000
ctggaggccg	tggttggtct	gtatggagca	gcagacgcgc	tacttcgagc	ggaggcatcc	6060
ggagcttgca	ggatcgccgc	ggctccgggc	gtatatgtct	cgcattggtc	ttgaccaact	6120
ctatcagagc	ttgggttgacg	gcaatttcga	tgatgcagct	tgggcgagcag	gtcgatgcga	6180
cgcaatcgct	cgatccggag	ccgggactgt	cgggcgtaca	caaatcgccc	gcagaagcgc	6240
ggccgtctgg	accgatggct	gtgtagaagt	actgcgcgat	agtggaaacc	gacgccccag	6300
cactcgtccg	agggcaaaag	aatagcacgt	gctacgagat	ttcgattcca	ccgcccgcct	6360
ctatgaaagg	ttgggctctg	gaatcgtttt	ccgggacgcc	ggctggatga	tcctccagcg	6420
cggggatctc	atgctggagt	tcttcgcccc	ccccaaactg	tttattgcag	cttataatgg	6480
ttacaaataa	agcaatagca	tcacaaatlt	cacaaataaa	gcattttttt	cactgcattc	6540
tagttgtggt	ttgtccaaac	tcactcaatgt	atcttatcat	gtctgtatac	cgtcgacctc	6600
tagctagagc	ttggcgtaat	catggtcata	gctgtttcct	gtgtgaaatt	gttatccgct	6660
cacaattcca	cacaacatac	gagccggaag	cataaagtgt	aaagcctggg	gtgcctaaty	6720
agttagctaa	ctcacattaa	ttgcgtttcg	ctcactgccc	gctttccagt	cgggaaacct	6780
gtcgtgccag	ctgcattaat	gaatcggcc	acgcgcgggg	agaggcggtt	tgctgattgg	6840
gcgctctctc	gcttcctcgc	tcactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgccggcgagc	6900
ggtatcagct	cactcaaaag	cggtataacg	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	6960
aaagaacatg	tgagcaaaag	gccagcaaaa	ggccagggaac	cgtaaaaaag	ccgcgttgct	7020
ggcgtttttt	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	7080
gaggtggcga	aaoccgacag	gactataaa	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	7140
cgtgcgctct	cctgtttccga	ccctgcgcgt	taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	7200
gggaagcgtg	gcgctttctc	atagctcaag	ctgtagggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	7260
tcgctccaa	ctgggctgtg	tgacgaacc	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttatc	7320
cggtaactat	cgtcttgagt	ccaacccggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	7380
cactgtgaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	gtacagagt	tcttgaagt	7440
gtggcctaac	tacggctaca	ctagaagaac	agtatttggt	atctgcgctc	tgctgaagcc	7500
agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	7560
cgggtttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	7620
tttgatcttt	tctacggggt	ctgacgctca	gtggaaocga	aactcacgtt	aagggaattt	7680
ggtcatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaattaaa	aatgaagttt	7740
taaatacaat	taaagtatat	atgagtaaac	ttggtctgac	agttaccaat	gcttaatcag	7800
tgaggcacct	atctcagcga	tctgtctatt	tcgttcaccc	atagttgcct	gactccccgt	7860
cgtgtagata	actacgatac	gggagggcct	accatctggc	cccagtgctg	caatgatacc	7920
gcgagaccca	cgtccaccgc	ctccagattt	atcagcaata	aaccagccag	ccggaaggcg	7980
cgagcgcaga	agtggtcctg	caactttatc	cgcctccatc	cagtctatta	attgttgccg	8040
ggaagctaga	gtaagtagtt	cgccagttaa	tagtttgccg	aacgttggtg	ccattgctac	8100
aggcatcggt	gtgtcacgct	cgtcggttgg	tatggcttca	ttcagctccg	gttcccaacg	8160
atcaaggcga	gttacatgat	cccccatggt	gtgcaaaaaa	gcgggttagct	ccttcgggtc	8220
tccgatcggt	gtcagaagta	agttggccgc	agtgttatca	ctcatgggta	tggcagcact	8280
gcataattct	cttactgtca	tgccatccgt	aagatgettt	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
aacagggaag	caaaatgccg	caaaaaagg	aataaggcg	acacggaaat	gttgaatact	8640
catactcttc	ctttttcaat	attattgaag	catttatcag	ggttattgtc	tcatgagcgg	8700
atacatat	gaatgtat	agaaaaataa	acaaatagg	gttccgcgca	catttccccg	8760
aaaagtgc	cctgacg					8777

ES 2 934 102 T3

tcgacggatc	gggagatctc	ccgatccccc	atggtgcact	ctcagtacaa	tctgctctga	60
tgccgcatag	ttaaagccagt	atctgctccc	tgcttggtgtg	ttggagggtcg	ctgagtagtg	120
cgcgagcaaa	attttaagcta	caacaaggca	aggcttgacc	gacaattgtt	aattaacatg	180
aagaatctgc	ttagggttag	gcgttttgcg	ctgcttcgct	agggtggtcaa	tattggccat	240
tagccatatt	attcattggt	tatatagcat	aaatcaatat	tggctattgg	ccattgcata	300
cgttgtatcc	atatcataat	atgtacat	atattggctc	atgtccaaca	ttaccgccat	360
gttgacattg	attattgact	agttattaat	agtaatcaat	tacgggggtca	ttagttcata	420
gccccatat	ggagttccgc	gttacataac	ttacggtaaa	tggccccgct	ggctgaccgc	480
ccaacgaccc	ccgcccattg	acgtcaataa	tgacgtatgt	tcccatagta	acgccaatag	540
ggactttcca	ttgacgtcaa	tgggtggagt	atttacggta	aactgcccac	ttggcagtac	600
atcaagtgtg	tcatatgcca	agtacgcccc	ctattgacgt	caatgacggt	aaatggccc	660
cctggcatta	tgcccagtac	atgaccttat	gggactttcc	tacttggcag	tacatctacg	720
tattagtcot	cgtattacc	atggtgatgc	ggttttggca	gtacatcaat	gggcgtggat	780
agcggtttga	ctcacgggga	tttcctcaagtc	tccaccccat	tgacgtcaat	gggagtttgt	840
tttggcacca	aaatcaacgg	gactttccaa	aatgtcgtaa	caactccgcc	ccattgacgc	900
aaatgggcg	taggcgtgta	cggtagggagg	tctatataag	cagagctcgt	ttagtgaacc	960
gtcagatcgc	ctggagacgc	catccacgct	gttttgacct	ccatagaaga	caccgggacc	1020
gatccagcct	ccgcggccgg	gaacggtgca	ttggaatcga	tgactctctt	aggtagcctt	1080
gcagaagtgtg	gtcgtgaggc	actgggcagg	taagtatcaa	ggttacaaga	caggtttaag	1140
gagatcaata	gaaactgggc	ttgtcgagac	agagaagact	cttgcgtttc	tgataggcac	1200
ctattggtct	tactgacatc	cactttgcct	ttctctccac	agggtgtccac	tcccagttca	1260
attacagctc	gccaccatgc	ggttctccgc	tcagctgctg	ggccttctgg	tgctgtggat	1320
tcccggcgctc	tcgagatcta	tcgatgcatg	ccatggtacc	aagcttgcca	ccatgagcag	1380
cagctcttgg	ctgctgctga	gcctggtggc	cgtgacagcc	gcccagagca	ccatcgagga	1440
gcaggccaag	accttcctgg	acaagttaa	ccacgaggcc	gaggacctgt	tctaccagag	1500
cagcctggcc	agctggaact	acaacaccaa	catcacccag	gagaacgtgc	agaacatgaa	1560
caacgcccgc	gacaagtgga	gcgccttcct	gaaggagcag	agcacactgg	cccagatgta	1620
ccccctgcag	gagatccaga	acctgaccgt	gaagctgcag	ctgcaggccc	tgcagcagaa	1680
cggcagcagc	gtgctgagcg	aggacaagag	caagcggctg	aacaccatcc	tgaacaccat	1740
gtccaccatc	tacagcaccc	gcaaagtgtg	caaccccagc	aacccccagg	agtgcctgct	1800
gctggagccc	ggcctgaacg	agatcatggc	caacagcctg	gactacaacg	agcggctgtg	1860
ggcctgggag	agctggcgga	tgtggggcgc	gttctggacc	cggcccctgt	acgaggagta	1920
cgtggtgctg	aagaacgaga	tggccagggc	caaccactac	gaggactacg	gcgactactg	1980
gagaggcgac	tacgaagtga	acggcgtgga	cggctacgac	tacagcagag	gccagctgat	2040
cgaggacgtg	gagcacacct	tcgaggagat	caagcctctg	tacgagcacc	tgcacgccta	2100
cgtgcggggc	aagctgatga	acgcctaccc	cagctacatc	agccccatcg	gctgcctgcc	2160
cgcccacctg	ctgggcgaca	tgtggggcgc	gttctggacc	aacctgtaca	gcctgaccgt	2220
gcccttcggc	cagaagccca	acatcgacgt	gaccgacgcc	atggtggacc	aggcctggga	2280
cgcccagcgg	atcttcaagg	aggccgagaa	gttcttcgtg	agcgtggggc	tgcccaacat	2340
gacccagggc	ttttgggaga	acagcatgct	gaccgacccc	ggcaatgtgc	agaaggccgt	2400
gtgccacccc	accgcctggg	acctgggcaa	ggcgacttcc	cggatcctga	tgtgcaccaa	2460
agtgaccatg	gacgacttcc	tgaccgccc	ccacgagatg	ggccacatcc	agtacgacat	2520
ggcctacgcc	gcccagccct	tectgctgcg	gaacggcgcc	aacgagggct	ttcacgaggc	2580
cgtgggcgag	atcatgagcc	tgagcgccgc	cacccccaa	cacctgaaga	gcatcgccct	2640
gctgagcccc	gacttccagg	aggacaacga	gaccgagatc	aacttcctgc	tgaagcaggc	2700
cctgaccatc	gtgggcaacc	tgcccttcac	ctacatgctg	gagaagtggc	ggtggatggt	2760
gtttaagggc	gagatcccca	aggaccagtg	gatgaagaag	tggtagggaga	tgaagcggga	2820
gatcgtgggc	gtggtggagc	ccgtgcccc	cgacgagacc	tactgcgacc	ccgccagcct	2880
gttccacgtg	agcaacgact	actccttcat	ccggtactac	acccggaccc	tgtaccagtt	2940
ccagttccag	gagggcctgt	gccaggccgc	caagcacgag	ggccccctgc	acaagtgcga	3000
catcagcaac	agcaccgag	ccggacagaa	actgttcaac	atgctgcggc	tgggcaagag	3060
cgaagccctg	accctggccc	tggagaatgt	ggtggggcgc	aagaacatga	atgtgcgccc	3120

ES 2 934 102 T3

cctgctgaac	tacttcgagc	cctgtttcac	ctggctgaag	gaccagaaca	agaacagctt	3180
cgtgggcttg	agcaccgact	ggagccccta	cgccgaccag	agcatcaaag	tgccgatcag	3240
cctgaagagc	gccctgggcg	acaaggcccta	cgagtggaaac	gacaacgaga	tgtacctgtt	3300
ccggagcagc	gtggcctatg	ccatgcggga	gtacttcctg	aaagtgaaga	accagatgat	3360
cctgttcggc	gaggaggacg	tgagagtggc	caacctgaag	ccccggatca	gcttcaactt	3420
cttcgtgacc	gcccccaaga	acgtgagcga	catcatcccc	cggaaccgaag	tggagaaggc	3480
catccggatg	agccggagcc	ggatcaacga	cgccttcogg	ctgaacgaca	actccctgga	3540
gttcctgggc	atccagccca	ccctggggccc	tcccaaccag	ccccccgtga	gcactctggc	3600
gacgtgtttt	ggcgtggtga	tggcggtgat	cgtggtggga	atcgtgatcc	tgatcttcac	3660
cggcacccgg	gaccggaaga	agaagaacaa	ggcccggaagc	ggcgagaacc	cctacgccag	3720
catcgatata	agcaagggcg	agaacaaccc	cggcttccag	aacaccgacg	acgtgcagac	3780
cagcttctga	taatctagaa	cgagctcgaa	ttcgaagctt	ctgcagacgc	gtcgacgtca	3840
tatggatccg	atatcgccgt	ggcggccgca	ggccagccca	aggccgctcc	cagcgtgacc	3900
ctgttccccc	cctcctccga	ggagctgcag	gcccaacaagg	ccaccctggt	gtgcctcatc	3960
agcgacttct	accctggcgc	cgtgaccgtg	gcctggaagg	ccgacagcag	ccccgtgaag	4020
gccggcgttg	agaccaccac	ccccagcaag	cagagcaaca	acaagtacgc	cgccagcagc	4080
tacctgagcc	tcacccccga	gcagtggaa	agccaccgga	gctacagctg	ccaggtgacc	4140
cacgagggca	gcaccgtgga	gaagaccgtg	gccccaccgc	agtgcagcta	atagacttaa	4200
gtttaaaccg	ctgatccagc	tcgactgtgc	cttctagtgt	ccagccatct	gtgttttgc	4260
cctccccctg	gccttccttg	accctggaag	gtgccactcc	cactgtcctt	tcctaataaa	4320
atgaggaaat	tgcacgcgat	tgtctgagta	gggtgcattc	tattctgggg	ggtgggggtg	4380
ggcaggacag	caagggggag	gattgggaag	acaatagcag	gcattgctgg	gatgcgggtg	4440
gctctatggc	ttctgaggcg	gaaagaacca	gctggggctc	taggggggat	ccccacgcgc	4500
cctgtagcgg	cgcattaaagc	gcggcgggtg	tgggtggttac	gcgcagcgtg	accgtacac	4560
ttgccagcgc	cctagcgcgc	gctcctttcg	ctttcttccc	ttcctttctc	gccacgttcg	4620
ccggctttcc	ccgtcaagct	ctaaatcggg	ggctcccttt	agggttcoga	tttagtgctt	4680
tacggcacct	cgacccccaa	aaacttgatt	agggtgatgg	ttcacgtagt	gggccatcgc	4740
cctgatagac	ggttttttcg	cctttgacgt	tggagtccac	gttctttaat	agtggactct	4800
tgtttcaaac	tggacaacaa	ctcaacccta	gctcgttcta	ttcttttgat	ttataaggga	4860
ttttggccat	ttcggcctat	tggttaaaaa	atgagctgat	ttacaaaaaa	tttaacgcga	4920
attaattctg	tggaaatgtg	gtcagttagg	gtgtggaaa	tccccaggct	ccccagcagg	4980
cagaagtatg	caaagcatgc	atctcaatta	gtcagcaacc	agggtgtgga	agtccccagg	5040
ctccccagca	ggcagaagta	tgcaaacgat	gcattctaat	tagtcagcaa	ccatagctcc	5100
gccccctaact	ccgccccatc	cgccccctaac	tccgcccagt	tccgcccatt	ctccgccccca	5160
tggctgacta	atTTTTTTTta	tttatgcaga	ggccgaggcc	gcctctgcct	ctgagctatt	5220
ccagaagtag	tgaggaggct	tttttgagg	cctaggcttt	tgcaaaaaagc	tccggggagc	5280
ttgtatatcc	atTTTtcgat	ctgatcagca	cgtgatgaaa	aagcctgaac	tcaccgcgac	5340
gtctgtcgag	aagttttctga	tcgaaaaagt	cgacagcgtc	tccgaacctga	tgacgtctc	5400
ggaggggcaa	gaatctcgtg	ctttcagctt	cgatgtagga	gggcgtggat	atgtcctgcg	5460
ggtaaatagc	tgcgcgatg	gtttctacaa	agatcgttat	gtttatcggc	actttgcac	5520
ggccgcgctc	ccgattccgg	aagtgtctga	cattggggaa	ttcagcgaga	gcctgacctc	5580
ttgcactctc	cgccgtgcac	agggtgtcac	gttgcaagac	ctgcctgaaa	ccgaactgcc	5640
cgtgttctcg	cagccggtcg	cggaggccat	ggatgcgac	gctgcggccg	atcttagcca	5700
gacgagcggg	ttcggcccat	tcggaccgca	aggaatcgg	caatacacta	catggcgtga	5760
tttcatatgc	gcgattgctg	atccccatgt	gtatcactgg	caaactgtga	tggacgacac	5820
cgtcagtgcg	tccgtcgcgc	aggtctctga	tgagctgatg	ctttggggccg	aggactgcc	5880
cgaagtccgg	caacctcgtg	acgcggattt	cggctccaac	aatgtcctga	cggacaatgg	5940
ccgcataaca	gcgggtcattg	actggagcga	ggcgatgttc	ggggattccc	aatacagagg	6000
cgccaacatc	ttcttctgga	ggcgtgggt	ggcttgatg	gagcagcaga	cgcgctactt	6060
cgagcggagg	catccggagc	ttgcaggatc	gccgcggctc	cgggcgtata	tgctccgcac	6120
tggctctgac	caactctatc	agagcttgg	tgacggcaat	ttcgatgatg	cagcttgggc	6180
gcagggtcga	tgcgacgcaa	tcgtccgatc	cggagccggg	actgtcgggc	gtacacaaat	6240
cgcccgacga	agcgcggccg	tctggaccga	tggctgtgta	gaagtactcg	ccgatagtgg	6300
aaaccgacgc	cccagcactc	gtccgagggc	aaaggaatag	cacgtgctac	gagattttcg	6360
ttccaccgcc	gccttctatg	aaaggttggg	cttcggaatc	gttttccggg	acgccggctg	6420
gatgatcttc	cagcgcgggg	atctcatgct	ggagttcttc	gcccacccca	acttgtttat	6480
tgacgcttat	aatggttaca	aataaagcaa	tagcatcaca	aatttcacaa	ataaagcatt	6540
tttttcaactg	cattctagtt	gtggtttgtc	caaactcacc	aatgtatctt	atcatgtctg	6600
tataccgtcg	acctctagct	agagcttggc	gtaatcatgg	tcatagctgt	ttcctgtgtg	6660
aaattgttat	ccgctcacia	ttccacacaa	catacagacc	ggaagcataa	agtgtaaagc	6720

ctggggtgcc	taatgagtga	gctaactcac	attaattgcg	ttgcgctcac	tgcccgtttt	6780
ccagtcggga	aacctgtcgt	gccagctgca	ttaatgaatc	ggccaacgcg	cggggagagg	6840
cggtttgctg	attggggcgt	cttccgcttc	ctcgcctcact	gactcgcctgc	gctcggctcgt	6900
tcggctgcgg	cgagcgggat	cagctcactc	aaaggcggta	atacggttat	ccacagaatc	6960
aggggataac	gcaggaaaga	acatgtgagc	aaaaggccag	caaaaggcca	ggaaccgtaa	7020
aaaggccgcg	ttgctggcgt	ttttccatag	gctccgcccc	cctgacgagc	atcacaaaaa	7080
tcgacgctca	agtcagaggt	ggcgaaaccc	gacaggacta	taaagatacc	aggcgtttcc	7140
ccctggaagc	tcctcctgtc	gctctcctgt	tcggaccctg	ccgcttaccg	gatacctgtc	7200
cgcctttctc	ccttcgggaa	gcgtggcgct	ttctcatagc	tcacgctgta	ggtatctcag	7260
ttcgggtgag	gtcgttcgct	ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccg	ttcagcccga	7320
ccgctgcgcc	ttatccggta	actatcgtct	tgagtccaac	ccggtaagac	acgacttata	7380
gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	aggatatgtag	gcgggtgtac	7440
agagttcttg	aagtgggtgc	ctaactacgg	ctacactaga	agaacagtat	ttggtatctg	7500
cgtctgtctg	aagccagtta	ccttcggaaa	aagagttggt	agctcctgat	ccggcacaaca	7560
aaccaccgct	ggtagcgggt	tttttgtttg	caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	7620
atctcaagaa	gatcctttga	tcttttctac	ggggtctgac	gctcagtga	acgaaaactc	7680
acgttaaggg	attttgggtca	tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tccttttaaa	7740
ttaaaaatga	agtttttaaat	caatctaaag	tatatatgag	taaacttggg	ctgacagtta	7800
ccaatgctta	atcagtggag	cacctatctc	agcgatctgt	ctatttcgtt	catccatagt	7860
tgctgactc	cccgctcgtg	agataactac	gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	7920
tgctgcaatg	ataccgcgag	acccacgctc	accggctcca	gatttatcag	caataaacca	7980
gccagccgga	aggcccgagc	gcagaagtgg	tcctgcaact	ttatccgcct	ccatccagtc	8040
tattaattgt	tgccgggaag	ctagagtaag	tagttcgcca	gttaatagtt	tgcgcaacgt	8100
tggtgccatt	gctacaggca	tcgtggtgtc	acgctcgtcg	tttggtatgg	cttcattcag	8160
ctccggttcc	caacgatcaa	ggcgagttac	atgatccccc	atggtgtgca	aaaaagcggt	8220
tagctccttc	ggtcctccga	tcgttgtcag	aagtaagttg	gccgcagtgt	tatcactcat	8280
ggttatggca	gcactgcata	attctcttac	tgtcatgcca	tcgtaagat	gcttttctgt	8340
gactggtgag	tactcaacca	agtcattctg	agaatagtgt	atgcccgcgac	cgagtgtgctc	8400
ttgcccggcg	tcaatacggg	ataataccgc	gccacatagc	agaacttta	aagtgtcat	8460
cattggaaaa	cgttcttcgg	ggcgaaaact	ctcaaggatc	ttaccgctgt	tgagatccag	8520
ttcgaatgaa	cccactcgtg	cacccaactg	atcttcagca	tcttttactt	tcaccagcgt	8580
ttctgggtga	gcaaaaacag	gaaggcaaaa	tgccgcacaa	aagggaataa	ggcgacacg	8640
gaaatgttga	atactcatac	tcttcccttt	tcaatattat	tgaagcattt	atcagggtta	8700
ttgtctcatg	agcggataca	tatttgaatg	tatttagaaa	aataaacaaa	taggggttcc	8760
gcgcacattt	cccgcgaaaag	tgccacctga	cg			8792

Secuencia de HA inmadura de A/Hong Kong/1/1968 (SEQ ID NO:193)

MKTIALSYIFCLALGQDLPGNDNSTATLCLGHHA VPNGTLVKITITDDQIEVTNATELV
 QSSSTGKICNNPHRILDGIDCTLIDALLGDPHCDVFQNETWDLFVERSKAFSNCYPYDV
 PDYASLRSLVASSGTLEFITEGFTWTGVTQNGGSNACKRGP
 SGFFSRLNWLTKSGSTYPVLNVTMPNNDNFDKLYIWGVVHPSTNQEQTSLYVQASGR
 VTVSTRRSQQTIIPNIGSRPWVRGLSSRISYWTIVKPGDVLVINSNGNLIAPRGYFKMRT
 GKSSIMRSDAPIDTCISECITPNGSIPNDKPFQNVNKITYGACPKYVKQNTLKLATGMRN
 VPEKQTRGLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQINGK
 LNRVIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT
 DSEMKNLFKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIESIRNGTYDHDVYRDEALN
 NRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVLLGFIMWACQQRGNIRCNICI

5

REFERENCIAS

- 10 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.
- Boel E *et al.* (2000), Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments. J Immunol Methods 239:153-166.
- 15 Brown EG *et al.* (2001), Pattern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: Identification of functional themes. PNAS 98:6883-6888.
- Burton DR y Barbas CF (1994), Human antibodies from combinatorial libraries. Adv Immunol. 57:191-280.

Chou TC y P Talalay (1984), Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22:27-55.

5 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.

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.

10 Ekiert *et al.* (2009), Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* 324:246-251.

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.

15 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano que puede reconocer específicamente y unirse a un epítipo en la proteína hemaglutinina (HA) de la gripe, que tiene actividad neutralizante contra virus de la gripe que comprenden HA del subtipo H3, tal como H3N2, y que tiene actividad neutralizante cruzada contra al menos un virus de la gripe que comprende HA del subtipo H7, y/o un virus de la gripe que comprende HA del subtipo H10, en el que el anticuerpo se une a un epítipo que comprende el aminoácido en la posición 19, 25, 27, 33 y 34 del polipéptido HA2 de la proteína HA H3 y en el que el aminoácido en la posición 19 es ácido aspártico (D), el aminoácido en la posición 25 es glutamina (Q), el aminoácido en la posición 27 es glicina (G), el aminoácido en la posición 33 es glicina (G) y el aminoácido en la posición 34 es glutamina.
2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que puede reconocer específicamente y unirse a un epítipo en la proteína hemaglutinina (HA) de la gripe, que tiene actividad neutralizante contra virus de la gripe que comprenden HA del subtipo H3, tal como H3N2, **caracterizado por que** dicho anticuerpo tiene al menos actividad neutralizante contra una o más de las cepas H3N2 seleccionadas del grupo que consiste en A/Wisconsin/67/2005, A/Hiroshima/52/2005, A/Panamá/2007/99 y A/Johannesburgo/33/94.
3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo además tiene actividad neutralizante contra la cepa H3N2 A/Hong Kong/1/68.
4. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:
 - a. un anticuerpo que comprende una región CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO:109, una región CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO:110 y una región CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO:111; y una región CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 112, una región CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 113 y una región CDR3 de la cadena ligera de 114,
 - b. un anticuerpo que comprende una región CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 138, una región CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO:139 y una región CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO:140, y una región CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 141, una región CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 142 y una región CDR3 de la cadena ligera de 143,
 - c. un anticuerpo que comprende una región CDR1 de la cadena pesada de SEQ ID NO:144, una región CDR2 de la cadena pesada de SEQ ID NO:145 y una región CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO:146; y una región CDR1 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 147, una región CDR2 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 148 y una región CDR3 de la cadena ligera de 149.
5. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso como medicamento.
6. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso como medicamento en el tratamiento diagnóstico, terapéutico y/o profiláctico de infección por gripe provocada por virus de la gripe que comprende HA del subtipo H3, tal como H3N2.
7. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, comprendiendo además el inmunoconjugado al menos una marca.
8. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y/o un inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 7 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. Uso de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y/o un inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 7 en la preparación de un medicamento para el diagnóstico, profilaxis y/o tratamiento de una infección por virus de la gripe.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** la infección de gripe está provocada por virus de la gripe que comprende HA del subtipo H3, tal como H3N2.
11. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende al menos un anticuerpo adicional.
12. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizada por que** el anticuerpo adicional puede neutralizar virus de la gripe que comprende HA del subtipo H1 y H5, tal como H1N1 y H5N1.
13. Una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
14. Un vector que comprende al menos una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13.
15. Una célula hospedadora que comprende al menos un vector de acuerdo con la reivindicación 14.

16. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el hospedador es una célula humana.

- 5 17. Un método de producción de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el método comprende las etapas de:
cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 15 o 16 en condiciones que dan lugar a la expresión del anticuerpo o variante funcional y, opcionalmente,
recuperar el anticuerpo expresado.

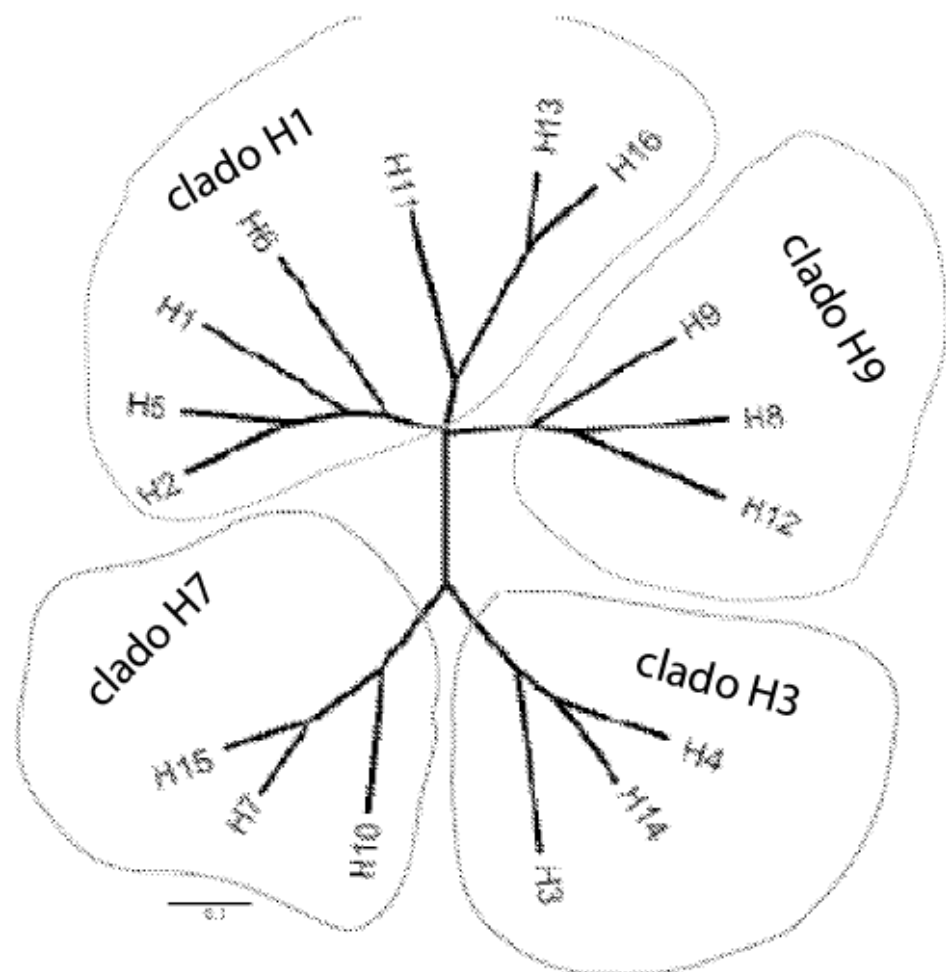


FIG. 1

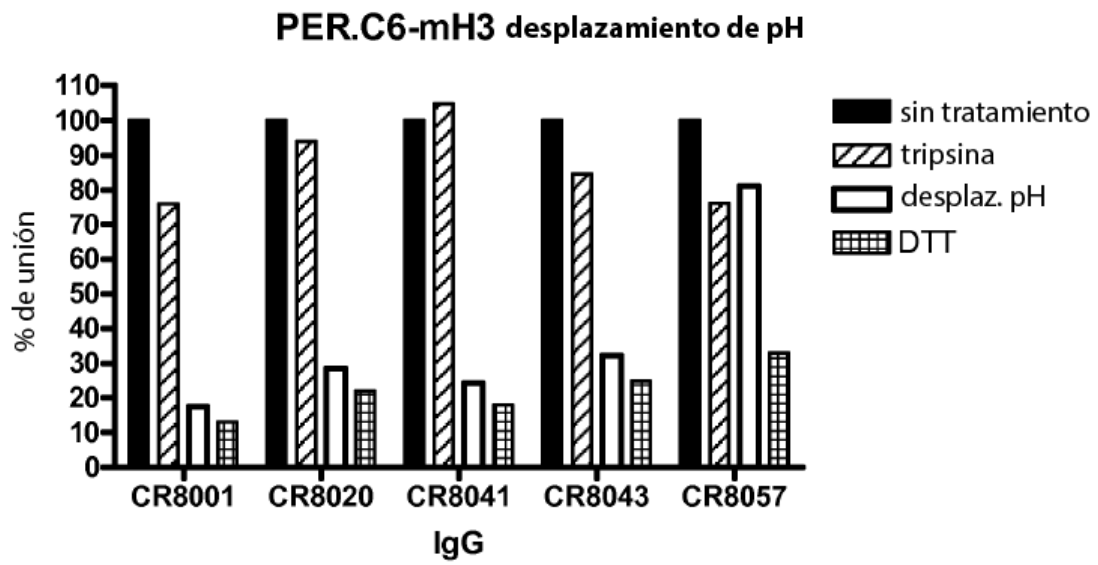


FIG. 2

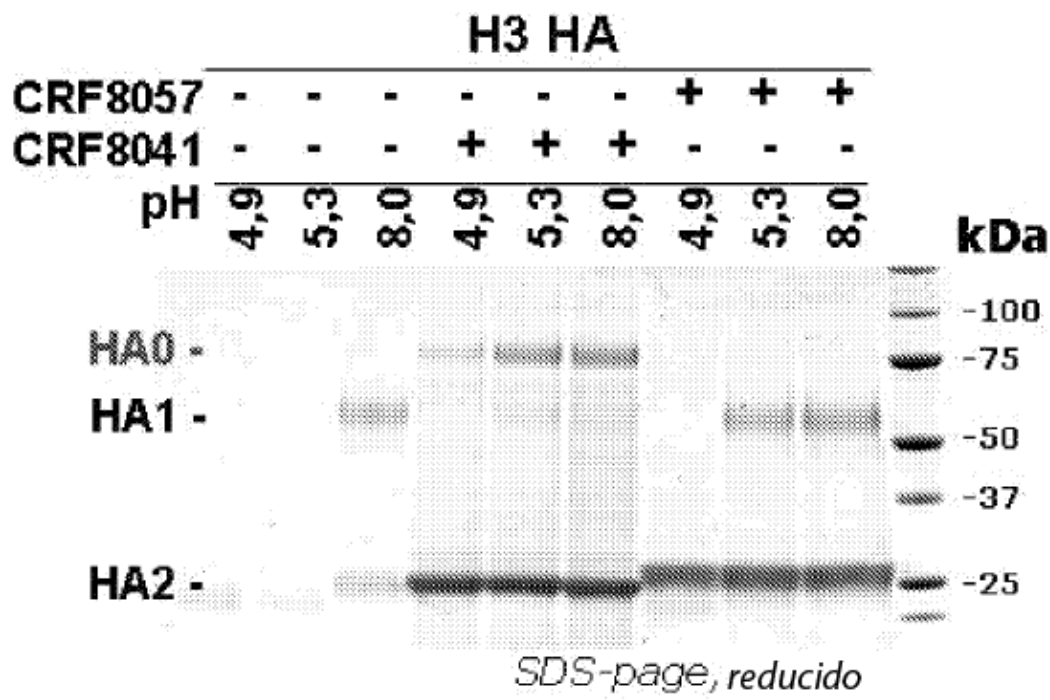


FIG. 3

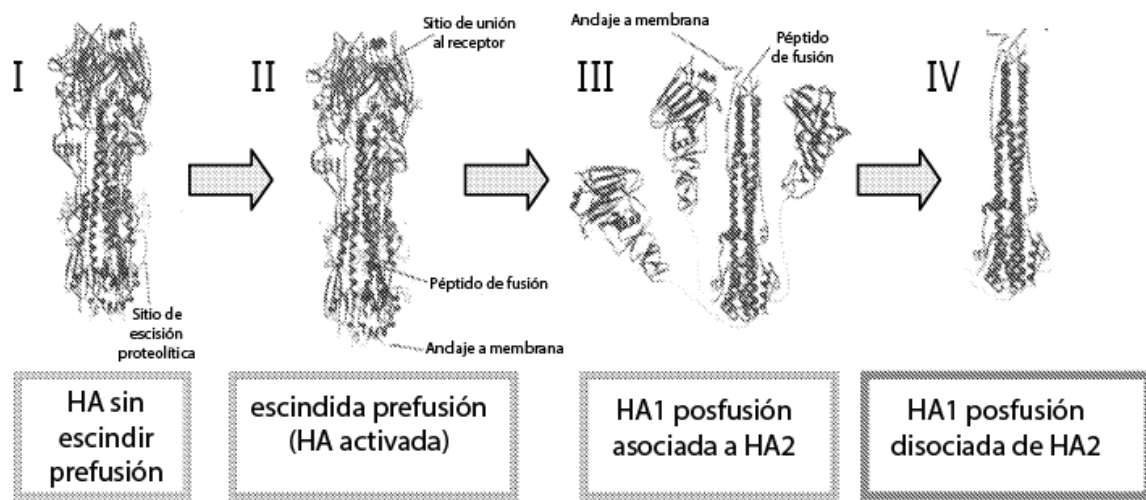


FIG. 4

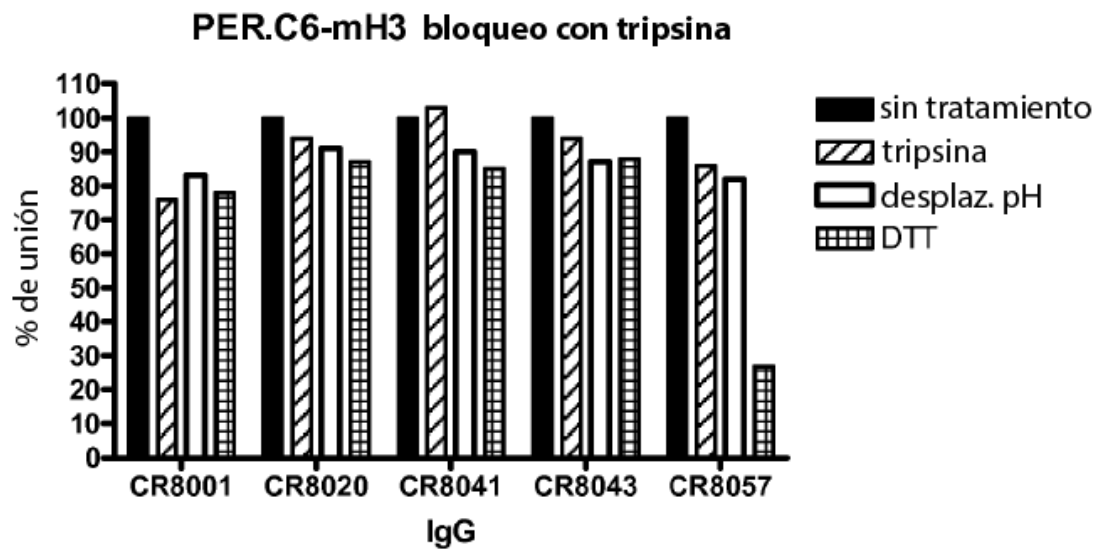


FIG. 5

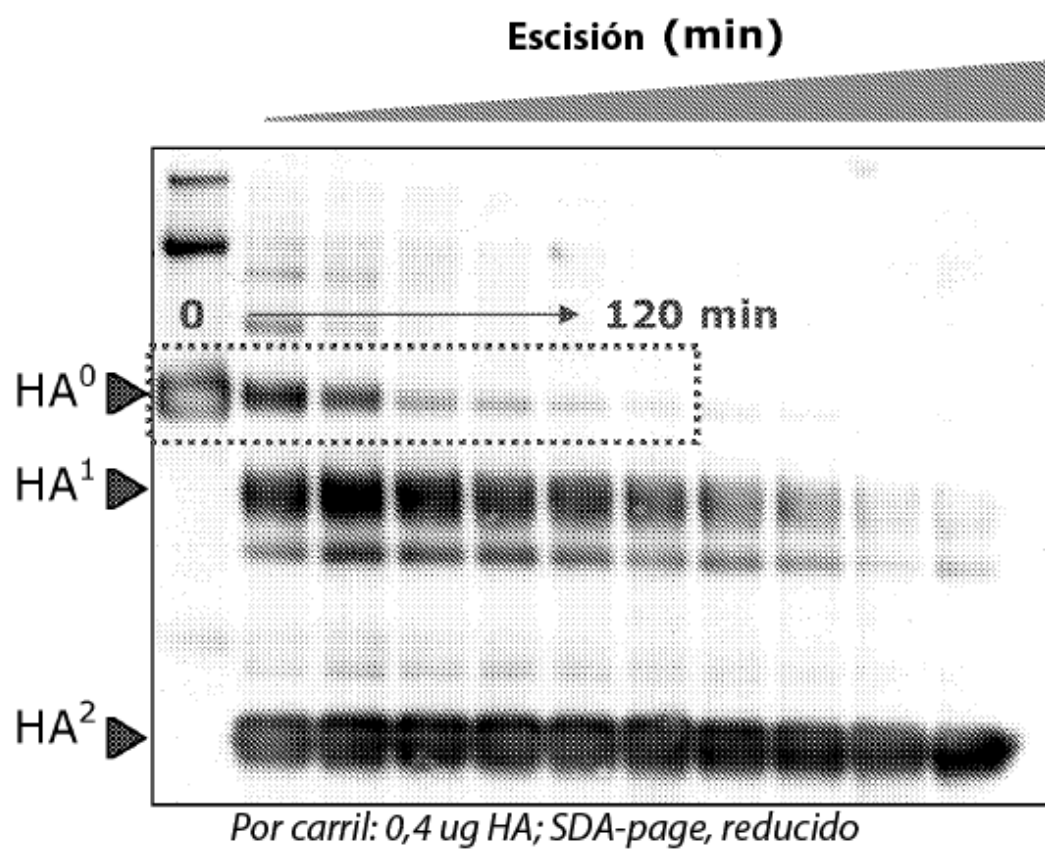
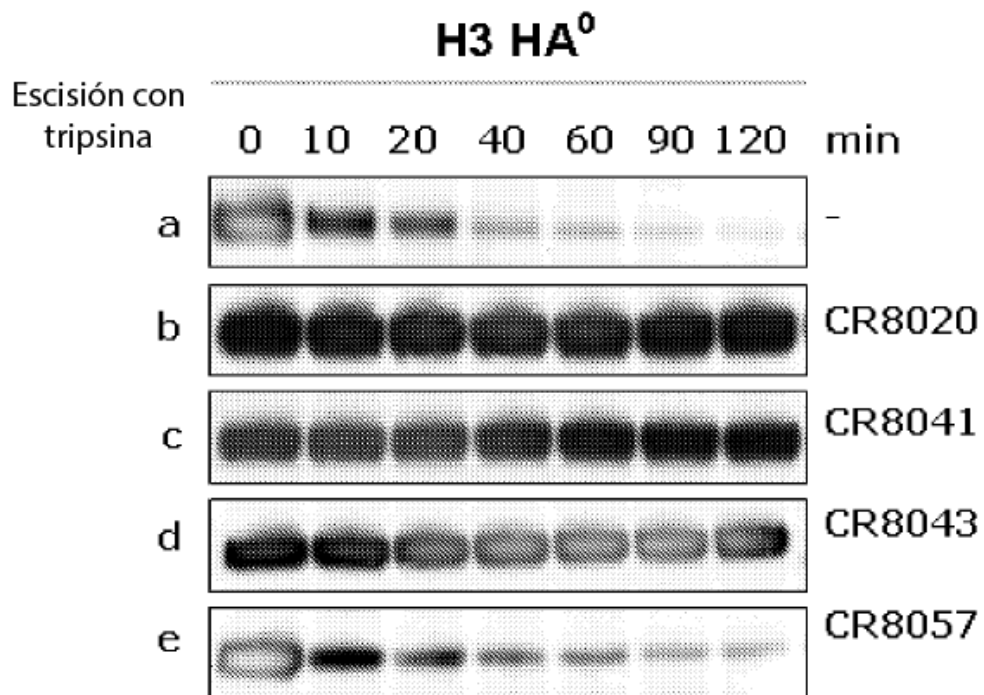


FIG. 6



Por carril: 0,4 ug HA, 2,5 ug IgG; SDA-page, reducido

FIG. 7

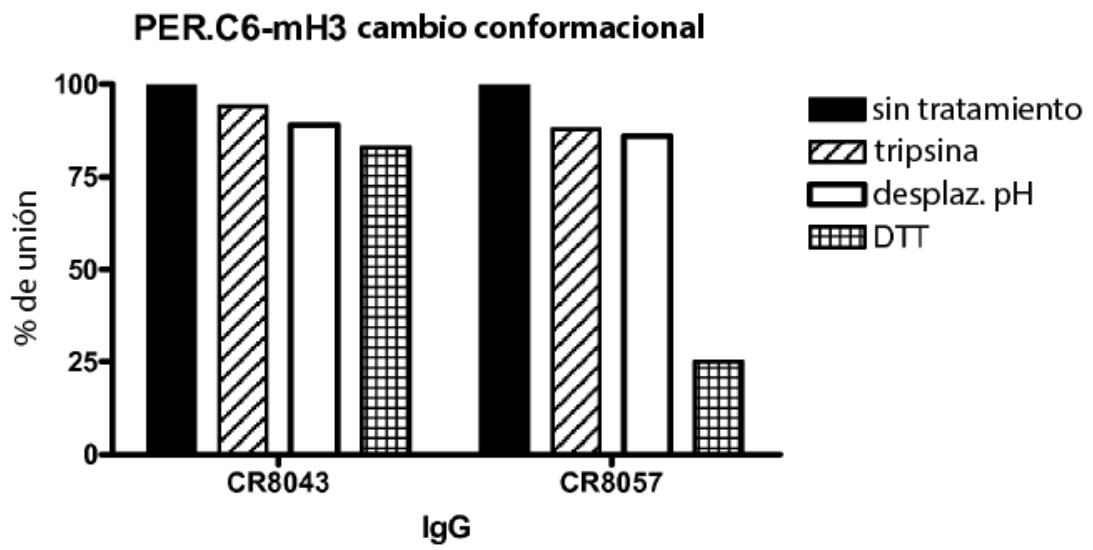
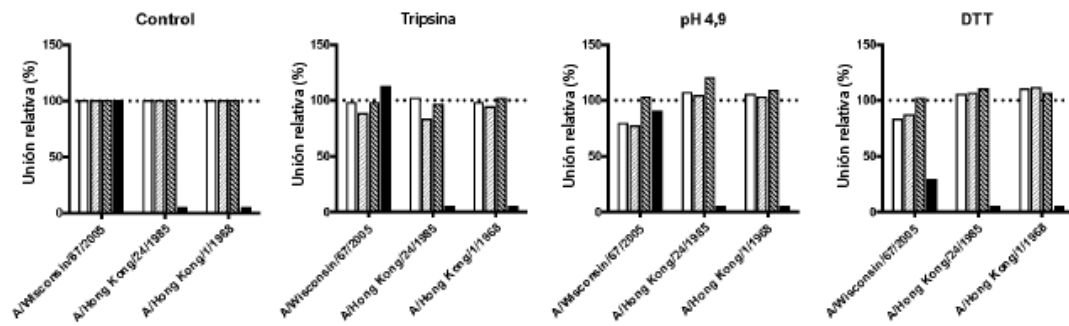
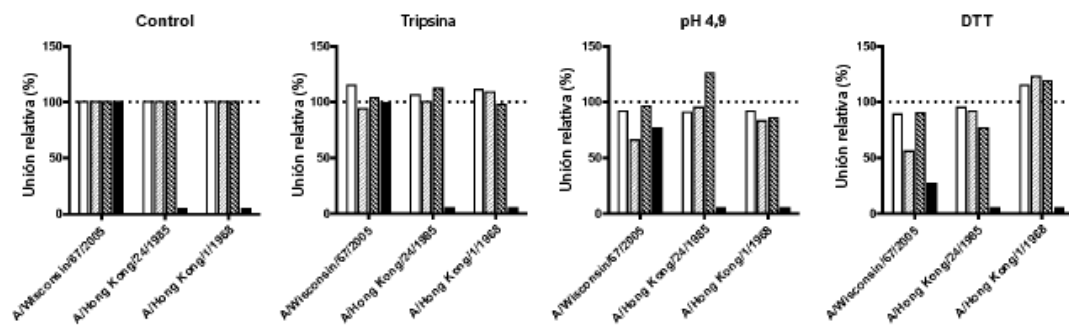


FIG. 8

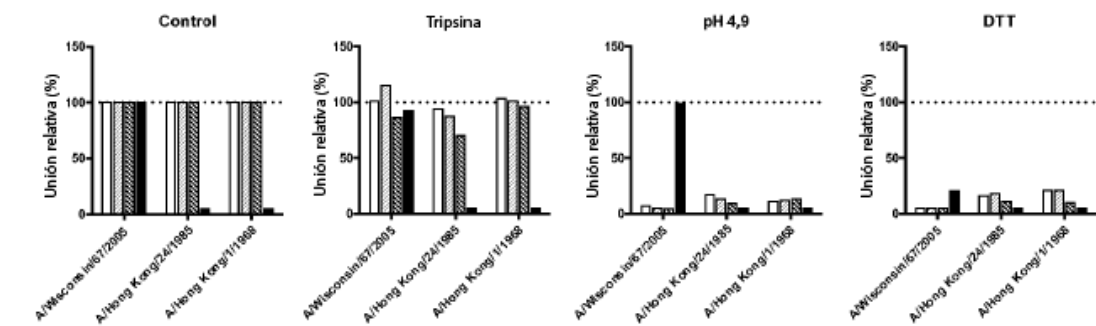
A.



B.



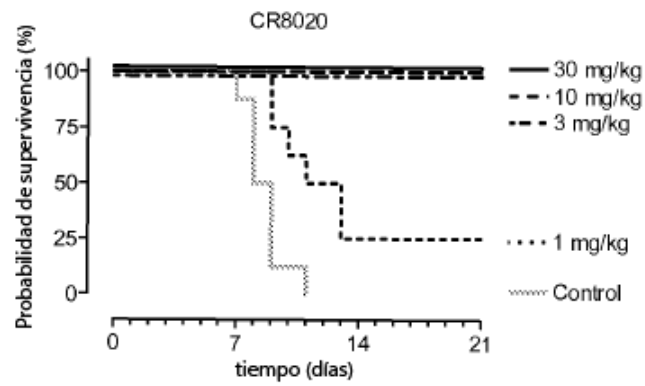
C.



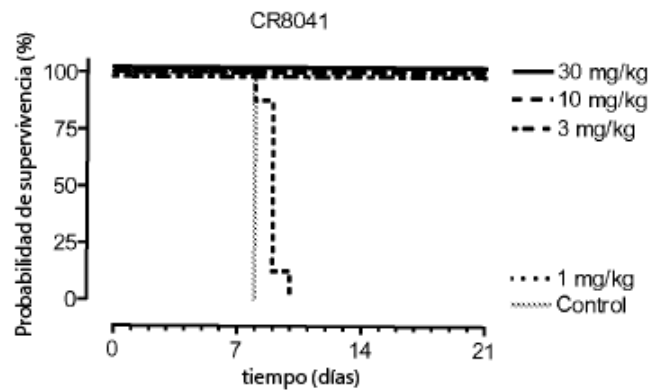
CR8020 CR8041 CR8043 CR8057

FIG. 9

A.



B.



C.

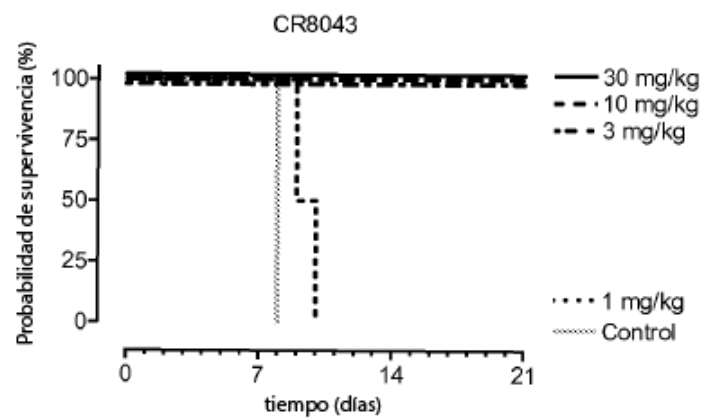
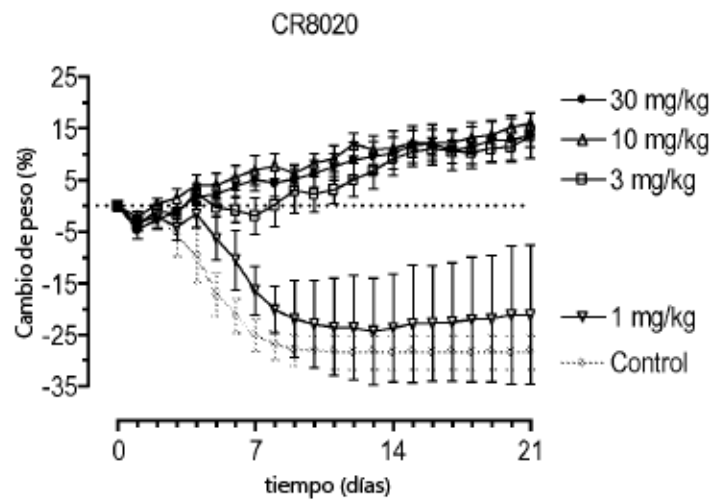
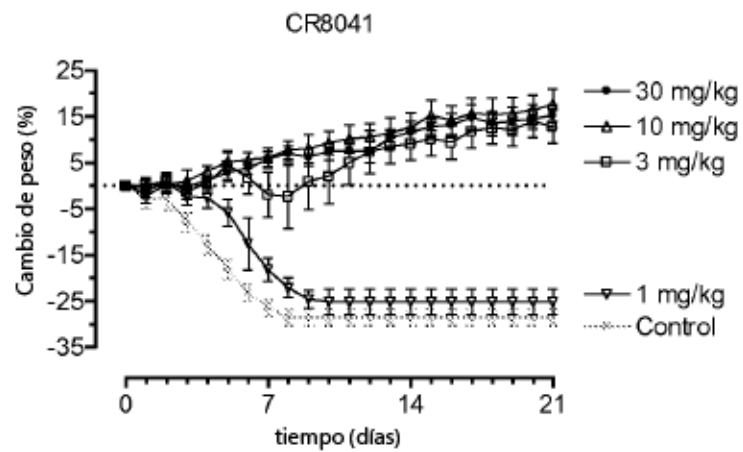


FIG. 10

A.



B.



C.

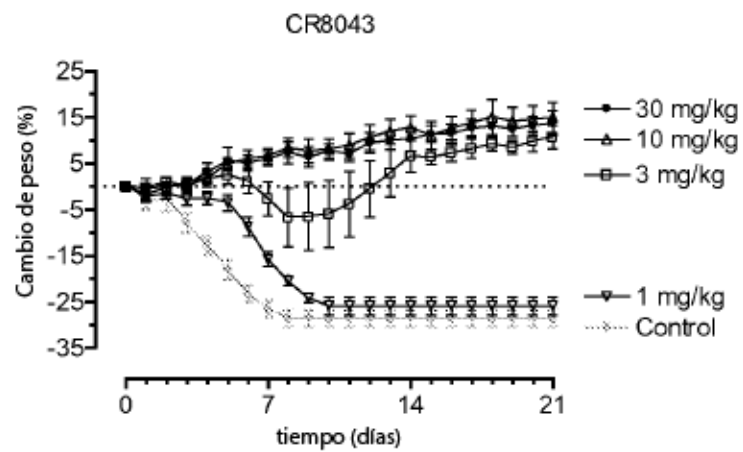
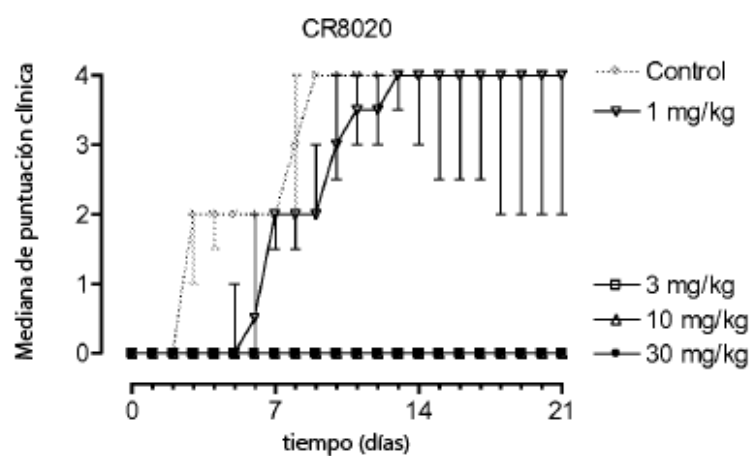
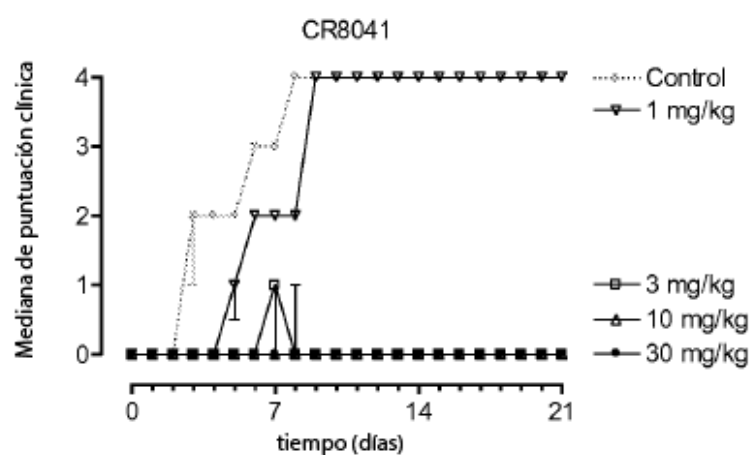


FIG. 11

A.



B.



C.

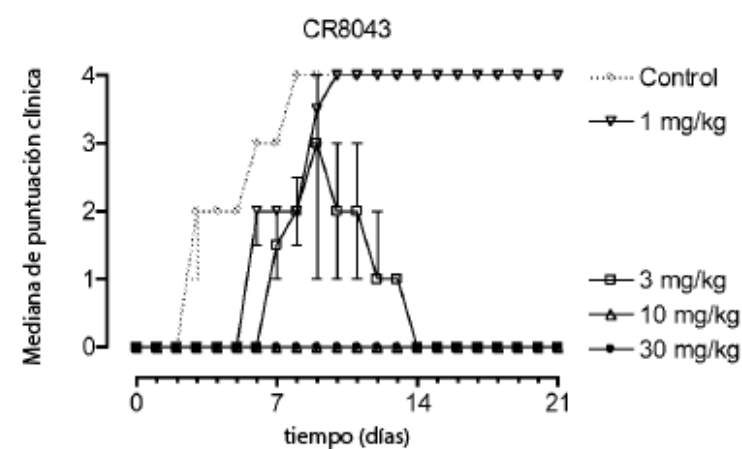
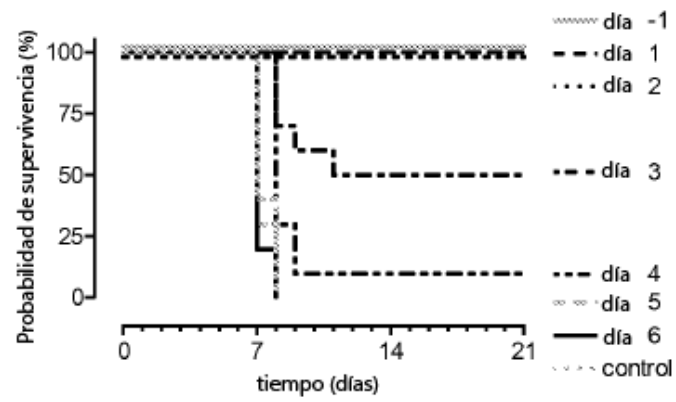
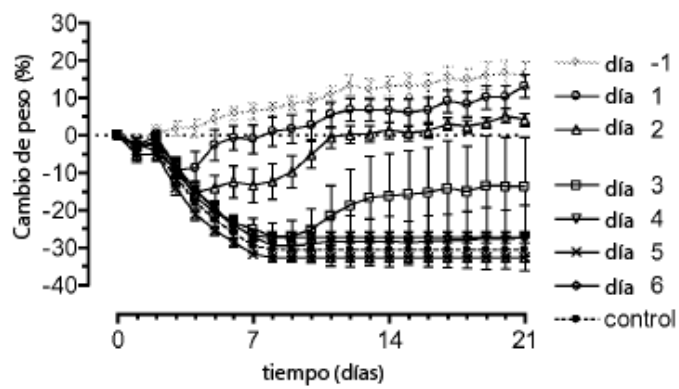


FIG. 12

A.



B.



C.

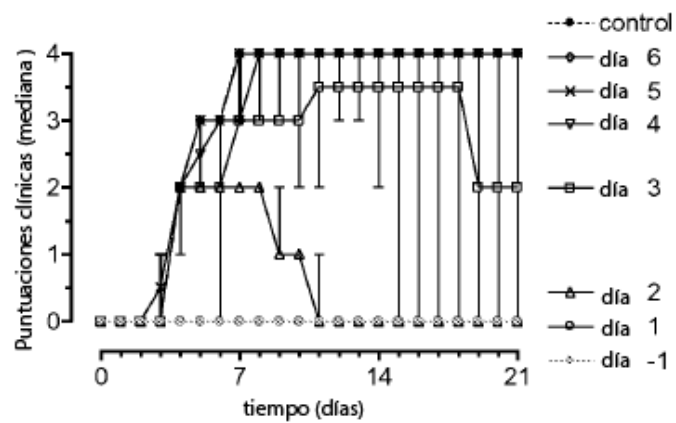
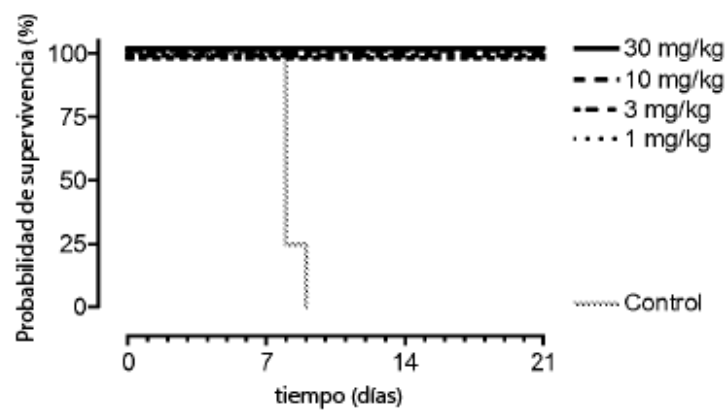
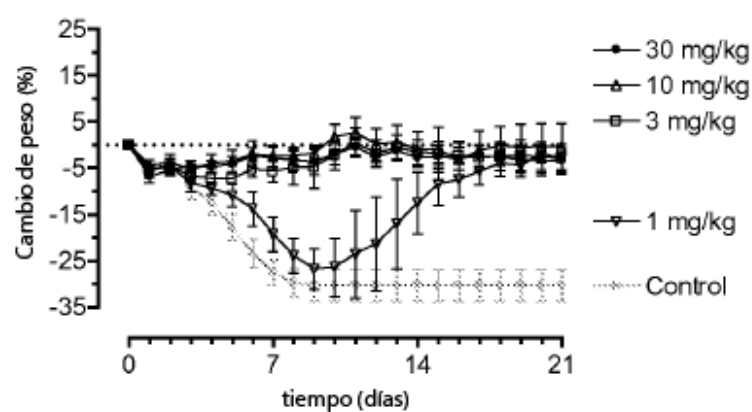


FIG. 13

A.



B.



C.

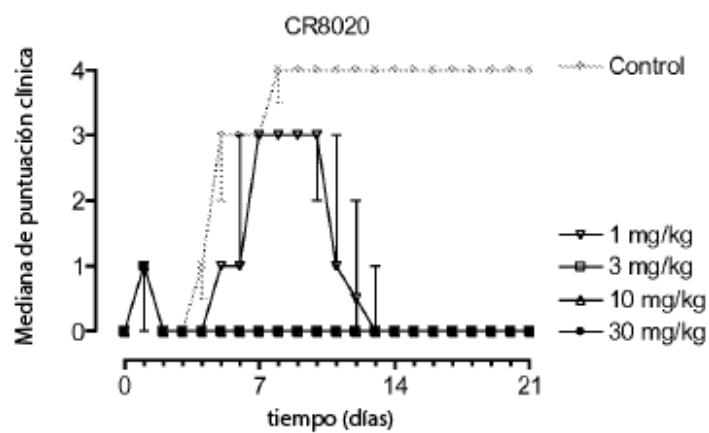
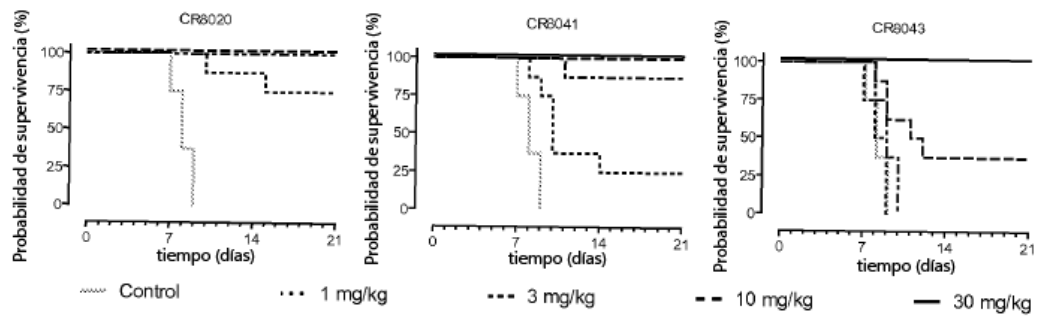
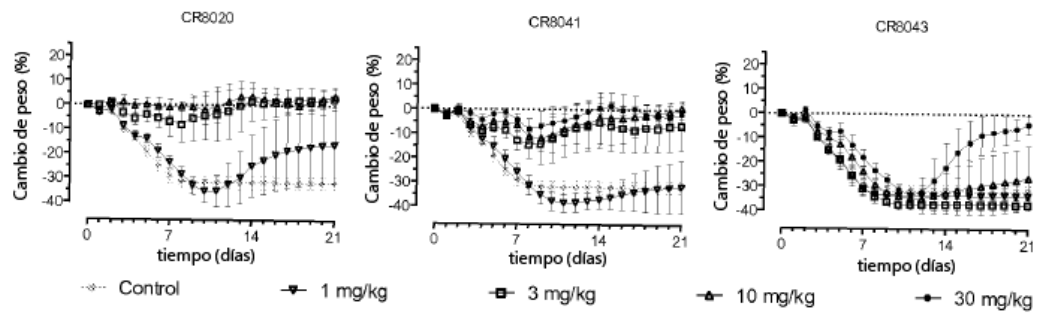


FIG. 14

A.



B.



C.

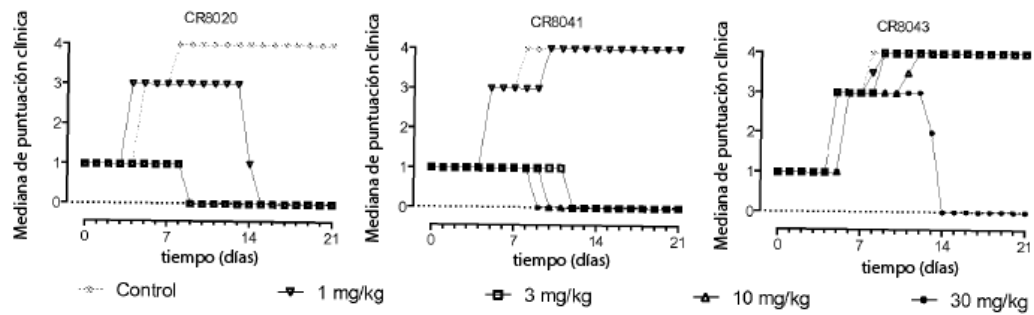
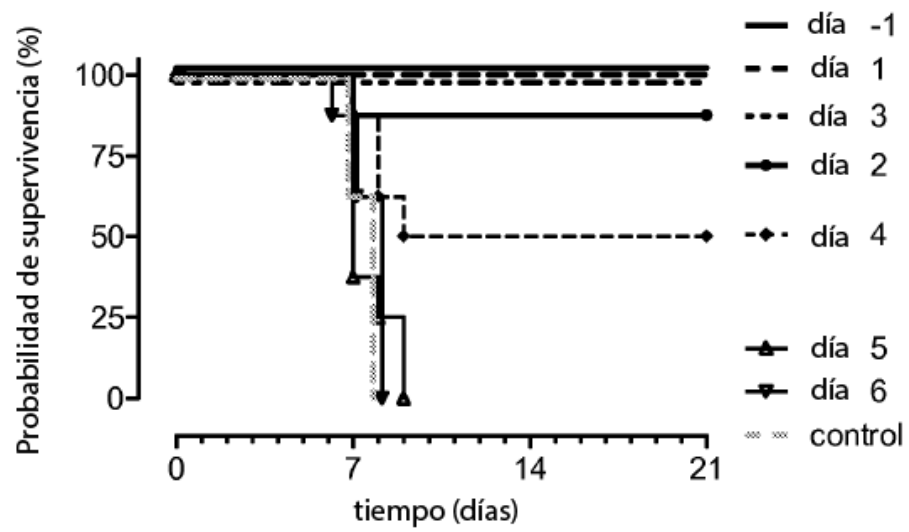


FIG. 15

A.



B.

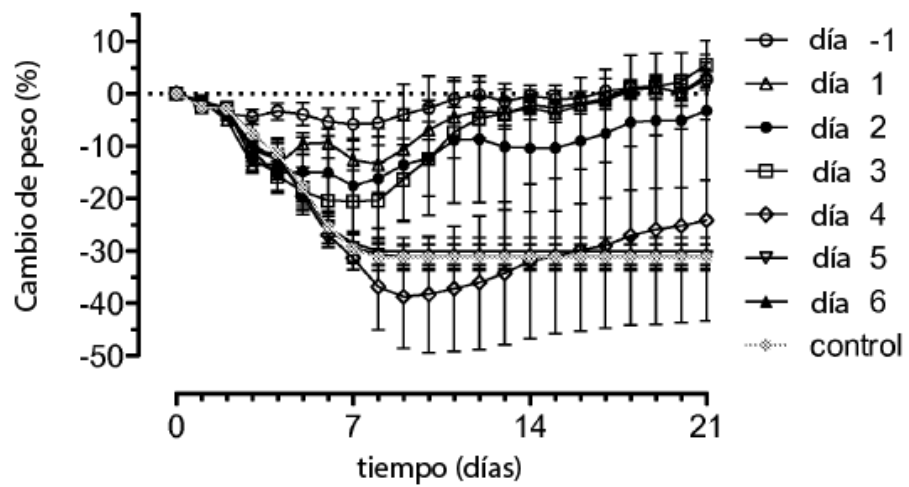


FIG. 16

C.

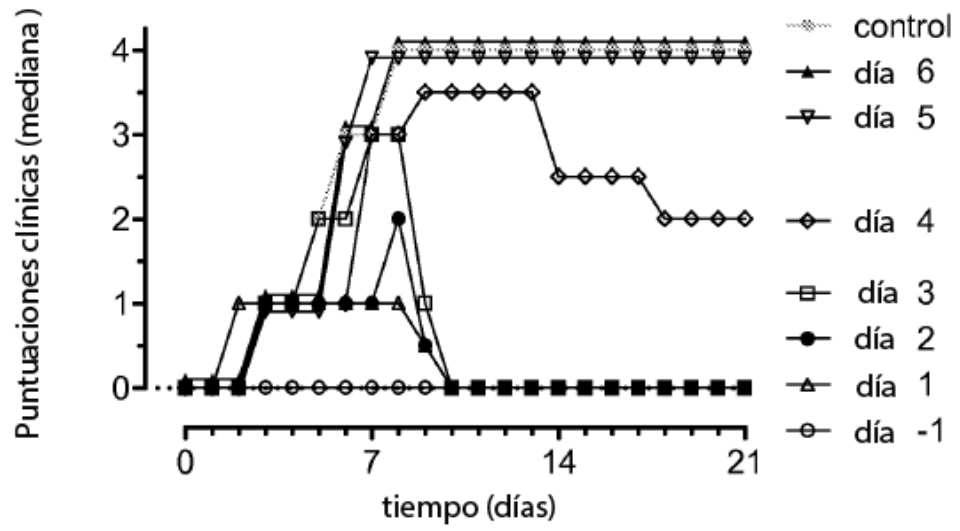


FIG. 16 (continuación)