

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 968**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C07K 16/14 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
C07K 16/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2009 PCT/IB2009/051068**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2009 WO09115972**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2009 E 09722394 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **27.07.2022 EP 2274335**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales capaces de reaccionar con una pluralidad de subtipos del virus de la influenza A**

30 Prioridad:
17.03.2008 IT TO20080204

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
22.11.2022

73 Titular/es:
POMONA RICERCA S.R.L. (100.0%)
Corso Einaudi 1
10128 Torino, IT

72 Inventor/es:
BURIONI, ROBERTO y
CLEMENTI, MASSIMO

74 Agente/Representante:
LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 544 968 T5

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales capaces de reaccionar con una pluralidad de subtipos del virus de la influenza A

- 5 En general, la presente invención pertenece al campo de la inmunología. Más específicamente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno HA (hemaglutinina) del virus de la influenza A.

Antecedentes de la invención

- 10 La epidemia anual del virus de la influenza representa una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. En los Estados Unidos de América se estima que más de 200,000 personas son hospitalizadas cada año por síndromes asociados con los virus de la influenza, y aproximadamente 40,000 muertes están relacionadas directamente con la misma (Thompson *et al.*, *JAMA*, 2003, 289:179-186). Aparte de estas cifras, también se deben considerar los casos, en números exponencialmente más altos, de sujetos infectados que permanecen en sus casas durante periodos más o menos largos, con repercusiones económicas inevitables debido a la pérdida de días de trabajo. Un estudio reciente (Molinari *et al.*, *Vaccine*, 2007, 25: 5086-5096) ha calculado que los costos médicos relacionados directamente con las epidemias anuales son de 10.4 billones de dólares estadounidenses al año, a los cuales se deben agregar 16.3 billones de dólares estadounidenses por los ingresos perdidos debido a la ausencia del trabajo. Si en el cálculo también se consideran otras cuestiones, tales como la monetización de las pérdidas económicas vinculadas con la muerte de los sujetos infectados, la cantidad se eleva a la increíble cifra de 87.1 billones de dólares estadounidenses. Estos datos económicos vinculados con las epidemias anuales, junto con el temor de una pandemia que pudiera ocurrir en cualquier momento en un futuro cercano debido a la aparición de virus de la influenza nuevos para el hombre, explican el considerable interés en la búsqueda de estrategias efectivas para contener la diseminación de estos virus.

- 25 Actualmente, la única herramienta disponible para enfrentar de alguna forma las epidemias anuales de influenza, es una vacuna trivalente desactivada que contiene antígenos virales aislados que presumiblemente serían responsables de la epidemia de la siguiente estación de influenza. Este tipo de predicción, basada en datos epidemiológicos vinculados con aislamientos tempranos en algunas zonas geográficas centinelas, no siempre resulta correcta. Por lo tanto, existe el riesgo considerable, que está presente cada año, de que la vacuna trivalente desarrollada para una cierta estación de influenza pudiera ser sustancialmente ineficaz.

- 30 En ese caso, así como también en el caso de una pandemia nueva, la única ayuda profiláctica/terapéutica disponible sería recurrir a las dos clases disponibles de fármacos antivirales: los inhibidores de la proteína M2 (amantadina y rimantadina), y los inhibidores de neuraminidasa (oseltamivir y zanamivir). Sin embargo, también en esta situación son de esperar una serie de problemas relacionados con la necesidad de administrar los antivirales en una etapa muy temprana de la infección, y la rápida aparición de aislados virales resistentes, que no obstante ya ha ocurrido.

- 40 Una estrategia alternativa eficaz se podría basar en preparaciones de anticuerpo neutralizante dirigidas contra proteínas virales críticas, capaces de reconocer porciones de estas proteínas que son compartidas por los diferentes aislados del virus de la influenza.

- 45 Para una mejor comprensión del potencial de un enfoque basado en la administración pasiva de anticuerpos, es útil mencionar brevemente las principales características estructurales de los virus de la influenza. Los virus de la influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* y se caracterizan por la presencia de una envoltura derivada de membranas celulares infectadas, sobre la cual están presentes aproximadamente 500 púas, también llamadas proyecciones. Estas proyecciones consisten en trímeros y tetrámeros de dos importantes proteínas de superficie viral: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). En la superficie de la envoltura también se encuentra una proteína de membrana integral (M2), dicha proteína está presente en cantidades mucho más bajas en comparación con la hemaglutinina y neuraminidasa, y también se organiza en tetrámeros.

- 50 Además, el virus de la influenza se caracteriza por la presencia, dentro del núcleo, de un genoma segmentado comprendido de 8 fragmentos de ARN de una sola cadena. Basándose en las características de algunas proteínas dentro del virión (NP y M1), son distinguibles tres tipos de virus de influenza: el tipo A, el tipo B y el tipo C.

- 55 Los virus del tipo A y del tipo B son responsables de las epidemias anuales. En cambio, los virus del tipo C son responsables de síndromes menos severos.

- 60 Dentro de los virus del tipo A (los únicos responsables de pandemias y capaces de ocasionar los síndromes más severos incluso durante las epidemias anuales), también son distinguibles diferentes subtipos por las características antigénicas de la hemaglutinina y neuraminidasa. Los subtipos que han afectado a los humanos en el curso de la historia reciente son los subtipos H1N1 y H3N2 (todavía en circulación actualmente y contenidos en preparaciones de vacuna), así como también el subtipo H2N2, fuera de circulación desde 1968 y responsable de la llamada gripe asiática en 1957. Otros subtipos han afectado esporádicamente a los humanos (H9N2, H7N7 y el reciente subtipo H5N1 tan temido), pero no han podido extenderse eficientemente y desplazar a los subtipos en circulación.

La función de las proteínas de superficie es esencial en el ciclo de duplicación viral. En particular, la hemaglutinina es la proteína que permite a los virus reconocer el ácido siálico presente sobre la superficie de algunas células e infectarlas. En cambio, la neuraminidasa opera al final del ciclo de duplicación viral, que es durante la liberación de partículas virales nuevas de las células infectadas. Su función es ayudar a la liberación de hemaglutinina de los viriones recién formados del ácido siálico presente en la superficie de la célula que los produjo. La función clave desempeñada por estas dos proteínas, así como su despliegue sobre la superficie del virus, explican porqué representan el blanco principal de la respuesta inmune, y porqué son susceptibles de una tasa de mutación elevada. De hecho, las epidemias anuales son causadas por virus que son más o menos diferentes de los virus de los años anteriores, y por lo tanto son capaces de escapar más o menos eficientemente de la respuesta inmune que estimulan. En otras palabras, la acumulación progresiva de mutaciones de punto en la hemaglutinina (principalmente) y neuraminidasa (secundariamente) hace a los anticuerpos protectores, producidos durante las epidemias previas, en general progresivamente ineficaces.

La función protectora principal de la respuesta inmune contra la influenza es desempeñada por el componente humoral. Los anticuerpos ejercen su función protectora obstaculizando la unión de la hemaglutinina al ácido siálico, impidiendo con ello la infección de las células. Esta presión selectiva determina la tasa de mutación elevada en la hemaglutinina. Estudios de secuencia realizados entre 1968 y 1999 sobre el subtipo H3 de hemaglutinina han revelado un total de 101 mutaciones de aminoácidos (en un total de aproximadamente 560 aminoácidos), con un promedio de aproximadamente 3.5 mutaciones por año. Sesenta por ciento de las mutaciones que ocurrieron en el periodo estudiado fueron retenidas en los virus en circulación también el año siguiente, lo que es indicativo de la persistencia de una presión selectiva mediada por la inmunidad. El 95% de estas mutaciones se encontraron en la subunidad de hemaglutinina HA1, que es la directamente implicada en la unión con el ácido siálico. Sin embargo, dentro de esta variabilidad elevada se han encontrado residuos de aminoácidos sin cambio, lo que es indicativo de su papel esencial en la función de la proteína. Estas porciones de hemaglutinina representan un blanco potencial para una respuesta neutralizante cruzada hacia los diferentes subtipos del virus de la influenza. Sin embargo, es predecible que tales regiones no serán capaces de inducir una respuesta de anticuerpo eficaz en la mayoría de los pacientes, pues el hecho de que tales blancos se ocultan en áreas inmunosilenciosas ha representado ciertamente un paso evolutivo muy favorable para el virus.

De hecho, al referirse a la inmunidad contra la influenza se deben tomar en cuenta tres tipos de inmunidad diferentes, que pueden ser bien entendidos a la luz de los datos arriba mencionados:

INMUNIDAD HOMÓLOGA: Relacionada con el aislado individual. Este tipo de inmunidad siempre se observa después de una infección o una vacunación, pero provee una protección muy limitada contra otros aislados.

INMUNIDAD HOMOSUBTIPO: Relacionada con los aislados que pertenecen al mismo subtipo. Este tipo de inmunidad se observa frecuentemente después de una infección o vacunación, pero se pierde cuando la tasa de mutación de la hemaglutinina o neuraminidasa aumenta considerablemente.

INMUNIDAD HETEROSUBTIPO: Relacionada con aislados que pertenecen a diferentes subtipos. Este tipo de inmunidad es muy rara tanto en el caso de infección natural como en el caso de vacunación. Desde un punto de vista estratégico, esta es la inmunidad más importante, ya que su presencia y estimulación sería equivalente a la resistencia a la infección por todo tipo de virus de influenza A.

Hasta hace algunos años se pensó que la inmunidad heterosubtipo podía lograrse solo estimulando eficientemente los componentes de la inmunidad celular dirigidos contra proteínas virales menos mutadas, tales como por ejemplo la proteína NP que constituye su núcleo. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que ratones con agotamiento de linfocitos CD8 todavía son capaces de presentar una inmunidad heterosubtipo, a diferencia de los ratones con agotamiento de linfocitos de tipo B (Nguyen HH, *J. Inf. Dis.*, 2001, 183: 368-376). Un estudio más reciente ha confirmado estos datos, destacando la función crucial de los anticuerpos, incluso no neutralizantes, dirigidos precisamente contra epítopes que están conservados entre los diferentes subtipos (Rangel-Moreno *et al.*, *The J. of Immunol*, 2008, 180: 454-463).

El documento WO 02/46235 A describe el AcM humano FAL112C3 que se une a H1N1 y H3N2 en un ensayo ELISA pero no protege *in vivo*.

El documento WO 2007/134327 A menciona AcM neutralizadores humanos contra varios subtipos del virus de la influenza A pero no los divulga de manera activable.

El documento EP 0675199 A describe AcM murinos que se unen a los subtipos H1N1 y H2N2 del virus de la influenza A y los neutralizan. Sin embargo, estos AcM no se unen al subtipo H3 ni lo neutralizan.

Objetivo de la invención

Basándose en los datos anteriormente reportados, un objetivo de la presente invención es proveer un anticuerpo monoclonal humano reactivo contra los diferentes subtipos del virus de la influenza A.

Otro objetivo de la presente invención es proveer un anticuerpo monoclonal humano con actividad neutralizante dirigida a múltiples subtipos del virus de la influenza A.

5 Tal anticuerpo sería un medio efectivo de prevención administrado a los pacientes en riesgo. Además, el uso de un anticuerpo monoclonal humano en pacientes humanos daría una ventaja adicional, ya que indudablemente el anticuerpo sería bien tolerado.

10 En segundo lugar, al constituir un componente de la respuesta de anticuerpo humano a este virus, el anticuerpo monoclonal de las características anteriormente descritas representaría un factor clave para el diseño de vacunas innovadoras, capaces de inducir una inmunidad mucho más eficaz, protectora y de amplio espectro, en comparación con la inducida por las vacunas usadas actualmente.

15 Sin embargo, hasta ahora la obtención de anticuerpos monoclonales con tales propiedades ha sido muy difícil.

La solicitud de patente internacional WO 2007/134327, expedida el 22 de noviembre de 2007, describe fragmentos Fab capaces, en pruebas ELISA, de unirse al antígeno HA de varios aislados del virus de la influenza A, subtipo H5. Sin embargo, esta solicitud de patente no provee una descripción practicable de anticuerpos capaces de reconocer aislados que pertenecen a diferentes subtipos del virus de la influenza A, ni describe una forma practicable de obtener los anticuerpos con capacidad neutralizante real contra virus de influenza A que pertenecen a diferentes subtipos.

20 Por lo tanto, a pesar de que durante mucho tiempo se ha buscado un anticuerpo monoclonal con capacidad para reconocer y neutralizar los diferentes subtipos del virus de la influenza A, tal búsqueda ha sido infructuosa hasta ahora.

Descripción de la invención

30 Los presentes inventores, sorprendentemente, han tenido éxito en la provisión de un anticuerpo monoclonal con las características deseables anteriormente mencionadas.

De esta manera, un primer objeto de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra el antígeno hemaglutinina del virus de la influenza A, caracterizado porque es capaz de unirse a múltiples subtipos del virus de la influenza A y neutralizarlos, en donde dicha pluralidad de subtipos comprende, al menos, un subtipo del virus de la influenza A que contiene hemaglutinina H1 y, al menos, un subtipo del virus de la influenza A que contiene hemaglutinina H3 de acuerdo con las reivindicaciones.

40 La obtención de un anticuerpo monoclonal humano de acuerdo con la invención y sus propiedades de unión se describen detalladamente en la siguiente sección experimental.

En la siguiente sección experimental se describe específicamente la obtención de 6 clones (denominados INF4, INF16, INF28, INF39, INF43 e INF47), capaces de producir anticuerpos monoclonales en forma de fragmentos Fab con la capacidad de unirse *in vitro* a múltiples subtipos del virus de la influenza A.

45 El anticuerpo monoclonal producido por el clon INF28 (denominado Fab28) representa la invención, ya que los inventores han probado experimentalmente que este anticuerpo presenta una actividad neutralizante contra múltiples subtipos del virus de la influenza A. Para efectos de brevedad, tal propiedad inmunológica será referida algunas veces como "actividad neutralizante cruzada de heterosubtipo".

50 El anticuerpo Fab28 se caracteriza por un dominio variable de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un dominio variable de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. La secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de cadena pesada es la SEQ ID NO: 3, y la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de cadena ligera es la SEQ ID NO: 4.

55 En particular, la sección experimental describe la fabricación del anticuerpo monoclonal de la invención como fragmentos Fab. Sin embargo, también se consideran parte del alcance de la invención otras formas de anticuerpo y la fabricación y uso de las mismas. Ejemplos no limitativos son inmunoglobulinas completas u otros tipos de fragmentos de anticuerpo, tales como por ejemplo fragmentos F(ab')₂ o fragmentos de anticuerpo más pequeños que los Fab's, o péptidos que tienen las mismas propiedades inmunológicas que las mostradas experimentalmente para el Fab de la invención.

60 Se pueden construir anticuerpos de una sola cadena de acuerdo con el método descrito en la patente de EE. UU. No. 4,946,778, de Ladner *et al.*, incluida aquí como referencia. Los anticuerpos de una sola cadena comprenden las regiones variables de cadena ligera y pesada unidas por un enlazador flexible. El fragmento de anticuerpo diseñado como anticuerpo de un solo dominio es aún más pequeño que el anticuerpo de una sola cadena, ya que solo comprende un dominio VH aislado. En el arte previo se describen técnicas para obtener anticuerpos de un solo

dominio que tienen, por lo menos parcialmente, la misma capacidad de unión que el anticuerpo completo. Ward, *et al.*, en "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from *Escheria coli*", *Nature* 341:644-646, describen un método de examen y selección para obtener la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo (anticuerpo de un solo dominio VH), con una afinidad suficiente por el epítipo objetivo para unirse al mismo en una forma aislada.

En la descripción que sigue, el término "anticuerpo" se usará para referirse a todas las modalidades anteriormente mencionadas, incluso inmunoglobulinas completas, fragmentos Fab u otros tipos de fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos de un solo dominio, etc.

El anticuerpo monoclonal de la invención se puede generar y usar en forma libre o en forma conjugada con vehículo. Un vehículo es cualquier molécula u entidad química o biológica capaz de conjugarse con un anticuerpo y hacerlo inmunogénico o aumentar su inmunogenicidad. Ejemplos no limitativos de vehículos son las proteínas tales como KLH (hemocianina de lapa), edestina, tiroglobulina, albúminas como albúmina de suero bovina (BSA) o albúmina de suero humana (HSA), eritrocitos como eritrocitos de oveja (SRBC), anatoxina de tétano, anatoxina de cólera, poliaminoácidos tales como por ejemplo poli(D-lisina – ácido D-glutámico), etcétera. Para facilitar la unión del anticuerpo al vehículo, el extremo C o el extremo N del anticuerpo se pueden modificar, por ejemplo, por inserción de residuos de aminoácido adicionales, por ejemplo uno o más residuos de cisteína que son capaces de formar puentes disulfuro.

Debido a sus propiedades, que se mostrarán detalladamente más abajo en la sección experimental, el anticuerpo monoclonal de la invención (especialmente el anticuerpo Fab28) es particularmente adecuado para usarse en aplicaciones médicas, particularmente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de amplio espectro de infecciones del virus de la influenza A.

De esta manera, está dentro del alcance de la invención el anticuerpo monoclonal de la invención, el anticuerpo Fab28, para usarlo en el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades causadas por infecciones del virus de la influenza A, tales como por ejemplo el síndrome de influenza.

En este contexto también, la expresión "anticuerpo Fab28" no solo incluye los fragmentos Fab sino que también cualquier otra forma en la que se pueda preparar el anticuerpo, por ejemplo inmunoglobulinas completas, otros tipos de fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de una sola cadena, etc.

Como se describe en detalle en la sección experimental, el anticuerpo monoclonal se ha obtenido mediante técnicas de biología molecular empezando con un linfocito transformado con EBV capaz de producir anticuerpos monoclonales de reactividad cruzada, y por lo tanto capaces de reconocer lisados de células MDCK infectadas con los dos aislados de referencia, como se indica en esta descripción más abajo, que pertenecen a diferentes subtipos del virus de la influenza A: H1N1, cepa A/PR/8/34, y H3N2, cepa A/PC/1/73. En la sección experimental se describen los procedimientos específicos usados para generar las líneas de células B transformadas de sangre periférica de los pacientes.

Además, en la sección experimental se describen los procedimientos usados para clonar los genes que codifican las porciones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos Fab28 de la invención, y también los procedimientos para producirlos por recombinación, como péptidos individuales y como fragmentos Fab.

La capacidad del anticuerpo monoclonal de la invención para reaccionar con lisados celulares infectados con diferentes subtipos del virus de la influenza A fue verificada por medio de ELISA e inmunofluorescencia. Además, se hizo una prueba de neutralización para verificar la actividad biológica *in vitro* de los anticuerpos. En esta prueba, el anticuerpo Fab28 mostró una actividad neutralizante cruzada de heterosubtipo contra los aislados virales de tipo A de referencia como se indicó arriba.

Los datos obtenidos sugieren que el anticuerpo de la invención, el anticuerpo Fab28, es muy eficaz para conferir inmunidad pasiva contra el virus de la influenza A a los sujetos a los que se les administra, y que consecuentemente es particularmente útil en el tratamiento profiláctico o terapéutico de un amplio espectro de infecciones del virus de la influenza A, o enfermedades causadas directa o indirectamente por infección por el virus de la influenza A. Un ejemplo de dichas enfermedades es el síndrome de influenza.

Además, en la sección experimental se describe la identificación del epítipo conformacional de hemaglutinina al que se une Fab28. Tal epítipo conformacional está entre la región HA1 y la región HA2 de hemaglutinina, e incluye los residuos W357 y T358 de la región HA2, y los residuos N336, I337 y P338 de la región HA1. La numeración de los residuos se basa en la secuencia de hemaglutinina del aislado H1N1/A/PR/8/34 de la base de datos BLAST (SEQ ID NO: 5).

Así, un objeto adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal de la invención como ingrediente activo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Una cantidad efectiva es aquella que es capaz de inducir un efecto favorable en el sujeto al que se le

administra la composición, por ejemplo, para neutralizar el virus de la influenza A o para alterar la duplicación del virus.

5 En este contexto, el término “sujeto” designa cualquier animal hospedero al que se le puede administrar la composición, incluso los humanos.

10 Ejemplos no limitativos de vehículos o diluentes farmacéuticamente aceptables útiles para la composición farmacéutica de la invención, incluyen estabilizadores como SPGA, carbohidratos (por ejemplo sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas como albúmina o caseína, agentes que contienen proteína tales como suero bovino o leche descremada, y amortiguadores (por ejemplo amortiguador de fosfatos).

15 El anticuerpo monoclonal de la invención también se puede usar convenientemente como reactivos diagnósticos en un método *in vitro* para detectar anticuerpos contra el virus de la influenza A con propiedades neutralizantes idénticas o similares, en una muestra biológica de un paciente obtenida previamente (tal como por ejemplo una muestra de suero, plasma, sangre, o cualquier otro material biológico adecuado).

20 Los “anticuerpos contra el virus de la influenza A con propiedades neutralizantes idénticas o similares” son anticuerpos que presentan una actividad neutralizante cruzada de heterosubtipo contra el virus de la influenza A. Estos anticuerpos se pueden encontrar en la muestra biológica del paciente como resultado de una exposición previa a un virus de la influenza A, o porque al paciente se le ha administrado previamente un anticuerpo monoclonal de la invención para fines terapéuticos o profilácticos o de investigación.

25 De esta manera, dentro del alcance de la invención está incluido un método de prueba para detectar en una muestra biológica de un paciente la presencia de anticuerpos contra el virus de la influenza A que tienen una actividad neutralizante cruzada de heterosubtipo, que comprende poner en contacto dicha muestra biológica con el anticuerpo monoclonal de la invención, como reactivo de prueba específico.

30 La prueba puede ser cualitativa o cuantitativa. La detección o cuantificación de anticuerpos contra el virus de la influenza A que tienen una actividad neutralizante cruzada de heterosubtipo se puede efectuar, por ejemplo, por medio de una prueba de ELISA competitiva. De esta manera, también está dentro del alcance de la invención un kit diagnóstico que comprende el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención como reactivo específico, dicho kit diseñado particularmente para la detección o cuantificación de anticuerpos contra el virus de la influenza A que tienen una actividad neutralizante cruzada de heterosubtipo contra el virus de la influenza A, en una muestra biológica derivada de un paciente.

35 Similarmente, el anticuerpo monoclonal de la invención (el anticuerpo Fab28) se puede usar como reactivos específicos en un método de prueba para detectar o cuantificar, en una composición inmunogénica o de vacuna previamente preparada, epítopes capaces de provocar en un sujeto, al que se le administre dicha composición, anticuerpos contra el virus de la influenza A que tienen propiedades neutralizantes idénticas o similares a las del anticuerpo monoclonal de la invención, que es una actividad neutralizante cruzada de heterosubtipo contra el virus de la influenza A.

45 Se prevé que dicho método será útil para la valoración de cualquier preparado que se va a utilizar como vacuna o preparado inmunogénico, ya que el reconocimiento por parte del anticuerpo monoclonal de la invención sería indicativo de la presencia, en el preparado inmunogénico o vacuna, de uno o más epítopes capaces de estimular la producción de clones de anticuerpo capaces de reconocer un epítope conveniente, tal como por ejemplo un epítope capaz de provocar inmunidad heterosubtipo contra el virus de la influenza A.

50 La siguiente sección experimental se provee únicamente a manera de ilustración y no de limitación, y se considera que no restringe el alcance de la invención definida en las reivindicaciones anexas. Las reivindicaciones son una parte integral de la descripción.

Sección experimental

55 1. Selección de pacientes

60 Los pacientes incluidos en el estudio fueron seleccionados a fin de aumentar la probabilidad de clonar anticuerpos de reactividad cruzada contra la influenza, esto es, anticuerpos capaces de reconocer, y posiblemente de neutralizar, los aislados del virus de la influenza que pertenecen a diferentes subtipos. En particular, se describe que algunos individuos, a pesar de una exposición continua al virus de la influenza (algunas veces por razones profesionales, como médicos, pediatras, personas que trabajan en guarderías y escuelas), no contraen la enfermedad. Se piensa que estos individuos raros son menos susceptibles a la infección por el virus de la influenza debido al desarrollo de una inmunidad heterosubtipo eficaz, por razones todavía desconocidas. Por esta razón, se piensa que ellos son los mejores candidatos para la generación de anticuerpos monoclonales humanos. En particular, se siguieron los siguientes criterios de inclusión:

ES 2 544 968 T5

- entre 25 y 55 años de edad;

- historia clínica reciente negativa a síndromes clínicos de influenza durante diez años previos al estudio;

5 - título de anticuerpo mayor de 1:1000 contra aislados del virus de los subtipos H1N1 y H3N2, responsables de las epidemias anuales, durante cinco años previos al estudio;

- título de neutralización alto ($CI_{50} \geq 1:400$) contra aislados de virus de los subtipos H1N1 y H3N2, responsables de las epidemias anuales, durante cinco años previos al estudio;

10 - título de neutralización detectable ($CI_{50} > 1:20$) contra dos aislados de referencia del virus de subtipo A (A/PR/8/34 subtipo H1N1; A/PC/1/73 subtipo H3N2).

- sin vacunación previa contra la influenza;

15 - de acuerdo en recibir vacunación contra la influenza.

En el momento de la vacunación y aproximadamente 3 semanas después de la vacunación se extrajeron aproximadamente 20 ml de sangre de cada paciente en tubos de ensayo heparinizados.

20 2. Cultivo de los aislados del virus de referencia

Como línea celular se usaron células MDCK (células de riñón canino de Madin-Darby) (ATCC® No. CCL-34TM), propagadas en medio de Eagle modificado (MEM) (GIBCO), suplementado con 10% de suero bovino fetal desactivado (FBS) (tratado a 56°C durante 30 minutos) (EuroClone), 50 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin (GIBCO) y 2 mM de L-glutamina (EuroClone). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y se pasaron en una relación de 1:3 dos veces a la semana. Para los experimentos descritos en esta solicitud de patente se usaron los siguientes aislados del virus de influenza: H1N1, cepa A/PR/8/34 (ATCC® No. VR-1469TM); H3N2, cepa A/PC/1/73 (ATCC® No. VR-810), y la cepa B/Lee/40 (ATCC® No. VR-101). Para el crecimiento del virus se usó el medio de cultivo MEM suplementado con 1 µg/ml de tripsina libre de suero (SIGMA). Las reservas de virus se obtuvieron del sobrenadante del cultivo como virus extracelulares. Brevemente, después de infectar las células, la monocapa se observó diariamente para monitorear la aparición de un efecto citopático. El sobrenadante se recogió generalmente 4 días después de la infección; se centrifugó a 1000 RCF (fuerza centrífuga relativa) durante 10 minutos para eliminar los desechos celulares, y el producto se filtró con filtros de 0.22 µm (MILLIPORE). Después, el sobrenadante se dividió en alícuotas y se guardó a -80 °C como virus libres de células.

3. Selección de anticuerpos monoclonales contra el virus de la influenza de linfocitos B de sangre periférica

La producción de anticuerpos monoclonales de pacientes se hizo usando un método de transformación por infección de linfocitos B con el virus de Epstein-Barr (EBV), descrito previamente por Cole *et al*, 1984 *Cancer Research* 22:2750-2753. El sobrenadante de diferentes clones obtenidos se analizó por medio de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos. Luego, los clones capaces de producir anticuerpos de IgG en el sobrenadante que son capaces de reaccionar en la ELISA contra los lisados celulares infectados con los dos aislados de referencia, los subtipos H1N1 y H3N2, fueron seleccionados para una caracterización subsiguiente. En particular, las células MDCK se infectaron con los aislados anteriormente mencionados, a una multiplicidad de infección alta. Aproximadamente 48 horas después de la infección, las células se despegaron del matraz y se lavaron dos veces en PBS. Después, las pellas celulares se suspendieron en 300 µl de solución de lisis (100 mM de NaCl, 100 mM de Tris, pH 8, y 0.5% de Triton-X), y se guardaron en hielo durante 20 minutos. Los desechos celulares se centrifugaron a 10000 g durante 5 minutos y el sobrenadante se guardó a -20 °C como un extracto de proteína. En cuanto a la preparación del antígeno de control, las células no infectadas se trataron de la misma forma. La concentración de proteína del sobrenadante se determinó por duplicado usando el kit de prueba de proteína BCA™ (Pierce). Brevemente, la dosis de proteína de la muestra se determinó tomando como referencia una curva patrón obtenida por medio de una serie de diluciones de albúmina de suero bovina (BSA) de concentración conocida. La absorbancia de cada muestra se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Los lisados así obtenidos se usaron entonces (300 ng por pocillo) para cubrir una placa de ELISA (COSTAR) que se incubó a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, la placa se lavó con agua destilada y se bloqueó con PBS /BSA 1% (Sigma) durante 45 minutos a 37 °C. Después, 40 µl de sobrenadante de cada clon se agregaron a cada pocillo, que se incubó 1 hora a 37 °C. Después de 5 lavados (WASHER ETI-SYSTEM, DiaSorin) con PBS /0.5% de Tween 20 (Sigma), se agregaron a cada pocillo 40 µl de anti-Fc humano conjugado con peroxidasa (1:4000 en PBS /1% de BSA, Sigma), y la placa se incubó 1 hora a 37 °C. Después de 5 lavados más con PBS /0.5% de Tween 20, se agregaron a cada pocillo 40 µl de sustrato de peroxidasa TMB (Pierce). Aproximadamente 15 minutos después se bloqueó la actividad enzimática agregando 40 µl de H₂SO₄, y la señal se midió en un espectrofotómetro a 450 nm. Se puso atención especial al sobrenadante de seis clones putativos capaces de producir anticuerpos de reactividad cruzada (denominados cINF4, cINF16, cINF28, cINF39, cINF43 y cINF47, respectivamente), esto es, capaces de reconocer lisados celulares tanto infectados con la cepa que pertenece al subtipo H1N1 como los infectados con la cepa que pertenece al subtipo H3N2.

4. Preparación de los fragmentos Fab de clones de reactividad cruzada

5 Los genes que codifican las cadenas de Fab monovalentes capaces de reaccionar con los virus de la influenza se clonaron en un vector de expresión eucariótico. Esto permite evitar problemas debido a la inestabilidad de los clones de células productoras de anticuerpo, para caracterizar mejor los genes codificadores desde un punto de vista molecular, para tener disponibles moléculas que son indudablemente monoclonales, así como también mayores cantidades de cada anticuerpo individual.

10 El ARN mensajero (ARNm) se extrajo de los clones cultivados y se transcribió inversamente usando oligo-dT de acuerdo con los métodos conocidos *per se*. Los ADNc's que codifican la cadena ligera y el fragmento Fd (esto es, la porción de cadena pesada presente dentro del fragmento Fab), fueron entonces amplificados mediante los métodos descritos (CSH Press, "Phage display manual", ed. D.R.Burton, p. A1.6). Luego, los ADNc's así obtenidos se clonaron en un vector de expresión conocido *per se* denominado pCb3/CAF (Burioni *et al*, *J. Imm. Meth*, 1988).
15 Brevemente, el gen (ADN amplificado) que codifica la porción Fd de cadena pesada de cada Fab, se digirió con las enzimas de restricción XhoI y SpeI (Roche) durante 1.5 horas a 37 °C, y subsiguientemente se insertó en el sitio de clonación del vector para cadenas pesadas, a su vez digeridas con las mismas enzimas. En cambio, las cadenas ligeras (ADN amplificado) se digirieron con las enzimas SacI y XbaI (Roche) y se clonaron en el vector digerido similarmente.

20 Las construcciones recombinantes así obtenidas de cada clon se usaron para electrotransformación en la cepa XL1Blue de *E. coli* (hecha competente mediante lavados fríos en glicerol), de acuerdo con los protocolos estandarizados para el uso de cubetas de 0.2 cm (Voltaje: 2500 V; Capacitancia: 25 µF; Resistencia: 200 Ω). En paralelo, se analizaron las secuencias de ADN de la parte variable de cadena ligera y la parte variable de cadena pesada de los clones seleccionados. Las secuencias son las provistas en el listado de secuencias. El análisis molecular del patrón mutacional mostró una imagen atribuible a procesos de mutación somática inducidos por antígeno para cada uno de los clones.

5. Análisis de ELISA de los Fab's monoclonales obtenidos por clonación en PCb3/CAF

30 Al terminarse la clonación, se analizaron 40 clones bacterianos recombinantes para cada anticuerpo monoclonal por medio de ELISA, usando lisados crudos de cultivos bacterianos obtenidos por choque de calor. En particular, clones de bacterias transformadas con la construcción PCb3/CAF se inocularon en 10 ml de medio SB que contenía ampicilina y tetraciclina a 50 µg/ml y 10 µg/ml, respectivamente, y se desarrollaron bajo agitación a 37 °C hasta alcanzar una DO 600 = 1. Subsiguientemente se les agregó un inductor específico (IPTG – isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM, y el cultivo se dejó agitando a 30 °C durante la noche. Las células se lisaron por choque de calor (3 rondas de congelación/descongelación, a -80 °C y 37 °C, respectivamente), y después se centrifugaron para separar los desechos celulares del sobrenadante que contiene el Fab. Los Fab's solubles obtenidos se analizaron por medio de ELISA. Se cubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) con lisados de células infectadas con los aislados de virus de referencia anteriormente mencionados. Los lisados obtenidos de células no infectadas se usaron como control negativo. Las placas de ELISA cubiertas con 300 ng de los lisados obtenidos como se describe se dejaron entonces a 4 °C durante la noche. El siguiente día, después de quitar el antígeno no unido, las placas se lavaron 5 veces con PBS y los sitios de unión inespecífica se bloquearon con albúmina al 3% en PBS durante 1 hora a 37 °C. Después de quitar la solución bloqueadora, se les agregaron los sobrenadantes de los cultivos celulares tratados como se describe arriba y que contienen los Fab's solubles, seguido por un paso de incubación a 37 °C durante 2 horas. Después de 10 ciclos de lavado con PBS /0.05% de Tween 20, se agregaron 40 µl de una dilución 1:700 de un preparado policlonal de inmunoglobulinas anti-Fab humano de cabra conjugadas con peroxidasa de rábano (Sigma) en PBS /1% de BSA. Después de 1 hora de incubación a 37 °C y una serie adicional de 10 lavados, se agregó el substrato (OPD-o-fenilendiamina) a los pocillos. Después, las placas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se desactivó con ácido sulfúrico 1N y la densidad óptica se determinó por lectura espectrofotométrica a 450 nm. Todos los clones probados mostraron reactividad contra los lisados obtenidos de las células infectadas. Así, para cada uno de los monoclonales de reactividad cruzada, fue seleccionado un clon bacteriano transformado con un vector de expresión que contiene un par de genes que codifican la cadena ligera de un anticuerpo humano y el fragmento Fd de cadena pesada. Tales clones bacterianos son capaces de producir Fab's humanos capaces de unirse tanto al aislado A/PR/8/34 (H1N1) como al aislado A/PC/1/73 (H3N2). Estos clones (con los pares de genes relacionados) se denominaron INF4, INF16, INF28, INF39, INF43 e INF47.

6. Purificación de los Fab's

60 Así, los Fab's producidos de los clones de reactividad cruzada anteriormente descritos (a partir de aquí, denominados indiferentemente "clones" o "Fab's") fueron producidos por medio de bacterias transformadas con el vector de expresión descrito, y después se purificaron por inmutofinidad en columnas compuestas de una resina de sepharose que contenía la proteína G (~ 2 mg/ml), a las que se enlazó un preparado policlonal de anticuerpos de cabra capaces de unirse a los Fab's humanos (PIERCE, Illinois). Brevemente, una sola colonia de cada clon se inoculó en 10 ml de medio SB que contenía ampicilina y tetraciclina a 50 µg/ml y 10 µg/ml, respectivamente. El

cultivo, que se desarrolló durante la noche a 37 °C, se sub-inoculó en un matraz con 500 ml de SB añadidos, a la misma concentración de antibiótico que antes. Las células, inducidas subsiguientemente por IPTG 1 mM, se dejaron agitando durante la noche a 30 °C. El cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 25 minutos y la pella resuspendida en PBS se sometió a sonicación. Fue necesaria una centrifugación adicional a 18,000 rpm durante 25 minutos para
 5 quitar los desechos celulares. El sobrenadante se filtró y luego se pasó lentamente a través de la columna de sepharose anteriormente descrita. Posteriormente, la resina se lavó con 10 volúmenes de PBS y finalmente los Fab's unidos se eluyeron con una solución ácida (amortiguador de elución – H₂O/HCl, pH 2.2). Las diversas fracciones recolectadas se neutralizaron con una solución adecuada (Tris 1 M, pH 9) y se concentraron por ultrafiltración (Centricon, Millipore). La pureza de los Fab's purificados se determinó corriendo una alícuota sobre un
 10 gel de poliacrilamida al 12% /dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Finalmente, diluciones en secuencia de los Fab's purificados se analizaron por medio de ELISA como se describe. En cada placa se incluyeron como control negativo preparados de Fab's monoclonales dirigidos contra la glicoproteína E2 de VHC. Los resultados de este experimento confirmaron los obtenidos previamente con los lisados bacterianos.

15 7. Determinación de inmunofluorescencia de los Fab's monoclonales obtenidos por clonación en PCb3/CAF

Para confirmar los datos obtenidos por ELISA, también se analizaron los Fab's de reactividad cruzada contra la influenza mediante una prueba de inmunofluorescencia. Brevemente, las células de los cultivos infectados se tripsinizaron y, después de dos lavados en PBS, se contaron bajo un microscopio con un hematocitómetro. De esta
 20 manera, la suspensión celular se usó para preparar portaobjetos por centrifugación en una citocentrífuga (Cytospin4, Shandon Southern Products) a 90 °C durante 3 minutos. Los portaobjetos así preparados contenían, cada uno, un total de 2 x 10⁵ células. Se prepararon portaobjetos de control de forma similar con células no infectadas. Las células se fijaron y se permeabilizaron a temperatura ambiente con una solución de metanol-acetona (usada a una temperatura de -20 °C) durante 10 minutos. Después de 3 lavados en PBS, las células se incubaron con diferentes
 25 clones (100 µg/ml) a 37 °C durante 30 minutos en una cámara húmeda, y subsiguientemente se lavaron tres veces en PBS. Después, las células se incubaron a 37 °C durante 30 minutos en la cámara húmeda en la oscuridad con un Fab de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma), diluido 1:200 en azul de Evans. Los portaobjetos se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia (Olympus). Como control positivo se usó un anticuerpo monoclonal de ratón comercial (Argene) específico para la proteína M1 del virus de la influenza. Como control
 30 negativo se usó un anticuerpo dirigido contra la glicoproteína E2 del virus de la hepatitis C (e509; Burioni *et al*, *Hepatology*, 1998). Todos los Fab's recombinantes mostraron, por inmunofluorescencia, una reactividad que fue específica tanto para las células infectadas con la cepa A/PR/8/34 (H1N1) como para las infectadas con la cepa A/PC/1/73 (H3N2). En cambio, no se observó fluorescencia en las células no infectadas, en las células infectadas con cepa de tipo B, ni en las células infectadas con el anticuerpo de control negativo.

35 8. Prueba de neutralización

Para caracterizar la actividad biológica *in vitro* de los clones seleccionados, se diseñaron pruebas de neutralización para los tres aislados virales de referencia usados en el estudio. Brevemente, se sembraron células MDCK en MEM
 40 /10% de FBS en una placa de 96 pocillos (2x10⁴ células/pocillo). Se prepararon diluciones en serie (de 10⁻¹ a 10⁻⁸) de las reservas del virus, obtenidas como se describe arriba, en un medio de mantenimiento (MEM con 2% de FBS). Cada dilución se repitió seis veces. Cuando las células cultivadas se hicieron confluentes, el medio de crecimiento se retiró y se agregaron a cada pocillo 100 µl de cada dilución del virus. Después de 1 hora a 37 °C, los inóculos se retiraron y se pusieron en cada pocillo 200 µl de medio MEM con 1 µg/ml de tripsina. El título viral, expresado como
 45 TCID₅₀ (la dosis que infecta el 50% del cultivo celular) se calculó aplicando la fórmula de Reed-Muench:

$$TCID_{50} = \frac{\text{Infectividad} > 50\% - 50\%}{\text{Infectividad} > 50\% - \text{infectividad} < 50\%} \times \text{factor de dilución}$$

A la luz de los datos obtenidos, la reserva de virus se diluyó a fin de usar una multiplicidad de infección (M.O.I.) de
 50 aproximadamente 0.01 (1 partícula de virus por 100 células) en el experimento de neutralización. En la prueba de neutralización real, células MDCK se sembraron en una placa de 24 pocillos, cada pocillo conteniendo un portaobjetos estéril. El experimento de neutralización se hizo en células 80%-90% confluentes, esto es, aproximadamente 48 horas después de la siembra de las mismas. Después se prepararon diluciones de los fragmentos Fab purificados a fin de obtener concentraciones finales de 2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml y 20 µg/ml para
 55 cada anticuerpo. Se prepararon diluciones correspondientes del anticuerpo anti-VHC e509 como control negativo. Entonces los Fab's se incubaron a las diversas concentraciones con el mismo volumen de reserva de virus diluida (M.O.I. 0.01), a 37 °C durante 1 hora. Subsiguientemente, a los pocillos que contenían las células se les agregaron 250 µl de la mezcla de virus-Fab. Se hizo un control positivo de infección agregando el medio de cultivo solo a la reserva del virus. La placa se incubó a 37 °C durante 1 hora para permitir la adsorción del virus no neutralizado.
 60 Después, el inóculo se retiró y las células se lavaron dos veces con PBS. A cada pocillo se le agregaron 1.5 ml de medio libre de suero con 1 µg/ml de tripsina. Después de 6 horas de incubación a 37 °C, la monocapa celular se lavó con PBS y se fijó con una solución fría de metanol-acetona (proporción 1:2, almacenada a -20 °C), durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fijas se lavaron y se incubaron con 250 µl de un anticuerpo monoclonal

anti-M1 comercial (Argene) a 37 °C durante 30 minutos en una cámara húmeda. Las células se lavaron con PBS y finalmente se incubaron con un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con fluoresceína, diluido en azul de Evans, a 37 °C durante 30 minutos, en una cámara húmeda en la oscuridad. Después de tres lavados en PBS, finalmente los portaobjetos se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia. La actividad neutralizante de los Fab's se determinó contando las células positivas individuales y calculando la reducción del porcentaje del número de células infectadas en comparación con el control positivo infectado con el virus solo. Las pruebas de neutralización se efectuaron en tres sesiones separadas para cada Fab. Particularmente, cada clon se probó contra las dos diferentes cepas de influenza de tipo A de referencia y la cepa de tipo B de referencia mencionada previamente. En cada experimento las diferentes diluciones de Fab se repitieron por triplicado, de forma similar a la realizada para los controles de infección negativos (Fab e509 anti-E2/VHC) y positivos (virus y medio sin Fab's).

Entre los seis Fab's de reactividad cruzada probados, el Fab producido por el clon INF28 mostró una actividad neutralizante cruzada de heterotipo contra los aislados del virus de tipo A. En cambio, no se detectó reducción con respecto a la capacidad de infección del virus de tipo B usado en el estudio, confirmando la especificidad de la actividad neutralizante observada. En particular, el Fab producido por el clon INF28 (denominado Fab 28) mostró una CI_{50} (concentración de Fab que inhibe el 50% de la infección por el aislado viral probado) menor de 5 $\mu\text{g/ml}$ en el caso del subtipo H1N1, y de aproximadamente 10 $\mu\text{g/ml}$ en el caso del subtipo H3N2, esto es, concentraciones que son obtenibles fácilmente mediante una administración *in vivo* de las moléculas en cuestión, aún sin tomar en cuenta el aumento considerable de la actividad biológica neutralizante observada usualmente cuando los Fab's son convertidos a una forma de inmunoglobulina completa, uno de los posibles preparados farmacéuticos incluidos dentro del alcance de la invención.

Las figuras 1 a 3 resumen los resultados obtenidos con Fab 28, producido por el clon INF28, en diferentes sesiones de neutralización realizadas sobre los diversos aislados del virus de la influenza usados en el estudio. Particularmente, la figura 1 es una gráfica que ilustra el porcentaje de neutralización del virus A/PR/8/34 (H1N1) por diferentes concentraciones de Fab 28. Los resultados obtenidos con el Fab anti-VHC e509 humano se reportan como control negativo. La figura 2 es una gráfica que ilustra el porcentaje de neutralización del virus A/PC/1/73 (H3N2) por diferentes concentraciones de Fab 28. Los resultados obtenidos con el Fab anti-VHC e509 humano se reportan como control negativo. La figura 3 es una gráfica que ilustra el porcentaje de neutralización del virus B/Lee/40 por diferentes concentraciones de Fab 28. Los resultados obtenidos con el Fab anti-VHC e509 humano se reportan como control negativo.

9. Caracterización del antígeno reconocido por Fab 28: Western blot en un lisado de células infectadas

En un gel de poliacrilamida al 10% se corrieron 10 μg de un lisado celular infectado con la cepa A/PR/8/34 (H1N1), preparado como se describe arriba, bajo condiciones naturales. Para este fin, las muestras se corrieron a 100V durante 1 h en un tanque refrigerado adecuado (BIORAD). Posteriormente, el gel se retiró del aparato de electroforesis y se incubó 10 minutos en un amortiguador de transferencia (Tris base 3 g; glicina 14.41 g, H_2O 800 ml, metanol 200 ml), para eliminar cualquier residuo de detergente. Entonces se hizo la transferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL; Amersham Biosciences) durante la noche a 30V y 90 mA. Luego la membrana se bloqueó durante 1 hora con leche en polvo disuelta al 5% en PBS 1X y se lavó tres veces en PBS 1X /0.1% de Tween. Durante cada lavado, la membrana se dejó agitando en una plataforma mecánica durante 10 minutos. Después de esto los diferentes Fab's, diluidos en PBS con 5% de leche en polvo, se agregaron a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$. Además del Fab, se agregaron los siguientes controles: e509 como control negativo; IgG1 completa de ratón anti-HA comercial (COVANCE); IgG1 completa de ratón anti-M1 comercial (ARGENE); IgG1 completa de ratón anti-M2 comercial (ABCAM); suero humano diluido 1:200. Cada anticuerpo se dejó agitando 1 hora a temperatura ambiente. Después, la membrana se lavó nuevamente en PBS como se describió arriba. Entonces se agregaron los mismos anticuerpos secundarios de ratón (1:1000) o humano (1:2000) como se describe para la prueba de ELISA, dependiendo de la fuente del anticuerpo que se va a detectar. Para la detección de la señal se preparó una solución de trabajo mezclando dos substratos (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Pierce) en una proporción 1:1, teniendo particular cuidado de no exponerlos a fuentes de luz. La membrana de nitrocelulosa se incubó 5 minutos con la solución de trabajo y después se retiró y se montó en un HyperCassette (AMERSHAM). Este se reveló en una película de rayos X Kodak en el cuarto oscuro después del tiempo de exposición necesario. La prueba descrita se hizo en dos sesiones diferentes, y en cada una de ellas la porción de membrana incubada con Fab 28 mostró la presencia de una banda que pesaba ligeramente menos de 80 KDa, consistente con el peso de la forma inmadura de la hemaglutinina viral (HA0). Esto se confirmó porque la misma banda también se desplegó en la tira incubada con el anticuerpo de control anti-hemaglutinina. También se detectó una banda análoga más intensa que las otras en la porción de membrana incubada con suero humano. El resultado de este experimento muestra que el anticuerpo se dirige contra la hemaglutinina del virus de la influenza, lo que es perfectamente consistente con los datos de neutralización, pues se sabe que la hemaglutinina es el blanco de la respuesta inmune de anticuerpo neutralizante.

10. Prueba de neutralización por prueba de reducción de placa

Se hicieron pruebas de neutralización usando la técnica de la placa para evaluar con más precisión la actividad neutralizante de Fab 28. En primer lugar, los preparados de aislados de virus de los subtipos H1N1 y H3N2 se

cuantificaron mediante una prueba en placa con el siguiente protocolo. Células MDCK se cultivaron en placas se seis pocillos (Costar) en medio MEM suplementado con penicilina y estreptomina (pen/estrep) y enriquecido con 10% de suero fetal bovino (FBS). Después de que la monocapa celular alcanzó 100% de confluencia, los pocillos se lavaron con PBS y medio de cultivo MEM nuevo suplementado con los mismos antibióticos (pen/estrep), y se les agregó tripsina (1 µg/ml). Se hicieron diluciones en serie de las reservas de virus en los mismos pocillos y el virus se dejó adsorber 1 hora a 34 °C bajo una atmósfera de 5% de CO₂. Después, el medio se aspiró y se hicieron dos lavados con PBS. Suavemente, se agregó más MEM suplementado con antibióticos, tripsina (1 µg/ml) y 0.8% de agarosa, a una temperatura menor de 42 °C. Después de la infección, se verificó la condición de salud de la monocapa celular bajo un microscopio óptico de contraste de fase, y las placas se incubaron a 34 °C bajo una atmósfera de 5% de CO₂. Cuarenta y ocho horas después de la infección se retiró la capa de agarosa teniendo cuidado de no dañar la monocapa celular. Posteriormente se agregó a los pocillos metanol al 70% en agua con cristal violeta (1% p/v). La placa se incubó con permeabilizador/colorante a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación, la placa se lavó con agua destilada a temperatura ambiente y se dejó secar bajo un flujo laminar durante 5 minutos. Finalmente se determinó el número de UFP (unidades formadoras de placa) bajo el microscopio de contraste de fase con una amplificación de 4X. Una vez calculado el título del virus como UFP, se calculó la TCID₅₀ correspondiente, y ese mismo título se comparó con el título de las reservas de virus análogo mediante la técnica de dilución limitativa de punto final.

La titulación anterior permitió la cuantificación de los virus por la determinación precisa de la actividad de Fab 28. Se prepararon varias placas de forma análoga al procedimiento antes mencionado de titulación mediante prueba de placa. Se preparó así una mezcla de neutralización que comprendía el virus (100 TCID₅₀ por pocillo) y diferentes concentraciones de los Fab's que se usaron (Fab 28 y Fab de control). En particular, la prueba se hizo probando diferentes concentraciones de Fab's (20, 10, 5 y 2.5 µg/ml) contra 100 TCID₅₀ de las diversas cepas del virus de influenza. Las mezclas virus/Fab se incubaron entonces durante 1 hora a 34 °C bajo una atmósfera de CO₂. Después de lavar las células MDCK con PBS, las preparaciones preincubadas se transfirieron a los pocillos que tenían una monocapa celular 100% confluyente y se incubaron a 34 °C durante 1 hora bajo una atmósfera de 5% de CO₂. La prueba se hizo e interpretó como se describió arriba, comparando el número de placas obtenidas en presencia de Fab 28 con las obtenidas en presencia de la misma concentración del Fab de control.

Las pruebas se hicieron usando los siguientes aislados de influenza que pertenecen a los subtipos H1N1 y H3N2:

H1N1:

A/Malaya/302/54

A/PR/8/34

H3N2:

A/Aichi/68

A/Victoria/3/75

A/Port Chalmers/1/73

Los resultados confirmaron la actividad neutralizante de Fab 28 contra los virus de la influenza H1N1 A/Malaya/302/54 y A/PR/8/34, confirmando también valores de CI₅₀ menores de 2.5 µg/ml. También se confirmó una actividad neutralizante de heterosubtipo contra los virus de la influenza H3N2 A/Aichi/68, A/Victoria/3/75 y A/Port Chalmers/1/73 (CI₅₀ de aproximadamente 20 µg/ml).

11. Identificación del epítipo reconocido por Fab 28

Se siguieron varios enfoques para identificar la región de hemaglutinina reconocida por Fab 28, cuya capacidad para reconocer un epítipo, aunque conformacional, ya se había mostrado en experimentos previos. En realidad, Fab 28 resultó capaz de reconocer la proteína solo en las pruebas de Western blot realizadas bajo condiciones seminaturales (SDS 0.1%). Los mismos experimentos también habían señalado la capacidad de Fab para reconocer solo la forma inmadura de la proteína (HA0), pero no las subunidades individuales (HA1 y HA2). Se efectuaron pruebas de inhibición de hemaglutinina (HAI) en paralelo, con eritrocitos de pollo y eritrocitos humanos. A pesar de la notable actividad neutralizante, se observó que Fab 28 no tiene actividad de HAI, sugiriendo que no se une a residuos implicados en la unión entre hemaglutinina y ácido siálico.

Para una mejor caracterización del epítipo, se siguieron dos estrategias complementarias: selección de secuencias de péptido aleatorias, contenidas en una colección de despliegue de fago, que fueron capaces de unirse al anticuerpo monoclonal Fab 28; e inducción *in vivo* por presión selectiva mediante Fab 28, de variantes virales (mutantes de escape) capaces de escapar de la actividad neutralizante del anticuerpo.

La selección de la colección de péptidos mediante la técnica de cribado permitió la identificación de varios péptidos capaces de unirse específicamente al idiotipo Fab 28. Todos los péptidos identificados se analizaron para generar

una secuencia de consenso. Tal secuencia de consenso se usó entonces para un análisis *in silico* de un cristal de hemaglutinina que pertenece al subtipo H1N1. Por medio de este análisis fue posible revelar las regiones reconocidas potencialmente por Fab 28. En particular, un epítotope se sometió a análisis adicional en vista de su compatibilidad con los resultados encontrados previamente y con los generados en paralelo con el enfoque mediante los mutantes de escape. El epítotope se localiza en la región de tallo de la hemaglutinina, esto es, en una porción entre las regiones HA1 y HA2 (datos perfectamente consistentes con los resultados obtenidos en las pruebas de Western blot y HAI). Los residuos críticos para la unión que se identificaron son los siguientes: W357 y T358 en la región HA2; N336; I337; P338 en la región HA1 (la numeración de los residuos se refiere a la secuencia de hemaglutinina del aislado H1N1/A/PR/8/34 presente en la base de datos BLAST) (SEQ ID NO: 5).

La prueba mediante los mutantes de escape se hizo mediante infecciones en serie de células MDCK con 100 TCID₅₀ del virus H1N1/A/PR/8/34 en presencia de 10 µg/ml de Fab 28, esto es, una concentración de Fab equivalente a su CI₉₀ contra el aislado en cuestión. Solo después de muchos pasajes fue posible detectar la infección de las células en presencia del Fab, lo que es indicativo de una mutación ocurrida en el genoma del virus. De hecho, se seleccionaron los mutantes de escape mutados en dos residuos de la región HA2, I361 y D362, que son adyacentes a la región identificada por el enfoque *in silico*, confirmando la hipótesis de que esta es la región reconocida por Fab 28.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> POMONA BIOTECHNOLOGIES LLC

5 <120> Anticuerpos monoclonales capaces de reaccionar con una pluralidad de subtipos del virus de la influenza A

<130> PC895EC

<160> 5

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 122

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg
1				5					10					15	
Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Pro	Phe	Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	His
			20					25					30		
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Gly	Val
		35					40					45			
Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
	50					55					60				
Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met
65					70					75				80	
Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Pro
				85					90					95	
Ser	Ala	Ile	Phe	Gly	Ile	Tyr	Ile	Ile	Leu	Asn	Gly	Leu	Asp	Val	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120								

20 <210> 2
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 2

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

ES 2 544 968 T5

<210> 3
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5
 <400> 3

ctcgaggagt	ctgggggagg	cggtgtccag	cctgggaggt	ccctgagact	ctcctgtgca	60
gcctctggat	tcccctcag	tagttatggc	atgcactggg	tccgccaggc	tccaggcaag	120
gggctggagt	gggtggcagg	tgtttcatat	gatggaagtt	ataaatacta	tgccggactcc	180
gtcaagggcc	gattcacat	ctccagagac	agtccaaga	gcactctata	tctgcaaatg	240
aacagcctga	gacctgagga	cacggctgtg	tattactgtg	cgagaccttc	cgcgattttt	300
ggaatataca	ttattctaaa	cggtttggac	gtctggggcc	aaggggaccac	ggtcaccgtc	360
tcttca						366

<210> 4
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10
 <400> 4

gagctcacgc	agtctccatc	ttccgtgtct	gcatctgtag	gagacagagt	cactatcact	60
tgctgggcca	ctcagggtat	tagtagttgg	ttagcctggt	atcagcagaa	accagggaaa	120
ccacctaaac	tcctgatttt	tggtgcatct	agtttgcaaa	gtggggctcc	atcaaggttc	180
agcggcagtg	gatctgggac	agatttcaat	ctcacatca	gcagtctaca	gcctgaagat	240
tttgcaactt	actttgtca	acaggctcac	agtttcccgc	tcactttogg	cggggggacc	300
aaggtggaga	tcaaa					315

<210> 5
 <211> 565
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20
 <400> 5

Met	Lys	Ala	Asn	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp
1				5					10					15	
Ala	Asp	Thr	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr	His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Asp	Thr
			20					25					30		
Val	Asp	Thr	Val	Leu	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Val	Thr	His	Ser	Val	Asn
		35					40					45			
Leu	Leu	Glu	Asp	Ser	His	Asn	Gly	Lys	Leu	Cys	Arg	Leu	Lys	Gly	Ile
	50					55					60				
Ala	Pro	Leu	Gln	Leu	Gly	Lys	Cys	Asn	Ile	Ala	Gly	Trp	Leu	Leu	Gly
65					70					75					80
Asn	Pro	Glu	Cys	Asp	Pro	Leu	Leu	Pro	Val	Arg	Ser	Trp	Ser	Tyr	Ile
				85					90					95	
Val	Glu	Thr	Pro	Asn	Ser	Glu	Asn	Gly	Ile	Cys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Phe
			100					105					110		
Ile	Asp	Tyr	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Phe
		115					120					125			
Glu	Arg	Phe	Glu	Ile	Phe	Pro	Lys	Glu	Ser	Ser	Trp	Pro	Asn	His	Asn
	130					135					140				

ES 2 544 968 T5

Thr 145	Asn	Gly	Val	Thr	Ala 150	Ala	Cys	Ser	His	Glu 155	Gly	Lys	Ser	Ser	Phe 160
Tyr	Arg	Asn	Leu	Leu 165	Trp	Leu	Thr	Glu	Lys 170	Glu	Gly	Ser	Tyr	Pro 175	Lys
Leu	Lys	Asn	Ser 180	Tyr	Val	Asn	Lys	Lys 185	Gly	Lys	Glu	Val	Leu 190	Val	Leu
Trp	Gly	Ile 195	His	His	Pro	Pro	Asn 200	Ser	Lys	Glu	Gln	Gln 205	Asn	Leu	Tyr
Gln	Asn 210	Glu	Asn	Ala	Tyr	Val 215	Ser	Val	Val	Thr	Ser 220	Asn	Tyr	Asn	Arg
Arg 225	Phe	Thr	Pro	Glu	Ile 230	Ala	Glu	Arg	Pro	Lys 235	Val	Arg	Asp	Gln	Ala 240
Gly	Arg	Met	Asn	Tyr 245	Tyr	Trp	Thr	Leu	Leu 250	Lys	Pro	Gly	Asp	Thr 255	Ile
Ile	Phe	Glu	Ala 260	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile 265	Ala	Pro	Met	Tyr	Ala 270	Phe	Ala
Leu	Ser	Arg 275	Gly	Phe	Gly	Ser	Gly 280	Ile	Ile	Thr	Ser	Asn 285	Ala	Ser	Met
His	Glu 290	Cys	Asn	Thr	Lys	Cys 295	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly 300	Ala	Ile	Asn	Ser
Ser 305	Leu	Pro	Tyr	Gln	Asn 310	Ile	His	Pro	Val	Thr 315	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro 320
Lys	Tyr	Val	Arg	Ser 325	Ala	Lys	Leu	Arg	Met 330	Val	Thr	Gly	Leu	Arg 335	Asn
Asn	Pro	Ser	Ile 340	Gln	Ser	Arg	Gly	Leu 345	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala 350	Gly	Phe
Ile	Glu	Gly 355	Gly	Trp	Thr	Gly	Met 360	Ile	Asp	Gly	Trp	Tyr 365	Gly	Tyr	His
His	Gln 370	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser 375	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp 380	Gln	Lys	Ser	Thr
Gln 385	Asn	Ala	Ile	Asn	Gly 390	Ile	Thr	Asn	Lys	Val 395	Asn	Thr	Val	Ile	Glu 400
Lys	Met	Asn	Ile	Gln 405	Phe	Thr	Ala	Val	Gly 410	Lys	Glu	Phe	Asn	Lys 415	Leu
Glu	Lys	Arg	Met 420	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys 425	Lys	Val	Asp	Asp	Gly 430	Phe	Leu
Asp	Ile	Trp 435	Thr	Tyr	Asn	Ala	Glu 440	Leu	Leu	Val	Leu	Leu 445	Glu	Asn	Glu
Arg	Thr 450	Leu	Asp	Phe	His	Asp 455	Ser	Asn	Val	Lys	Asn 460	Leu	Tyr	Glu	Lys
Val 465	Lys	Ser	Gln	Leu	Lys 470	Asn	Asn	Ala	Lys	Glu 475	Ile	Gly	Asn	Gly	Cys 480
Phe	Glu	Phe	Tyr	His 485	Lys	Cys	Asp	Asn	Glu 490	Cys	Met	Glu	Ser	Val 495	Arg
Asn	Gly	Thr	Tyr 500	Asp	Tyr	Pro	Lys	Tyr 505	Ser	Glu	Glu	Ser	Lys 510	Leu	Asn
Arg	Glu	Lys 515	Val	Asp	Gly	Val	Lys 520	Leu	Glu	Ser	Met	Gly 525	Ile	Tyr	Gln
Ile	Leu 530	Ala	Ile	Tyr	Ser	Thr 535	Val	Ala	Ser	Ser	Leu 540	Val	Leu	Leu	Val

ES 2 544 968 T5

Ser 545	Leu	Gly	Ala	Ile	Ser 550	Phe	Trp	Met	Cys	Ser 555	Asn	Gly	Ser	Leu	Gln 560
Cys	Arg	Ile	Cys	Ile 565											

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra el antígeno hemaglutinina del virus de la influenza A, que es capaz de unirse a una pluralidad de subtipos del virus de la influenza A y neutralizarlos, en donde dicha pluralidad de subtipos comprende, al menos, un subtipo del virus de la influenza A que contiene hemaglutinina H1 y, al menos, un subtipo del virus de la influenza A que contiene hemaglutinina H3, comprendiendo el anticuerpo monoclonal humano por lo menos un dominio variable de cadena pesada y por lo menos un dominio variable de cadena ligera, caracterizado porque el dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 10 2.- El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 1, en el que el dominio variable de cadena pesada está codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena ligera está codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.
- 15 3.- El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 1 o 2, seleccionado del grupo que consiste en inmunoglobulinas completas y fragmentos de inmunoglobulina que comprenden por lo menos un dominio variable de cadena pesada y por lo menos un dominio variable de cadena ligera.
- 20 4.- El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 3, en donde dichos fragmentos de inmunoglobulina se seleccionan del grupo que comprende fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv, anticuerpos de una sola cadena (scFv).
- 5.- Secuencias de nucleótidos aisladas SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
- 25 6.- Un vector de expresión que comprende las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
- 7.- Una célula hospedera transformada por un vector de expresión de conformidad con la reivindicación 6.
- 30 8.- Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 35 9.- Un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso como medicamento profiláctico o terapéutico para una infección por el virus de la influenza A o una enfermedad causada directa o indirectamente por una infección del virus de la influenza A.
- 40 10.- El anticuerpo para usar de conformidad con la reivindicación 9, en donde la enfermedad causada por una infección del virus de la influenza A es el síndrome de influenza.
- 45 11.- Un método de prueba para detectar, en una muestra biológica de un paciente, la presencia de anticuerpos contra el virus de la influenza que tienen una propiedad neutralizante cruzada de heterosubtipo, que comprende poner en contacto dicha muestra biológica con un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como reactivo de prueba específico.
- 50 12.- Un kit de diagnóstico que comprende un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como reactivo específico, dicho kit diseñado particularmente para usarse en un método de detección o cuantificación de anticuerpos contra el virus de la influenza A que tienen una propiedad neutralizante cruzada de heterosubtipo, en una muestra biológica obtenida de un paciente.
- 13.- Un método de prueba para detectar, en una composición inmunogénica o de vacuna, la presencia de epítomos del virus de la influenza A capaces de provocar anticuerpos contra el virus de la influenza A que tienen una propiedad neutralizante cruzada de heterosubtipo contra el virus de la influenza A, en un sujeto en el que se administra, que comprende poner en contacto dicha composición con un anticuerpo monoclonal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como reactivo de prueba específico.

FIG. 1

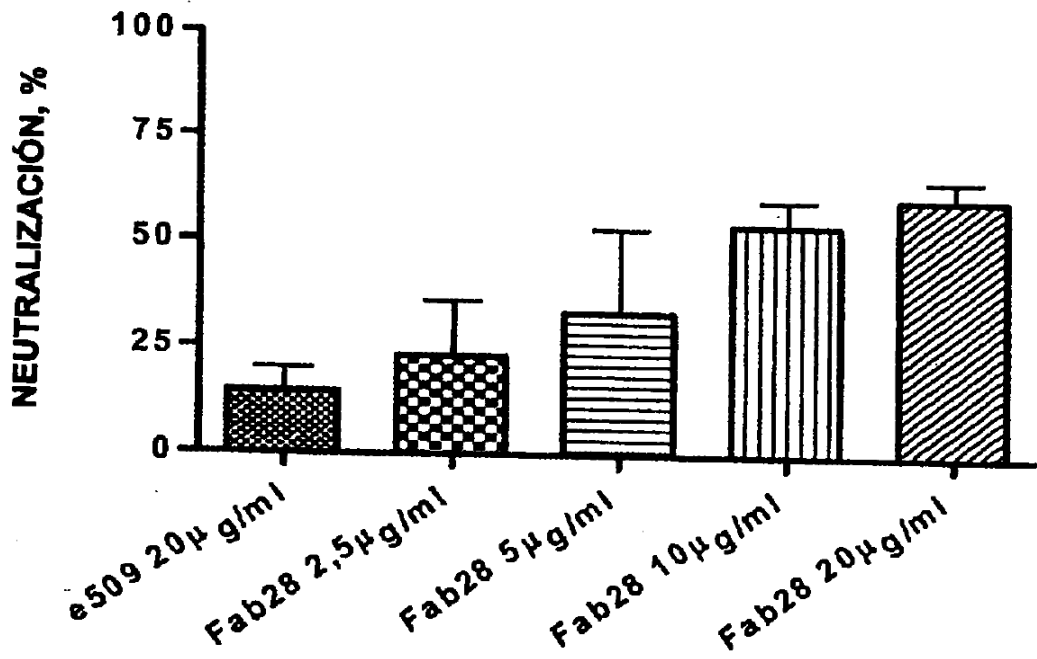


FIG. 2

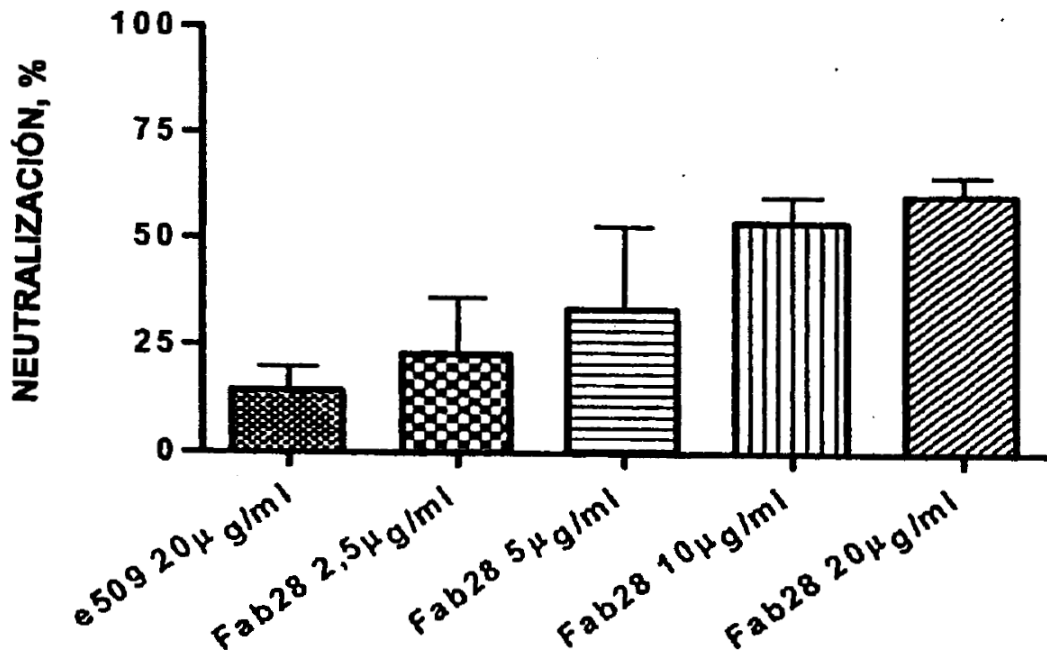


FIG. 3

