

**FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES
2000-10**

1

SOLICITUD DE:

☐

Corrección de Error Material

☒

Modificación a una solicitud

2

SOLICITANTE

Nombre: **DANA-FARBER CANCER
INSTITUTE, INC. y BURNHAM INSTITUTE
FOR MEDICAL RESEARCH**
Sociedades constituidas y existentes bajo
las leyes del Estado de Massachusetts y el
Estado de California, Estados Unidos de
América, respectivamente

Dirección: 44 Binney Street,
Boston,
Massachusetts 02115,
Estados Unidos de América

y

10901 North Torrey Pines
Road,
La Jolla,
California 92037,
Estados Unidos de América

Teléfono: 546 09 70
E-mail: clientes@cavelier.com
Fax: 249 40 70

Domicilio: Boston,
Massachusetts,
Estados Unidos de América

y

La Jolla,
California,
Estados Unidos de América,

respectivamente.

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número: _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: Luz Clemencia de PÁEZ

Dirección: Carrera 4ª No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
E-mail: cavelier@cavelier.com
Fax: 217 92 11
Domicilio: Bogotá, Colombia

IDENTIFICACION

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número: 35.456.344 TP 23.555

4

Número de expediente: 10.081.516 Clase: C07K 016/010

Título del Invento: **COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE UN ANTICUERPO MONOCLONAL O EL
ANTICUERPO scFv ENLAZADO A UN EPÍTOPO EN LA REGIÓN DE TALLO DE LA PROTEINA DE
HEMAGLUTININA (HA)**

5

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento las siguientes modificaciones:

1. Nuevo capítulo descriptivo en el cual se han adicionado los identificadores de las SEQ ID NO requeridos, asociados con las varias secuencias listadas.
2. Nueva tabla 5, en la cual se ha modificado el pie de página.
3. Nuevo listado de secuencias, que incluyen las secuencias indicadas en la Figura 3.

Solicito a ese Despacho tener en cuenta las modificaciones anteriormente indicadas al momento de realizar el estudio de patentabilidad de la solicitud que se tramita en el presente expediente. Así mismo deseo confirmar que el capítulo reivindicatorio que debe ser tenido en cuenta al momento del estudio de la solicitud, es el conformado por 38 reivindicaciones, radicado ante ese Despacho el 29 de septiembre de 2010.

6

Comprobante de pago No. 11-0081420 **Fecha:** 22 de agosto de 2011

7

Anexos:

☒ Comprobante de pago de la tasa por concepto de modificación de solicitud en trámite por \$118.000.oo.
☐ Poderes, si fuere el caso
☐ Certificado de existencia y representación legal, cuando el solicitante sea persona jurídica

8

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ **FIRMA:** Luiz Clemencia de Páez
C.C. 35.456.344 de Usaquén **T.P.** 23.555

JGG/ID.199128

Anticuerpos Contra El Virus De Influenza y Métodos de Uso de los Mismos

APLICACIONES RELACIONADAS

5

Esta aplicación reivindica el beneficio de USSN 61/005,725 inscrita el 6 de Diciembre de 2007 y USSN 61/091,599 inscrita el 25 de Agosto de 2008 cuyos contenidos se incorporan aquí en referencia en su totalidad.

10

SOPORTE DE OTORGAMIENTO

Esta invención fue realizada con el soporte del Gobierno de los Estados Unidos bajo Otorgamientos del Instituto Nacional de la Salud U01 AI074518-01. El Gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en la invención.

15

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere de forma general a anticuerpos anti-virales así como a métodos de uso de los mismos.

20

ANTECEDENTES

Una pandemia de influenza representa una de los riesgos de infección más graves para la salud humana. La pandemia de influenza de 1918-1919 causó un estimado de 500,000 muertes en los Estados Unidos, haciéndola el evento más fatal de toda la historia de los EEUU. La propagación de la altamente patogénica influenza aviar (HPAI) influenza H5N1 a través de Asia y ahora al oriente medio y

25

norte de África crea un riesgo sustancial para el surgimiento de una nueva pandemia.

Variaciones naturales así como el escape de mutaciones sugieren que la evolución continúa del virus puede impactar la decisión de cual (es) cepa (s) se debe (n) utilizar para inmunizaciones pasivas y activas. Aunque un número importante de mapeo de epítomos y estudios de neutralización de escape han reportado nuevos anticuerpos neutralizantes y se necesitan estudios estructurales relacionados para desarrollar estrategias de inmunización contra HPAI H5N1. Los retos de desarrollar una vacuna protectora contra HPAI H5N1 son formidables y se necesitan nuevos enfoques para prevenir y tratar infecciones humanas por un enemigo de cambio constante. Hay una necesidad de desarrollar rápidamente estrategias terapéuticas para obtener la protección inmunológica de los huéspedes, tanto pasivos como activos.

Se han hecho avances tremendos en el campo de la ingeniería de anticuerpos humanos (Ab). Inmunoterapias se basadas en anticuerpos monoclonales (Mab) se están volviendo el estándar de cuidado en un creciente número de enfermedades humanas incluyendo RSV. El cambio hacia el aislamiento de Mab humano *de novo* y su uso clínico es en parte por la nueva demostración de anticuerpos y otras técnicas de detección de colecciones que ahora son explotadas para crear anticuerpos humanos con alta afinidad y especificidad. Las inmunoterapia Mab Humanas pueden proporcionar un creciente rol importante en el manejo clínico de las enfermedades humanas.

RESUMEN DE LA INVENCION

25

La invención está basada en el descubrimiento de anticuerpos monoclonales que neutralizan el virus de influenza, p.e. virus de influenza A. El

virus de influenza A es un virus de influenza A grupo I como el conjunto H1 de virus de influenza, el conjunto H1 de virus de influenza es un conjunto H1a o un conjunto H1b. El anticuerpo monoclonal es completamente humano. En algunos aspectos, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo bivalente, un anticuerpo monovalente, un anticuerpo de cepa sencilla o fragmentos de los mismos. Específicamente, tales lazos monoclonales a un epítipo en la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA), como los polipéptidos HA1 o HA2. El epítipo es no-lineal.

Opcionalmente, el epítipo comprende tanto el HA-1 como el HA-2. El epítipo es no-lineal. En algunas materializaciones el epítipo comprende la posición de aminoácido 18, 38, 40, 291 del polipéptido HA1 y el aminoácido en la posición 18,19, 20, 21, 38, 41, 42, 45, 49, 52, 53 y 56 del polipéptido HA2.

Anticuerpos monoclonales ejemplares incluyen anticuerpos monoclonales D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, o H98 o un anticuerpo que se enlace al mismo epítipo como D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, o H98.

Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden tener la afinidad de enlace de anticuerpo monoclonal D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, o H98. Alternativamente, la afinidad de enlace puede variar de más o menos 1pM a más o menos 200 mM. Los anticuerpos monoclonales de la invención funcionan para inhibir fusiones virales y de membrana celular.

El anticuerpo monoclonal tiene una pesada cadena de secuencia de aminoácido variable que contiene SEQ ID NOS: 2, 6, 12, 18, 24, 28, 32 y 36 y/o una liviana cadena de secuencia de aminoácido variable que contiene SEQ ID NOS: 4, 8, 14, 16, 20, 22, 26, 30, 34 y 38.

El anticuerpo monoclonal tiene una pesada cadena de secuencia de ácido nucleico variable que contiene SEQ ID NOS: 1, 5, 13, 15, 21, 23, 29, 33, 37 y 40 y

o una liviana cadena de secuencia de ácido nucléico variable que contiene SEQ ID NOS: 3, 9, 11, 17, 19, 25, 27, 31, 35, 39 y 42.

También se proporciona por la invención un anticuerpo de proteína de hemaglutinina de anti-influenza monoclonal o fragmento del mismo, donde el anticuerpo tiene una región CDR1 V_H que tiene la secuencia de aminoácidos SYAFS (SEQ ID NO: 43), TNAFS (SEQ ID NO: 44), AYAFT (SEQ ID NO: 45), SFAIS (SEQ ID NO: 46), SYAIS (SEQ ID NO: 47) GYYIH (SEQ ID NO: 48), MTAFT (SEQ ID NO: 49), o DNAIS (SEQ ID NO: 50); una región CDR2 V_H que tiene la secuencia de aminoácidos GIIPMFGTPNYAQKFQG (SEQ ID NO: 51), GVIPLFRTASYAQNQVG (SEQ ID NO: 52), GIIGMFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 53), GISPMFGTPNYAQKFQG (SEQ ID NO: 54), GIIGVFGVPKYAQKFQG (SEQ ID NO: 55), WINPMTGGTNYAQKFQV (SEQ ID NO: 56), GISPIFRTPKYAKFQG (SEQ ID NO: 57), o GIIPFGKPNYAKFQG (SEQ ID NO: 58); una región CDR3 V_H que tiene la secuencia de aminoácidos SSGYYYG GGF DV (SEQ ID NO: 59), SSGYHFGRSHFDS (SEQ ID NO: 60), GLYYYESSLDY (SEQ ID NO: 61), SPSYICSGGTCVFDH (SEQ ID NO: 62), EPGYYVGKNGFDV (SEQ ID NO: 63), GASV_LRYFDWQPEALDI (SEQ ID NO: 64), TLSSYQPNNDFAFI (SEQ ID NO: 65), o DSDAYYYGSGGMDV (SEQ ID NO: 66); una región CDR1 V_L que tiene la secuencia de aminoácidos TGSSSNIGNYVA (SEQ ID NO: 67), TGSSSNIAANYVQ (SEQ ID NO: 68), TGTSSDVGGYNSVS (SEQ ID NO: 69), TGNSNNVGNQGAA (SEQ ID NO: 70), TGDSNNVGHQGTA (SEQ ID NO: 71), GGNNIGGYSV_H (SEQ ID NO: 72), RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 73), RASQSLSSKYLA (SEQ ID NO: 74), TGSSSNIGNYVA (SEQ ID NO: 75), SGSSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 76), RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 77), o TLSSGHSNYIIA (SEQ ID NO: 78); una región CDR2 V_L que tiene la secuencia de aminoácidos SNSDRPS (SEQ ID NO: 79), EDDRRPS (SEQ ID NO: 80), EVTKRPS (SEQ ID NO: 81), RNNDRPS (SEQ ID NO: 82), RNGNRPS (SEQ ID

NO: 83), DDKDRPS (**SEQ ID NO: 84**), DASNRAT (**SEQ ID NO: 85**), GASSRAT
(SEQ ID NO: 86), SNNQRPS (**SEQ ID NO: 87**), AASSLQR (**SEQ ID NO: 88**),
 SNEQRPS (**SEQ ID NO: 89**), o VNSDGSHTKGD (**SEQ ID NO: 90**) y/o una región
 CDR3 V_L que tiene la secuencia de aminoácidos QSYDSL SAYV (**SEQ ID NO: 91**),
 5 QSYDTNNHAV (**SEQ ID NO: 92**), CSYAGHSAYV (**SEQ ID NO: 93**),
 STWDSSLSAVV (**SEQ ID NO: 94**), SVWDSSLSAWV (**SEQ ID NO: 95**),
 QVWDSGNDRPL (**SEQ ID NO: 96**), QQYGSSPQV (**SEQ ID NO: 97**),
 QQYDGVPR T (**SEQ ID NO: 98**), QSYDSRLSASL (**SEQ ID NO: 99**), QQYDSSPYT
(SEQ ID NO: 100), ASWDDNLSGWV (**SEQ ID NO: 101**), o ETWDTKIHV (**SEQ ID**
 10 **NO: 102**).

En otro aspecto más, la invención provee An aislado un anticuerpo de
 proteína hemaglutinina monoclonal anti-influenza o fragmento del mismo donde el
 anticuerpo tiene una secuencia de aminoácido VH codificada por el gen VH de
 15 línea germinal IGHV1-69*01 y el aminoácido en la posición: a) 27 es una valina; b)
 28 es treonina; c) 30 es serina; d) 31 es serina; e) 54 es metionina; f) 55 es
 fenilalanina; g) 58 es treonina; h) 100 es prolina; i) 101 es serina; j) 102 es tirosina;
 k) 103 es isoleucina y 105 es serina.

En otro aspecto, la invención provee un método de prevenir o tratar una
 20 enfermedad o desorden causado por un virus de influenza administrando a una
 persona en riesgo de sufrir de dicha enfermedad o desorden, una cantidad
 terapéutica efectiva de un anticuerpo monoclonal o anticuerpo scFV descrito aquí.
 El anticuerpo monoclonal o anticuerpo scFV es administrado en una dosis
 suficiente para neutralizar el virus de influenza. En materializaciones del invento, el
 25 método también incluye suministrar una droga anti-viral, un inhibidor de entrada
 viral o un inhibidor de adjunción viral. La droga anti-viral es inhibidor de
 neuraminidasa así como Zanamivir, o fosfato de oseltamivir, un inhibidor HA, un

inhibidor de ácido siálico o un canal M2 iónico como la amantadina o rimantadina. El anticuerpo es administrado posterior a t o después de la exposición a un virus de influenza.

En otro aspecto, la invención provee un método para detectar la presencia
5 de un virus de influenza en una muestra poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal como se describe aquí, y detectando la presencia o ausencia de un complejo anticuerpo-antígeno, por lo tanto detectando la presencia de un virus de influenza en una muestra. La muestra de prueba es generalmente obtenida de la sangre, pelo, raspadura o frotis de cachete, saliva, biopsia, orina,
10 heces, esputo, aspiración nasal, o semen.

La invención también se basa en el descubrimiento de un protocolo para generar anticuerpos humanos de amplia neutralización que se dirigen a un altamente conservado epítipo en la región de tallo de HA. Usando el trimero H5 ectodominio expresado en baculoviridae que produce manosas N-glycans mas
15 cortas y sin cambios absorbidas en una superficie plástica, permitida para la presentación dominante del epítipo de tallo mientras oculta la normalmente inmunodominante cabeza globular.

Por consiguiente, también incluido en la invención esta un método para producir un anticuerpo aislado que enlaza específicamente un virus patógeno
20 envuelto por la exposición de una cadena simple o expresión Fab de colección a una proteína de fusión de membrana del virus, identificando un anticuerpo en la colección que específicamente enlaza dicha proteína; y aislando el anticuerpo de la colección. Preferiblemente, la proteína de fusión es inmovilizada en una superficie sólida, p.e. plástico. En varios aspectos la proteína de fusión tiene
25 glucosilación modificada comparada con una proteína de fusión de tipo salvaje. Por ejemplo, la fusión es producida en una célula no-mamífera, como una célula

de un insecto. La proteína de fusión es por ejemplo una proteína hemaglutinina de trimero (HA)

La invención además provee un método para vacunar a un sujeto contra virus patogénicos envueltos como un virus de influenza administrando al sujeto
5 una proteína de fusión de membrana (p.e., una proteína cubierta de hemaglutinina de trómero (HA)) o implantada en una matriz biológicamente compatible. En varios aspectos la proteína de fusión tiene glucosilación modificada comparada con una proteína de fusión de tipo salvaje.

En otro aspecto, la invención provee una composición comprendida de un
10 anticuerpo monoclonal como se describe aquí y equipos que contienen la composición en uno o más contenedores e instrucciones para su uso.

A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por alguien con una habilidad ordinaria en el arte en el que esta invención
15 pertenece. Aunque métodos y materiales similares a los descritos aquí pueden ser usados en la práctica o en pruebas de la presente invención, métodos y materiales apropiados son descritos más abajo. Todas las publicaciones, solicitud de patentes, y otras referencias aquí mencionadas son incorporadas por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo
20 definiciones, estará en control. Adicionalmente, los materiales, métodos, y ejemplos son solo ilustrativos y no se supone que sean limitantes.

Otros aspectos y ventajas de la invención serán aparentes de las siguientes descripciones detalladas y reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIAGRAMAS

La Figura 1 A es una ilustración de la estructura del trímero A/Vietnam 1203/04. El lugar de receptor de enlace y el lugar de variación antigénica están
5 resaltadas en el monómero.

La figura 1 B es una ilustración que muestra la ubicación de residuos de aminoácidos en el HA de los virus de influenza H5N1 que están bajo selección positiva.

La figura 2 es una ilustración esquemática de inmunoterapia de
10 combinación convergente para H5N1.

La Figura 3 es una ilustración que muestra una comparación de la secuencia de aminoácidos de las regiones estructurales 1-4 (FR1-4) y las regiones determinantes de complementariedad 1-3(CDR1-3) para el V_H (secuencias de longitud completa descritas como la SEQ ID NOS 110-116, respectivamente, en orden de aparición) y V_L (secuencias de longitud completa descritas como las SEQ ID NOS 8, 14, 20, 26, 30, 34, 16, 38, 22, y 10, respectivamente, en orden de aparición) de los anticuerpos de anti-influenza de la invención. Las regiones FR y CDR se definen utilizando la base de datos Kabat. Los nombres de los genes de V_H y V_L se muestran a la derecha (utilizando la base de datos IMGT).
15 Los puntos muestran la identidad de la secuencia de consenso. Los guiones representan espacios. La Figura 3 describe la "CDR1" V_H como la SEQ ID NOS 117-123, "CDR2" como la SEQ ID NOS 124-130, y la "CDR3" como la SEQ ID NOS 169 y 131-136, todas respectivamente, en orden de aparición. La Figura 3 describe la "CDR1" V_L como la SEQ ID NOS 137-146, "CDR2" como la SEQ ID NOS 147-156, y la "CDR3" como la SEQ ID NOS 157-166, todas respectivamente, en orden de aparición. La Figura 3 describe la CDR V_H y las secuencias de consenso como la SEQ ID NOS 170-173 y las secuencias de
20
25

consenso FR V_L como la SEQ ID NOS 174-177, todas respectivamente, en el orden de aparición. La Figura 3 también describe "OVOLVOSGAEV" como la SEQ ID NO: 167 y "VTVSS" como la SEQ ID NO: 168.

La figura 4 muestra neutralizaciones *in vitro* de anticuerpos anti-H5. (a) (Panel Superior) Los 10 nAbs fueron convertidos a scFv-Fcs (fragmento de cadena simple de región variable enlazada con Eje, CH2 y CH3) solubles y evaluados para neutralizar actividad contra virus pseudotyped H5-TH04. El porcentaje de neutralización en 2 concentraciones es mostrada con barras de error estándar. El mAb 80R¹⁶ fue usado como el control (Ctrl.). (paneles medio e inferior), Neutralización de H5-VN04 y H5IN05 de tipo salvaje por los 10 scFv-Fcs en tres concentraciones utilizando un ensayo de placa de reducción. Los resultados son consistentes con los obtenidos de ensayos de microneutralización (no se muestran los datos). (b) Neutralización cruzada de subtipo. nAbs D8, F10 y A66 todos neutralizaron virus pseudotyped H5-TH04, H1-SC1918 ((A/Carolina del Sur/1/1918 (H1N1)), H1-PR34 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)), H2-JP57 (A/Japón/305/57(H2N2)) and H6-NY98 (A/pollo/Nueva York/14677-13/1998(H6N2)). (e) Ensayo de microneutralización. Títres de neutralización de F10 contra H5N1, H1N1 (A/Ohio/83 ("H1-0H83")) y H2N2 (A/Ann Arbor/6/60 ("H2-AA60")) de tipo salvaje comparados con un murino mAb 21G8.6 criado contra H5N1 y Ctrl. 80R (1 mg/mL Ab de solución de surtido). "<" indica un titer de menos de 20. Los resultados representan dos experimentos independientes.

La figura 5 muestra el mecanismo de neutralización. (a) ensayo de inhibición de enlace de virus utilizando virus de longitud-completa HA de pseudotipo H5-TH04 HIV-1. El enlace de virus a células en grupos Ab-tratados fueron comparados con enlaces a células en la ausencia de Ab (definido como 100%). Ninguno de los tres virus inhibidos nAbs (D8, F10 y A66) enlazados a células, mientras que un ratón anti-H5 mAb, 17A2.1.2, y hurón con suero anti-

H5N1, los dos hemaglutinina inhibidos y presuntamente enlazados a la cabeza, redujeron enlace significativamente. (b) Inhibición de formación de sincitios por nAbs. Células HeLa fueron transferidas con plásmido de expresión H5-TH04. Formación de sincitios inducida por la exposición corta a tapón de pH 5.0 fue
5 completamente inhibida por nAbs D8, F10 y A66, a 20 µg/ml, mientras que el control y un anti-HA1 mAb (2A) a la misma concentración no tuvieron efecto.

La Figura 6 muestra la Estructura del epítipo H5-F10, y la secuencia/conservación estructural. (a) Estructura del trímero H5 unido a F10 (scFv). H5 es muy similar a la estructura no complejada²¹ (RMSD en forma de
10 pares (Cα) = 1.0 y 0.63 Å para 2 trímeros independientes). Se codifican por colores el HA1, HA2, la hélice αA de HA2, el "péptido de fusión" (FP), y F10 (V_H y V_L). El tercer F10 se oculta detrás del tallo. Observe que V_L no hace contacto con H5. (b) Superficie de la región de tallo central. Se colorea un monómero por cadena; se subraya (en rojo) la ruta del FP al epítipo; las mutaciones que no
15 afectan la unión están en cian. El péptido de fusión (FP y FP') es visible en dos monómeros. Se marcan los residuos de epítipo en blanco (HA2) o amarillo (HA1). (c) Vista de cerca del epítipo que muestra la punta de F10 (cinta roja) y las cadenas laterales CDR seleccionadas. De la superficie oculta 1500 Å² en la interfaz, el 43% implica interacciones hidrófobas. (d) Superposición de los subtipos
20 HA: H1, H5 y H9 (Grupo 1) en tonos de rojo/ amarillo (1RU7, 21BX y 1 JSD); H3 y H7 (Grupo 2) en tonos de azul (1MQL y 1TI8). Los RMSD para superposiciones en forma de pares son 0.56± 0.11 Å (rango observado, Grupo 1); 0.75 Å (Grupo 2); y 1.21±0.12 Å entre grupos. Las diferencias consistentes entre los grupos incluyen la orientación de W21₂, que se une para alternar las direcciones de la cadena
25 lateral en 18₁ y 38₁, el ocultamiento de la tirosina mayor (Grupo 1) versus histidina (Grupo 2) en 17₁, y el empaque de His111₂ oculto (Grupo 1) contra W21₁. Se indican otros residuos de epítipo por los círculos blancos numerados. Se glucosila

N38₁ en el conglomerado H3 y H7. (e) Secuencias de los subtipos 16 HA. Los círculos indican energías de unión calculadas: fuerte =azul, intermedia =naranja; débil= azul; no favorable =negro. El resaltado de color indica la conservación de la secuencia dentro de los conglomerados y grupos. La red de los contactos inter-
5 helicoidales que estabilizan la estructura fusógena²⁹ se indican por debajo las secuencias. **La figura 6E describe el “VDGW” como la SEQ ID NO: 108, “IDGW” como la SEQ ID NO: 106, “INGW” como la SEQ ID NO: 105, y “IAGW” como la SEQ ID NO: 109.**

La figura 7 muestra la eficacia profiláctica y terapéutica de anti-H5 nAbs en
10 ratones. Los ratones fueron tratados con diferentes dosis de nAb ya sea antes o después del reto viral letal. Eficiencia profiláctica (a, b, g y h). Los ratones fueron tratados con anti-h5 nAbs o control mAb 24 horas después del reto letal intranasalmente (i.n.) con 10 dosis letales promedio (MLD₅₀) de los H5N1 o H1N1s. (a) Inyección intra-peritonea (i.p.) de 10 mg/kg de cualquiera de los tres
15 nAbs proporcionaron protección completa a los ratones retados con H5-VN04 (H5-VN04 (A/Vietnam/1203/04 (H5N1), Clade 1). Una dosis de anticuerpo más baja (2.5 mg/kg) también fue altamente protectora. (b) Protección profiláctica contra virus H5-HK97 (A/HongKong/483/97 (H5N1), Clade O) fue observada en 80-100% de los ratones tratados con 10 mg/kg de cualquiera de los tres nAbs. (g)
20 Cualquiera de los tres nAbs (a 10 mg/kg de una inyección) proveen completa protección de los ratones retados con virus H1-WSN33 (A/WSN/1933(H1N1)). (h) D8 y F10 protegieron completamente a ratones retados con H1-PR34 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) cuando se suministró 10 mg/kg de una sola inyección. A66 proveyó protección completa de ratones cuando 25 mg/kg de anticuerpo fue
25 suministrado en una sola inyección. Eficiencia terapéutica (c-f). Los ratones fueron inoculados con H5-VN04 e inyectados con nAbs a 24, 48, 72 hpi (c, e y f) o con H5-HK97 a 24 hpi (d). Tratamiento i.p. con 15 mg/kg (una dosis terapéuticamente

alcanzable en humanos) de cualquiera de 3 nAbs a 24h post-inoculación (hpi) protegió a 80-100% de los ratones retados con 10-veces el MLD₅₀ de cualquiera de los virus H5-VN04 o H5-HK97.

La figura 8 ilustra SDS-PAGE y análisis de filtración de gel de proteínas HA.

5 (a) El anticuerpo 2A fue obtenido de una selección objeto HA1 separada contra HA1 (residuo 11-325) fragmento de H5-TH04 (panel izquierdo).. H5 HA (cepa H5-VN04) utilizada para selección de coleccione se muestra en el panel derecho, (b) H5-VN04 (H5) y scFv complejo F10. HA0 fue completamente dividido en HA1 y HA2 por co-expresión con furina (panel izquierdo). Los complejos fueron formados
10 primero mezclando H5 y F10 en una proporción molar de 1:10, y luego purificada por filtración de gel.

La figura 9 muestra el enlace de anti-H5 scFv-Fcs con H5 o HA1 por ELISA y competencia ELISA. (a) 1 µg/mL de anti-H5 scFv-Fcs seguido por HRP-anti-humano IgG1 fueron utilizados para detectar el enlace de anti-H5 scFv-Fcs con
15 HA1 (H5-TH04) o H5 (H5-VN04) cubierto en un plato ELISA. Un anticuerpo selecto contra la subunidad HA1, mAb 2A scFv-Fc, enlazado a HA1 y H5. Los 10 potentes neutralizantes scFv-Fcs enlazados a H5 pero no a HA1. (b) 10¹² pfu de anti-H5 phage-scFvs fueron mezclados con 5 µg/mL de anti-H5 scFv-Fcs y añadidos a platos cubiertos H5 (H5-VN04), lavados, y seguidos de HRP-anti-M13 para
20 detectar phage-scFvs enlazado a H5. mAb 2A-Fc no compitió por el epítipo reconocido por los 10 H5-seleccionados Abs. Todos los H5-seleccionados scFv-Fcs compitieron cruzado. De estos, Ab F10 (phage-scFv) enlazado al trímero H5 fue el menos inhibido por los otros scFv-Fcs sugiriendo que tiene la mayor afinidad entre los Abs probados.

25 La figura 10 muestra la caracterización cinética y termodinámica del enlace de H5 con nAbs D8, F10 y A66-IgG1s- nAbs fueron capturados en un chip CM4 por IgG1 anti-humano; el trímero H5 (H5-VN04) en varias concentraciones (20, 10,

5, 2.5, 2.5, 1.25, 0.625 nM) fue inyectado sobre la superficie del chip. La cinética de enlace fue evaluada utilizando un modelo de enlace Langmuir 1:1. Las curvas de enlace documentado (con referencia en blanco substraída) y las curvas calculadas están superimpuestas de cerca. Cada valor k_a , k_d y K_D representa el promedio y el error estándar de los tres experimentos.

La figura 11 muestra la relación filogenética y comparación de secuencia entre subtipos HA. El árbol filogenético de los 16 subtipos HA de virus de influenza A basados en secuencias de aminoácidos- Cuatro conjuntos de subtipos HA están sombreados en diferentes colores. Las secuencias utilizadas para análisis fueron:

10 H1 (A/South Carolina/1/1918), H2 (A/Japan/305/1957), H3 (A/Aichi/2/1968), H4 (A/duck/Czechoslovakia/56), H5 (A/VietNam1203/2004), H6 (A/chicken/California/431/00), H7 (A/Netherland/219/03), H8 (A/turkey/Ontario/6118/68), H9 (A/swine/HK/9/98), H10 (A/chicken/Germany/IN49), H11 (A/duck/England/56), H12 (A/duck/Alberta/60/76), H13

15 (A/gull/Maryland/704/77), H14 (A/mallard/Astrakhan/263/1982), H15 (A/shearwater/West Australia/2576/79) y H16 (A/black-headed gull/Sweden/2/99).

La figura 12 muestra titers en pulmones, bazo y cerebro de ratones tratados con anti-H5 nAbs después de reto H5-VN04. Ratones BALB/c (n=5) fueron tratados por inyecciones i.p. de 15 mg/kg de mAb a 24, 48 o 72 horas después de

20 infección i.n. con 10 MLD₅₀ de H5-VN04. Los titers virales fueron determinados en pulmones, cerebro y bazo recolectado a 96 hpi. Los datos mostrados en una forma de caja-y-extensiones en donde la caja se extiende desde el 25° al 75° percentil, con una línea horizontal en la media. Las extensiones arriba y debajo de la caja indican los valores extremos. Los resultados de análisis estadísticos de pruebas-T

25 de estudiantes son anotados con un asterisco simple (*) para $p < 0.05$, y asteriscos dobles (**) para $p < 0.01$. Las flechas que cruzan el eje Y indican el límite de detección de la titración.

La figura 13 muestra el análisis FACS de anti-H5 nAbs enlazado con todos los conjuntos H1 Has incluyendo H1, H2, H5, H6, H11, H13 y H16. Células 293T fueron transfectadas transientemente con diferentes plásmidos expresando-HA, y enlace mAb a las células expresando-HA fue analizado por FACS. El anti-SARS mAb 80R fue utilizado como control. 2A-Fc es un anticuerpo H5 HA específico. La falta de enlace a un Grupo 2 HA, H7, también se muestra. Detalles de cepa viral de H11, H13 y H16 son: H11-MP74 (A/Duck/memphis/546/74 (H11N9)), H13-MD77 (A/Gull/MD/704/77 (H13N6)) y H16-DE06 (A/Shorebird/DE/172/06 (H16N3)).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La influenza A es un virus de sentido-negativo, RNA de filamento-sencillo, con proteínas de genoma codificado 10 de ocho-segmentos. Pertenece a la familia Orthomyxoviridae que incluye el género de virus de influenza A, B y C como se define por la antigenicidad de las proteínas nucleocapsidas y matriz. Generalmente, el virus de influenza A es además sub tipificado por dos proteínas de superficie, hemaglutinina (HA) que sujeta el virión a la célula huésped para entrada de células, y neuraminidasa (NA) que facilita el esparcimiento del virus progenie separando el ácido siálico sujeto al virus progenie o a la superficie celular.

Hay 16 subtipos HA y 9 subtipos NA que constituyen todos los subtipos de los virus de influenza A por varias combinaciones de HA y NA. Todas las combinaciones los 16 HA y 9 NA subtipos de virus son encontrados en agua de aves de corral. De los cientos de cepas de los virus de influenza A aviar, solo cuatro se sabe que causan infecciones a humanos: H5N1, H7N3, H7N7 y H9N2. En general, la infección humana con estos virus ha resultado en síntomas ligeros y

muy pocas enfermedades severas: solo ha habido un caso fatal de neumonía causada por H7N7. Sin embargo, la excepción es el altamente patogénico virus H5N1, para la cual no hay una inmunidad natural en humanos. La infidelidad de la polimerasa RNA y la presión selectiva de la inmunidad de huésped puede llevar a la acumulación de mutaciones y cambio en la superficie de antigenicidad de estas proteínas. Este cambio de antigenicidad es llamado deriva de antigenicidad. Adicionalmente, como resultado de su genoma segmentado, la mezcla de segmentos de gen pueden ocurrir si dos diferentes subtipos de virus de influenza A infectan a la misma célula. Por ejemplo, si un virus humano H3N2 y un virus a aviar H5N1 infectan al tiempo a un humano u otro miembro de las especies mamíferas, tal evento puede producir una novedosa H5N2. Este virus novedoso puede ser eficientemente transmitido de humano a humano porque la mayor parte de los segmentos de gen vienen del virus humano. Tal reorganización genética puede conllevar a un cambio de antígeno mayor, una así llamada derivación antigénica, que puede significar que la mayor parte de la población global no tendría anticuerpos neutralizantes contra el virus resultante. Tal situación, aunada con la alta mortalidad de la neumonía por influenza H5N1, es uno de los escenarios más temidos en el campo de la salud pública.

El virus de influenza hemaglutinina (HA) es el más variable antígeno de los virus de influenza, y es responsable por la entrada de virus a las células. Es sintetizado como un precursor trímero polipéptido HA0 que es separado post-translacionalmente a dos polipéptidos HA1 y HA2 enlazados por un vínculo disulfídico sencillo. La cadena HA1 de HA es responsable por la sujeción del virus a la superficie celular. HA2 media la fusión de membranas virales y celulares en endosomas, permitiendo la liberación del complejo ribonucleoproteínico al citoplasma. En contraste con HA1, la molécula HA2 representa una parte relativamente conservada de HA. Una segunda proteína inmunogénica de la

influenza es neuraminidasa (NA). Esta glicoproteína tetramérica es responsable por la liberación de viriones desde la superficie de ácidos siálico en las células del productor, y también pueden tener un rol en promover el acceso a células destino en las vías aéreas. Aunque los anticuerpos neutralizantes contra NA son
5 prospectivos en los animales y el hombre, en insuficiencia de datos en los mecanismos de acción. Un reporte reciente en la estructura de cristales de neuraminidasa N1 demostró la presencia de una cavidad adjunta a su lugar activo y puede ser aprovechada para desarrollar nuevas drogas anti-influenza, incluyendo anticuerpos. Este descubrimiento es particularmente importante en la
10 luz de reportes del surgimiento de resistencia a drogas de oseltamivir (Tamiflu) y zanamivir (Relenza) para los virus H5N1.

Ambas cadenas HA1 y HA2 de HA son inmuno genéticas y reactivas a anticuerpos con ambas cadenas como se ha demostrado después de infección natural en humanos. Mientras que los anticuerpos específicos a HA1 son
15 principalmente neutralizantes, diferentes mecanismos de neutralización de virus por HA1 Mabs específicos *in vitro* han sido descritos incluyendo el bloqueo al lugar receptor en HA1, inhibición intracelular de la fusión virus-célula, o inhibiciones simultáneas de sujeción e inhibiciones de fusión virus-célula, dependiendo de la concentración de anticuerpos. Aunque menos estudiado, la inhibición de la fusión
20 celular por anticuerpos anti-HA2 ha sido reportada.

Hace más de dos décadas, la molécula HA del subtipo H3 fue caracterizada por la secuenciación del HA de variaciones de desplazamiento antigénico y escape de mutaciones, y los epítopos antigénicos fueron mapeados en la estructura tridimensional de la molécula. Desde entonces, los lugares antigénicos
25 en H1, H2 y H5 de un virus aviar patógeno fueron mapeados en las estructuras tridimensionales de H3. Después del brote de infecciones H5N1 en humanos en Hong Kong en 1997 y el aislamiento del virus H9N2 de los casos humanos en

1999, las estructuras de rayos X de ambas proteínas fueron resueltas. Sin embargo el desplazamiento antigénico del aislado porcino (A/Duck/Singapore/3/97) de 1997 que fue utilizado para resolver la estructura, y más recientemente el aislamiento de cepas altamente patógenas, es significativa. Claramente, hay 28 cambios menores y dos potenciales cambios mayores entre los aislados porcinos (A/Duck/Singapore/3/97) y la cepa HPAI H5N1 (A/Vietnam1203/04).

Análisis filogenético de los genes H5 HA del brote 2004-2005 han mostrado dos linajes diferentes de genes HA, denominados clados 1 y 2. La cepa HPAI H5N1 (A/Vietnam1203/04) es un miembro del clado 1. Los virus en cada uno de estos clados son distribuidos en regiones geográficas no sobrepuestas de Asia. Los virus H5N1 de Indochina están justamente reunidas dentro del clado 1, mientras que H5N1 aislado de varios países alrededor son distintos de los aislados del clado 1, y pertenecen a un clado 2 más divergente. Los virus del clado 1 fueron aislados de humanos y pájaros en Vietnam, Tailandia y Camboya pero solamente de pájaros en Laos y Malasia. Los virus de clado 2 fueron encontrados en virus aislados exclusivamente de pájaros en China, Indonesia, Japón, y Corea del Sur. Los estudios epidemiológicos más recientes analizaron 82 virus H5N1 aislados de aves de corral a través de Indonesia y Vietnam, así como 11 aislados humanos del sur de Vietnam con datos secuenciales disponibles en bases de datos públicas, para referirse a preguntas relevantes a la introducción de virus, endemicidad y evolución³⁶. El análisis filogenético muestra que todos los virus de Indonesia forman un sublinaje H5N1 distintivo de virus con genotipo Z, sugiriendo que este brote fue originado probablemente de una sola introducción por el esparcimiento a través del país durante los últimos dos años. Actividades continuas de virus en Indonesia fueron atribuidas a la transmisión por medio del movimiento de aves de corral dentro del país, en vez de repetidas introducciones

por aves migratorias. En Indonesia y Vietnam, virus H5N1 han evolucionado a través del tiempo en grupos geográficamente distintos al interior de cada país.

Recientemente, la estructura de HA de A/Vietnam1203/4 fue resuelta. Comparaciones de su secuencia de aminoácidos con los genes HA de HPAI 2004 y 2005 aislados de los virus del clado 1 y 2 identificaron 13 posiciones de variación antigénica que están principalmente reunidas alrededor del dominio de enlace del receptor, mientras que el resto están dentro del dominio de esterasa vestigial. Regiones de variación antigénica han sido identificadas en serotipos H1 y H3 (Figura 1A). Para H1, estos lugares son designados Sa, Sb, Ca y Cb mientras que para H3, los lugares son designados A, B, C y D. Mutaciones de escape de H5 HAs pueden ser reunidas en tres epítomos; lugar 1: un giro expuesto (HA1 140-145) que se sobrepone al lugar antigénico A de H3 y Ca2 de H²; lugar 2: residuos HA1 156 y 157 que corresponden al lugar antigénico B en H3 serotipos; y 3) HA1 129-133, que está restringido al lugar Sa en serotipos H1 HAs y H9. En estudios recientes por Smith, hallazgos de selección positiva al nivel de aminoácidos indica que ocho recibos en las proteínas HA estaban bajo selección positiva (Figura 1B). Esta recibos incluyen cinco lugares antigénicos A y E (posiciones 83, 86, 138, 140 y 141); dos involucradas en el enlace receptor (posiciones 129 y 175); y la posición 156 es un lugar para glicosilación enlace-N potencial que está cerca al lugar de enlace-receptor. Los resultados además revelaron que tres residuos en HA (Val 86, Ser 129 y Thr 156) era más frecuentemente observados en aislados humanos que en aislados de pollo o pato y representan una adaptación temprana de H5N1 del genotipo Z a los humanos. Otro descubrimiento importante de estos estudios es que las diferencias filogenéticas entre sublinajes indonesios y vietnamitas también estaban reflejadas en diferencias significantes en reacción-cruzada antihigiénica entre estos dos grupos de virus. Específicamente, virus de Indonesia no reaccionaron al antisuero de hurón contra A/Vietnam1203/04, y virus

representativos de Vietnam no reaccionaron al antisuero de hurón contra virus de Indonesia IDN/5/06 y Dk/IDN/MS/04. Estos hallazgos están en concordancia con estudios iniciales con suero inmune humano y virus humano H5N1 de 1997 y 2003 en que estas cepas no era solamente filogenéticamente sino también antigénicamente diferentes. Por lo tanto, variaciones naturales así como mutaciones de escape sugieren que la evolución continua del virus puede impactar la decisión de cuál (es) cepa (s) debe (n) ser usadas para inmunización pasiva y activa.

La invención instantánea provee métodos para la identificación, producción y caracterización de anticuerpos monoclonales humanos anti-influenza.

Identificación y Caracterización de scFvs y Anticuerpos Monoclonales

se han identificado anti-HA mAbs humanos de alta afinidad, subtipo-cruzado, de amplia neutralización. Estos nAbs inhiben el proceso de fusión post-sujeción reconociendo un epítopo neutralizante novedoso y altamente conservado dentro de la región de tallo en un punto donde elementos clave del cambio de conformidad – el péptido de fusión y la superficie expuesta de la hélice αA – son traídas a una cercana aposición. Análisis estructural en el secuencia de todos los subtipos HA apuntan a la existencia de sólo dos variantes de este epítopo, correspondientes a las dos agrupaciones filogenéticas de HA (Grupo 1 y 2). Estos resultados elevan la posibilidad que un pequeño coctel de nAbs derivado de un subgrupo de cada grupo puede proveer una protección amplia contra la influenza temporal y pandémica.

Un reporte reciente utiliza células inmunes de pacientes infectados con H5N1 para aislar anti-HA nAbs. Sin embargo, sus epítopos y modos de acción no fueron reportados. Sorprendentemente, nosotros aislamos repetidamente nAbs que utilizan el mismo gen de línea germen VH, IGHV1-69*01, y codifica un giro CDR3 que contiene una tirosina a una posición equivalente a Y102, desde una

coleccion no inmune. Esto sugiere que anti-HA amplios de inmunidad cruzada pre-existen en la población nativa H5, probablemente dado a la exposición previa a H1, y, para donantes de coleccion nacidos antes de 1968, subtipos H2. La recurrencia de este segmento de línea germen VH, lo común de la tirosina CDR3
5 introducida por inserción N y/o ensamblaje de gen de línea germen D, y el uso promiscuo de los genes VL por los nAbs descubiertos en ambos estudios, sugieren que la frecuencia del precursor de segmentos reorganizados VH que pueden reconocer este epítipo es significativa. Esto eleva la posibilidad que con una exposición adecuada del epítipo F10 identificado aquí, estos nAbs de
10 espectro amplio pueden ser lúcidos prontamente *in vivo*. Mientras que la complejidad genética y estructural de los nAbs requeridos para proveer protección universal contra subtipos de virus en ambos grupos todavía es desconocida, nuestros datos parecen apuntar a una solución sorprendentemente simple.

Tres anti-HA-1 scFvs únicos fueron identificados por análisis de secuencia
15 de 58 clones positivos HA-1. Estos scFvs fueron designados como 38B y 1C. La secuencia de aminoácidos VH y VL de 2A se muestra en la Tabla 1B.

Diez anti-HA-0 scFvs únicos fueron identificados por análisis de secuencia
de 97 clones positivos HA-0. Estos scFvs fueron designados como 7, 8, 10, 17, 40, 66, 80, 88, 90, y 98. Seis diferentes genes VH y 10 genes diferentes VL fueron
20 descubiertos. Algunos scFvs compartían el mismo gen VH. Cinco de seis diferentes genes VH pertenecían a la familia de gen IGHV1-69. Tres de diez genes VL eran de cadena kappa.

2A scFv es un anticuerpo neutralizante moderado, 38B y 1C son anticuerpos no neutralizantes. Diez scFvs, 7, 8, 10, 17, 40, 66, 80, 88, 90, y 98 son
25 anticuerpos potencialmente neutralizantes. (Figura 6)

el ácido nucléico y secuencia aminoácido de los anticuerpos neutralizantes de influenza son provistos abajo:

Tabla 1A. Anticuerpo 2A Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V _H de 2A (SEQ ID NO:1)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGTGACAATGCTATCA GCTGGGTGCGACAGGCCCCAGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGGGGCATCA TTCCTATCTTTGGAAAACCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACG ATTACTGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGACCTGAGGAGCCTGA GATCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGATTCAGACGCGTATTA CTATGGTTCTGGGGGGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGT CTCCTCA
Cadena V _L de 2A (SEQ ID NO:3)
CTGCCTGTGCTGACTCAATCATCCTCTGCCTCTGCTTCCCTGGGATCCTCGGT CAAGCTCACCTGCACTCTGAGCAGTGGGCATAGTAACTACATCATCGCATGG CATCAACAGCAGCCAGGGAAGGCCCTCGGTACTTGATGAAGGTTAATAGTG ATGGCAGCCACACCAAGGGGGACGGGATCCCTGATCGCTTCTCAGGCTCCA GCTCTGGGGCTGACCGCTACCTCACCATCTCCAACCTCCAGTCTGAGGATGA GGCTAGTTATTTCTGTGAGACCTGGGACACTAAGATTCATGTCTTCGGAACTG GGACCAAGGTCTCCGTCCTCAG

Tabla 1B. Anticuerpo 2A Región Variable secuencia de aminoácido
Cadena V _H de 2A (SEQ ID NO:2)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV/SCKASGGTFSDNAISWVRQAPGQGLEWMGGIPI FGKPNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMDLRSLRSEDVAVYYCARDSDAYYYGSG GMDVWGQGTLVTVSS

Cadena V _L de 2A (SEQ ID NO:4)
LPVLTQSSSASASLGSSVKLTCTLSSGHSNYIIAWHQQPGKAPRYLMKVNSDGS
HTKGDGIPDRFSGSSSGADRYLTIS
NLQSEDEASYFCETWDTKIHVFGTGTKVSVL

Tabla 1C. Anticuerpo D7 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V _H de D7 (SEQ ID NO:5)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG
GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTCCTGGAGGTATCTTCAACACCAATGCTTTCAG
CTGGGTCCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGGTGGGAGGGGTCAT
CCCTTTGTTTCGAACAGCAAGCTACGCACAGAACGTCCAGGGCAGAGTCACC
ATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCTACATGGAGCTTACCAGCCTGA
GATCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGTAGTGGTTACCATTTT
AGGAGTCACTTTGACTCCTGGGGCCTGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
Cadena V _L de D7 (SEQ ID NO:9)
AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGCGTCTCCGGGGAAGACGG
TGACCATCTCCTGCACCGGCAGCAGTGGCAACATTGCCGCCAACTATGTGCA
GTGGTACCAACAACGTCCGGGCAGTGCCCCCACTACTGTGATCTATGAGGAT
GACCGAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGGT
CCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCAGGACTGAAGACTGAGGACGAGGC
TGACTACTACTGTCAGACTTATGATACCAACAATCATGCTGTGTTTCGGAGGAG
GCACCCACCTGACCGTCCTC

Tabla 1D. Anticuerpo H98 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V _H de H98 (SEQ ID NO:7)

CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTCCTGGAGGTATCTTCAACACCAATGCTTTCAG CTGGGTCCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGGTGGGAGGGGTCAT CCCTTTGTTTCGAACAGCAAGCTACGCACAGAACGTCCAGGGCAGAGTCACC ATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCTACATGGAGCTTACCAGCCTGA GATCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGTAGTGGTTACCATTTT AGGAGTCACTTTGACTCCTGGGGCCTGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
Cadena V _L de H98 (SEQ ID NO:11)
TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGAAACACGGGCAGAGG GTCACCATCTCTTGTTCTGGAGGCACCTCCAACATCGGACGTAATCATGTTAA CTGGTACCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTAAT GAACAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAATCTGGCA CCTCCGCCTCCCTGGCCGTGAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTA TACTGTGCATCATGGGATGACAACTTGAGTGGTTGGGTGTTCTGGCGGAGGG ACCAAGCTGACCGTCCTA

Tabla 1E. Anticuerpo D7 y H98 Región Variable cadena de secuencias de aminoácido
Cadena V _H de D7 y H98 (SEQ ID NO:6)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPGGIFNTNAFSWVRQAPGQGLEWVGGVIP LFRTASYAQNVQGRVTITADESTNTAYMELTSLSADTAVYYCARSSGYHFRSHF DSWGLGTLVTVSS
Cadena V _L de D7 (SEQ ID NO:8)
NFMLTQPHSVSASPGKTVTISCTGSSGNIAANYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDDR RPSGVPDRFSGSIDRSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQTYDTNNHAVFGGGTHLT

VL
Cadena V _L de H98 (SEQ ID NO:10)
SYELTQPPSASGKHGQRVTISCSGGTSNIGRNHVNWYQQLPGTAPKLLIYSNEQ RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAVSGLQSEDEADYYCASWDDNLSGWVFGGGTKL TVL

Tabla 1F. Anticuerpo D8 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V _H de D8 (SEQ ID NO:13)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCGCTTATGCTTTCA CCTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGCATCA CCGGAATGTTTGGCACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCAC GATTACCGCGGACGAACTCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGCTCCCTG ACATCTGAAGACACGGCCCTTTATTATTGTGCGAGAGGATTGTATTACTATGA GAGTAGTCTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
Cadena V _L de D8 (SEQ ID NO:17)
CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAG TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTC TCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACCTCATGATTTATGAGG TACTAAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGCCTCCAAGTCTGG CAACACGGCCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGA TTATTTCTGCTGCTCATATGCAGGCCACAGTGCTTATGTCTTCGGAACCTGGGA CCAAGGTCACCGTCCTG

Tabla 1G. Anticuerpo D80 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V _H de D80 (SEQ ID NO:15)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG GTGAAGGTCTCCTGCAGGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCGCTTATGCTTTCA CCTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGCATCA CCGGAATGTTTGGCACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCAC GATTACCGCGGACGAACTCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTGAGCTCCCTG ACATCTGAAGACACGGCCCTTTATTATTGTGCGAGAGGATTGTATTACTATGA GAGTAGTCTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
Cadena V _K de D80 (SEQ ID NO:19)
GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTCTTAGCAGCAAGTACTTAGC CTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG ACAGACTTCACCCTCACCATCAGTAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTA TTCCTGTCAGCAGTATGATGGCGTACCTCGGACGTTCTGGCCAAGGGACCACG GTGGAAATCAAA

Tabla 1H. Anticuerpo D8 y D80 Región Variable cadena de secuencias de aminoácido
Cadena V _H de D8 y D80 (SEQ ID NO:12)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSAYFTWVRQAPGQGLEWMGGIT GMFGTANYAQKFQGRVTITADELTSTAYMELSSLTSEDALYYCARGLYYYESSL DYWGQGTLVTVSS

Cadena V _L de D8 (SEQ ID NO:14)
QSVLTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIYEVT KRPSGVPDRFSASKSGNTASLTVSGLQAEDEADYFCCSYAGHSAYVFGTGTKVT VL
Cadena V _K de D80 (SEQ ID NO:16)
EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSLSSKYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYSCQQYDGVPRTFGQGTTVEIK

Tabla 1I. Anticuerpo F10 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V _H de F10 (SEQ ID NO:21)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG GTGAAGGTCTCCTGCACGTCCTCTGAAGTCACCTTCAGTAGTTTTGCTATCAG CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGCTGGGAGGGATCAG CCCTATGTTTGGAACACCTAATTACGCGCAGAAGTTCCAAGGCAGAGTCACCA TTACCGCGGACCAGTCCACGAGGACAGCCTACATGGACCTGAGGAGCCTGA GATCTGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCGAGATCTCCTTCTTACATTTGT TCTGGTGGAACCTGCGTCTTTGACCATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG TCTCCTCA
Cadena V _L de F10 (SEQ ID NO:25)
CAGCCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCCAAGGGCTTGAGACAGACC GCCACACTCACCTGCACTGGGAACAGCAACAATGTTGGCAACCAAGGAGCAG CTTGGCTGCAGCAGCACCAGGGCCACCCTCCCAAACCTCCTATCCTACAGGAA TAATGACCGGCCCTCAGGGATCTCAGAGAGATTCTCTGCATCCAGGTCAGGA AACACAGCCTCCCTGACCATTACTGGACTCCAGCCTGAGGACGAGGCTGACT ATTACTGCTCAACATGGGACAGCAGCCTCAGTGCTGTGGTATTCTGGCGGAGG

GACCAAGCTGACCGTCCTA

Tabla 1J. Anticuerpo E90 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V _H de E90 (SEQ ID NO:23)
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCG GTGAAGGTCTCCTGCACGTCCTCTGAAGTCACCTTCAGTAGTTTTGCTATCAG CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGCTGGGAGGGATCAG CCCTATGTTTGGAACACCTAATTACGCGCAGAAGTTCCAAGGCAGAGTCACCA TTACCGCGGACCAGTCCACGAGGACAGCCTACATGGACCTGAGGAGCCTGA GATCTGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCGAGATCTCCTTCTTACATTTGT TCTGGTGGAACCTGCGTCTTTGACCATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG TCTCCTCA
Cadena V _L de E90 (SEQ ID NO:27)
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCA GTTTGCAAAGAGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGA CTTCACTCTCACCATTAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACT GTCAGCAGTATGATAGTTCACCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTAGA GATCAAA

Tabla 1K. Anticuerpo F10 y E90 Región Variable secuencias de aminoácido
Cadena V _H de F10 y E90 (SEQ ID NO:18)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCTSSSEVTFSSFAISWVRQAPGQGLEWLGGISPM FGTPNYAQKFQGRVTITADQSTRTAYMDLRSLRSEDTAVYYCARSPSYICSGGTC VFDHWGQGTLVTVSS

Cadena V _L de F10 (SEQ ID NO:20)
QPGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLSYRNN DRPSGISERFSASRSGNTASLTITGLQPEDEADYYCSTWDSSLSAVVFGGGTKLT VL
Cadena V _L de E90 (SEQ ID NO:22)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQR GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYDSSPYTFGQGTKVEIK

Tabla 1L. Anticuerpo G17 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V _H de G17 (SEQ ID NO:29)
CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA GTGAAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGAGTCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAG TTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCAT CGGTGTCTTTGGTGTACCAAAGTACGCGCAGAACTTCCAGGGCAGAGTCACA ATTACCGCGGACAAACCGACGAGTACAGTCTACATGGAGCTGAACAGCCTGA GAGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGCCCGGGTACTACG TAGGAAAGAATGGTTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTC TTCA
Cadena V _L de G17 (SEQ ID NO:31)
TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCCAAGGGCTTGAGACAGACCG CCATACTCACCTGCACTGGAGACAGCAACAATGTTGGCCACCAAGGTACAGC TTGGCTGCAACAACACCAGGGCCACCCTCCCAAACCTCCTATCCTACAGGAAT GGCAACCGGCCCTCAGGGATCTCAGAGAGATTCTCTGCATCCAGGTCAGGAA

ATACAGCCTCCCTGACCATTATTGGACTCCAGCCTGAGGACGAGGCTGACTA
CTACTGCTCAGTATGGGACAGCAGCCTCAGTGCCTGGGTGTTCGGCGGAGG
GACCAAGCTGACCGTCCTA

Tabla 1M. Anticuerpo G17 Región Variable secuencia de aminoácido

Cadena V_H de G17 (SEQ ID NO:24)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKTSGVTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIGV
FGVPKYAQNFQGRVTITADKPTSTVYMELNSLRAEDTAVYYCAREPGYYVGKNG
FDVWGQGTMVTVSS

Cadena V_L de G17 (SEQ ID NO:26)

SYELTQPPSVSKGLRQTALTCTGDSNNVGHQGTAWLQQHQGHPPKLLSYRNG
NRPSGISERFSASRSGNTASLTIIGLQPEDEADYYCSVWDSSLSAWVFGGGTKLT
VL

Tabla 1N. Anticuerpo H40 Región Variable secuencia de ácido nucléico

Cadena V_H de H40 (SEQ ID NO:33)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGGAAGCCTGGGGCCTCA
GTGAAGGTCTCATGTAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGTTATTATATTCA
CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGGTGGATCAA
CCCTATGACTGGTGGCACAACTATGCACAGAAGTTTCAGGTCTGGGTCACC
ATGACCCGGGACACGTCCATCAACACAGCCTACATGGAGGTGAGCAGGCTGA
CATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGGGGGCTTCCGTATTACG
ATATTTTGACTGGCAGCCCGAGGCTCTTGATATCTGGGGCCTCGGGACCACG
GTCACCGTCTCCTCA

Cadena V _L de H40 (SEQ ID NO:35)
CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACG GCCAGCATTCCCTGTGGGGGGAACAACATTGGAGGCTACAGTGTACACTGGT ACCAACAAAAGCCGGGGCCAGGCCCCCCTCTTGGTCATTTATGACGATAAAGA CCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCGCCAACCTCTGGGAGCAC GGCCACCCTGACAATCAGCAGGGTCTGAAGCCGGGGATGAGGGCGACTACTA CTGTCAGGTGTGGGATAGTGGTAATGATCGTCCGCTGTTCGGCGGAGGGAC CAAGCTGACCGTCCTA

Tabla 10. Anticuerpo H40 Región Variable secuencia de aminoácido
Cadena V _H de H40 (SEQ ID NO:28)
QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINP MTGGTNYAQKFQVWVTMTRDTSINTAYMEVSRLTSDDTAVYYCARGASVLR YFD WQPEALDIWGLGTTVTVSS
Cadena V _L de H40 (SEQ ID NO:30)
QPVLTQPPSVSVAPGQTASIPCGGNNIGGYSVHWYQQKPGQAPLLVIYDDKDRP SGIPERFSGANSGSTATLTISRVEAGDEGDYYCQVWDSGNDRPLFGGGTKLTVL

Tabla 1P. Anticuerpo A66 Región Variable secuencia de ácido nucléico
Cadena V _H de A66 (SEQ ID NO:37)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCG GTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCCCTTCAGCATGACTGCTTTCA CCTGGCTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGTGGGATCA GCCCTATCTTTCGTACACCGAAGTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCAC GATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCAACATGGAGCTGACCAGCCTG

AAATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACCCTTTCCTCCTACCA
ACCGAATAATGATGCTTTTGCTATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCT
CTTCA

Cadena V_K de A66 (SEQ ID NO:39)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA
GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTG
GTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC
AACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTCTATTT
CTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCAATTCGGCCAAGGGACACGACTGGAG
ATTAAA

Tabla 1Q. Anticuerpo A66 Región Variable secuencia de aminoácido

Cadena V_H de A66 (SEQ ID NO:32)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGPFSMTAFTWLRQAPGQGLEWMGGIS
PIFRTPKYAQKFQGRVTITADESTNTANMELTSLSKSEDTAVYYCARTLSSYQPNN
DAFAIWGQGTMVTVSS

Cadena V_K de A66 (SEQ ID NO:34)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQYGSSPQFGQGTRLEIK

Tabla 1R. Anticuerpo E88 Región Variable secuencia de ácido nucléico

Cadena V_H de E88 (SEQ ID NO:40)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCG

GTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCCCTTCAGCATGACTGCTTTCA
CCTGGCTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGTGGGATCA
GCCCTATCTTTCGTACACCGAAGTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCAC
GATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCAACATGGAGCTGACCAGCCTG
AAATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACCCTTTCCTCCTACCA
ACCGAATAATGATGCTTTTGCTATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCT
CTTCA

Cadena V_L de E88 (SEQ ID NO:42)

CTGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGG
GTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAA
CTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTAAT
AATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAGGTCAGGCA
CCTCAGCCTCCCTGGCCATCATTGGACTCCGGCCTGAGGATGAAGCTGATTA
TACTGTCAGTCGTATGACAGCAGGCTCAGTGCTTCTCTCTTCGGAACTGGGA
CCACGGTCACCGTCCTC

Tabla 1S. Anticuerpo E88 Región Variable secuencia de aminoácido

Cadena V_H de E88 (SEQ ID NO:36)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGPFSMTAFTWLRQAPGQGLEWMGGIS
PIFRTPKYAQKFQGRVTITADESTNTANMELTSLKSEDTAVYYCARTLSSYQPNN
DAFAIWGQGTMVTVSS

Cadena V_L de E88 (SEQ ID NO:38)

LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQR
PSGVPDRFSGSRSGTSASLAIIGLRPEDEADYYCQSYDSRLSASLFGTGTTVTVL

Las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes complementarias de cadenas pesada y liviana de los anticuerpos neutralizantes de influenza se muestran en la tabla 2 abajo y en la Figura 4.

5 Tabla 2

Anticuerpo	CDR1	CDR2	CDR3
CONSENS US	SYAFS (SEQ ID NO: 43)	GIIPMFGTPNYAQKFQ G (SEQ ID NO: 51)	SSGYYYGGGFDDV (SEQ ID NO: 59)
07/H98VH	TNAFS (SEQ ID NO: 44)	GVIPLFRTASYAQNVD G (SEQ ID NO: 52)	SSGYHFGRSHFDS (SEQ ID NO: 60)
08/D80VH	AYAFT (SEQ ID NO: 45)	GIIGMFGTANYAQKFQ G (SEQ ID NO: 53)	GLYYYESSLDY (SEQ ID NO: 61)
F10/90VH	SFAIS (SEQ ID NO: 46)	GISPMFGTPNYAQKF QG (SEQ ID NO: 54)	SPSYICSGGTCVFDH (SEQ ID NO: 62)
G17VH	SYAIS (SEQ ID NO: 47)	GIIGVFGVPKYAKKFQ G (SEQ ID NO: 55)	EPGYVVGKNGFDV (SEQ ID NO: 63)
H40VH	GYIYH (SEQ ID NO: 48)	WINPMTGGTNYAQKF Q (SEQ ID NO: 56)	GASVLRVFDWQPEAL DI (SEQ ID NO: 64)
A66VH	MTAFT (SEQ ID NO: 49)	GISPIFRTPKYAKKFQ G (SEQ ID NO: 57)	TLSSYQPNDAFAI (SEQ ID NO: 65)
2AVH	DNAIS (SEQ ID NO: 50)	GIIPIFGKPNYAKKFQG (SEQ ID NO: 58)	DSDAYYYGSGGMDV (SEQ ID NO: 66)
CONSENS US	TGSSSNIGNYVA (SEQ ID NO: 67)	SNSDRPS (SEQ ID NO: 79)	QSYDSL SAYV (SEQ ID NO: 91)
D7VL	TGSSSNIAANYVQ	EDDRPS (SEQ ID	QSYDTNNHAV (SEQ

	(SEQ ID NO: 68)	NO: 80)	ID NO: 92)
DD8VL	TGTSSDVGGYNS VS (SEQ ID NO: 69)	EVTKRPS (SEQ ID NO: 81)	CSYAGHSAYV (SEQ ID NO: 93)
F10VL	TGNSNNVGNQGA A (SEQ ID NO: 70)	RNNDRPS (SEQ ID NO: 82)	STWDSSLSAVV (SEQ ID NO: 94)
G17VH	TGDSNNVGHQGT A (SEQ ID NO: 71)	RNGNRPS (SEQ ID NO: 83)	SVWDSSL\$AWV (SEQ ID NO: 95)
H40VH	GGNNIGGYSVH (SEQ ID NO: 72)	DDKDRPS (SEQ ID NO: 84)	QVWDSGNDRPL (SEQ ID NO: 96)
A66VH	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 73)	DASNRAT (SEQ ID NO: 85)	QQYGSSPQV (SEQ ID NO: 97)
D80VL	RASQSLSSKYLA (SEQ ID NO: 74)	GASSRAT (SEQ ID NO: 86)	QQYDGVPRT (SEQ ID NO: 98)
E88VL	TGSSSNIGNYVA (SEQ ID NO: 75)	SNNQRPS (SEQ ID NO: 87)	QSYDSRLSASL (SEQ ID NO: 99)
E90VK	SGSSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 76)	AASSLQR (SEQ ID NO: 88)	QQYDSSPYT (SEQ ID NO: 100)
H98VL	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 77)	SNEQRPS (SEQ ID NO: 89)	ASWDDNLSGWV (SEQ ID NO: 101)
2AVL	TLSSGHSNYIIA (SEQ ID NO: 78)	VNSDGSHTKGD (SEQ ID NO: 90)	ETWDTKIHV (SEQ ID NO: 102)

Aquellos hábiles en el arte reconocerán que scFvs y anticuerpos monoclonales adicionales con diferentes afinidades de enlace también pueden ser terapéuticamente efectivos. Por ejemplo, anticuerpos y scFvs que tienen

afinidades de enlace que van desde más o menos 1 pM a más o menos 200 mM pueden también ser efectivos terapéuticamente.

Neutralización de H5N1 con anticuerpos anti-influenza.

5

Virus pseudotipo H5 fueron incubados con svFv bivalente y anticuerpos de longitud y de anticuerpo-virus fue contactada con células 293T. La inefectividad fue cuantificada midiendo la actividad luciferasa en las células objetivo. Los anticuerpos D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, y H98 tienen una actividad de neutralización potente contra H5. Los anticuerpos D8, F10 y A66 también neutralizaron cruzado a H1N1, potencialmente neutralizaron la cepa H1-SC/1918 y neutralizaron moderadamente la cepa H1-PR-34 (Figuras 4A y 4B)

Caracterización de los epítomos 8, 10 y 66.

15

El mapeo primario de epítomos de 8, 10 y 66 enlazados a la proteína hemaglutinina (HA) de influenza mostraron que los epítomos de estos tres anticuerpos eran similares y ubicados en posiciones 307 en HA1 y en posiciones 52, 59, 65 y 93 en HA2. Este epítomo está compuesto de la proteína hemaglutinina que no es despojada por el virus. Esto no se parece a la mayor parte de los otros anticuerpos hormiga-influenza conocidos que enlazan la proteína neuraminidasa que es despojada por el virus.

Caracterización estructural del epítomo nAb

25

El epítomo y modo de enlace de uno de los nAbs, F10, disolviendo la estructura de cristal de su fragmento scFv en complejo con HA (H5-VN04) a una resolución de 3.2 Å, y por mutagénesis. (Fig. 6 y Tabla 4)

en el complejo, cada trímero enlaza tres moléculas de F10, en lugares de simetría-relacionada, enterrando $\sim 1500 \text{ \AA}^2$ de superficie de proteína por anticuerpo; la estructura del H5 en sí misma no es significativamente alterada por el enlace F10. HA he sintetizado en una cadena sencilla, HA0, que es activada por la separación proteolítica en dos subunidades, HA1 y HA2. La separación conlleva al entierro de "péptido de fusión" (compuesto de los primeros ~ 21 residuos de HA2) al tallo de membrana-proximal. El enlace F10 ocurre exclusivamente en esta región (Fig. 6), haciendo contacto íntimo con el péptido de fusión, elementos de HA1 y HA2 (los cuales son integrales a la estructura de esta región) y asegurar el péptido en su lugar en la confrontación de pH neutra, así como el largo gancho helicoidal de HA2 que sobrelleva un masivo cambio de conformación en el pH ácido de forma que propulsa el péptido de fusión de su bolsillo membrana-proximal viral a la superficie distal del virus, donde puede provocar fusión con la membrana endosomal.

La cadena pesada de F10 juega el rol mayor en el enlace de H5, utilizando las puntos de sus tres regiones complementaria-determinante (CDRs). Cada molécula F10 hace contacto con ambas unidades HA1 y HA2 dentro de un solo monómero del trímero HA (Fig 6). La región de contacto comprende bolsillo formado por parte del péptido de fusión HA2, con elementos de HA1 en un lado y una cara expuesta de hélice αA de HA2 en la otra (Fig. 6). Una tríada de residuos de anticuerpo – F55 y M54 de CDR H2, y Y102 de CDR H3 – forman puntos de contacto mayores. El anillo de fenilo de F55 se ubica a través de una superficie plana formada por una curva prominente de la curva de péptido de fusión (residuos HA2 DGW 19₂-21₂ (esquema de numeración H3; subíndices 1 y 2 se refieren a cadenas HA1 y HA2)) y las cadenas-laterales aromáticas de dos histidinas de flanqueo (residuos 18₁ y 38₁) y un triptófanom W21₂, que forma la parte posterior del bolsillo. La cadena-lateral de M54 también contacta los anillos

aromáticos de W21₂ y H38₁, así como la cadena-lateral de I45₂ de la hélice αA, mientras su cadena-principal enlaces-carbonilo oxígeno hidrógeno con la cadena-lateral de H38₁. Y102 inserta su cadena-lateral en una grieta hidrofóbica creada por cuatro cadenas-laterales de la hélice αA, y también enlaces-hidrogeno a una
5 columna carbonilo (D19₂) del péptido de fusión. La curva CDR H1 hace múltiples contactos con el extremo terminal-C DE la hélice αA y una curva de HA1 en la base de la región de cabeza (Figuras 6B y 6C).

En paralelo, experimentos de mutagénesis fueron llevados a cabo en la hélice αA para ayudar a definir el epítipo (Fig. 6). Mutaciones en 3 residuos que
10 directamente contactaron el anticuerpo: V52A/E, N53A e I56A, significativamente redujeron o eliminaron el enlace de anticuerpo, mientras que en la mutación conservativa, V52L, no tuvo efecto. Como control, mutaciones en una cara expuesta diferente de la hélice, que no entró en contacto con el anticuerpo, no tuvo efecto en el enlace del anticuerpo (Fig. 4D). Por lo tanto la mutagénesis del la
15 hélice αA es completamente consistente con el epítipo definido cristalográficamente en F10. Además, los otros dos nAbs, para los cuales no existen datos estructurales, mostraron un perfil de enlace casi idéntico a nAb-mutado, indicativo de un epítipo con sobre posición cercana y consistente con enlace competitivo (Fig. 6, Fig. 9). Tomados juntos, concluimos que todos los tres
20 nAbs neutralizan virus estabilizando la conformación de pH neutral de Ha en una región que provee el desencadenador (muy probablemente la liberación del péptido de fusión desde su bolsillo) para cambios de conformación que conllevan al estado fusio-genético.

25 Anticuerpos

Como se usa aquí, el termino "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobina y porciones activas inmunológicamente de moléculas de

inmunoglobulina (Ig), p.e., moléculas que contienen un lugar de enlace de antígeno que específicamente se enlaza (hace inmunoreacción con) un antígeno. Con “específicamente se enlaza” o “hace inmunoreacción con” se quiere decir que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona con otros polipéptidos. Los anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, policlonales, monoclonales, quiméricos, dAb (anticuerpo de dominio), cadena simple, fragmentos F_{ab} , $F_{ab'}$ y $F_{(ab')_2}$, scFvs y colecciones de expresión F_{ab} .

Un molécula polipéptida de cadena simple Fv (“scFv”) es un heterodímero enlazado covalentemente $V_H::V_L$, que puede ser expresado de una fusión de genes incluyendo genes de codificación V_H - y V_L - enlazados con un péptido de codificación enlazador. (Véase Houston et al. (1988) Proc Nat Acad Sci USA 85(16):5879-5883). Un número de métodos han sido descritos para discernir estructuras químicas para convertir el agregado natural, pero separadas químicamente, cadenas polipéptidas livianas y pesadas de la región V de anticuerpo en moléculas scFv, que se doblaran en una estructura tridimensional substancialmente similar a la estructura de un lugar de enlace-antígeno. Véase, p.e., U.S. Patent Nos. 5,091,513; 5,132,405; y 4,946,778.

Colecciones ingenuas humanas scFv muy grandes pueden y han sido creadas para ofrecer una fuente grande de genes de anticuerpo reorganizados contra una plétora de moléculas objetivo. Colecciones más pequeñas pueden ser construidas de individuos con enfermedades infecciosas en busca de aislar anticuerpos específicos de alguna enfermedad. (Véase Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9339-43 (1992); Zebedee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3175-79 (1992)).

En general, moléculas de anticuerpos obtenidas de humanos se relacionan a cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que se diferencian entre sí por

la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Algunas clases también tienen subclases, como IgG₁, IgG₂, y otras. Además, en humanos, la cadena liviana puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

El término "lugar de enlace de antígeno" o "porción de enlace" hace referencia la parte de la molécula de inmunoglobina que participa en el enlace del antígeno. El lugar de enlace del antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variable ("V") de terminal-N de las cadenas pesada ("H")y liviana ("L"). Tres extensiones altamente divergentes al interior de las regiones V DE las cadenas pesada y liviana, referidos como "regiones híper variables", son interpuestas entre extensiones de costado más conservadoras conocidas como "regiones de marco de trabajo", o "FRs". Por lo tanto el término "FR" se refiere a secuencia de aminoácidos que son naturalmente encontradas entre, y adjuntos a, regiones híper variables en inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones híper variables de una cadena liviana y las tres regiones híper variables de una cadena pesada son dispuestas relativas entre sí en un espacio tridimensional para formar una superficie enlazante de antígeno. La superficie enlazante de antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno enlazado, y las tres regiones híper variables de cada una de las cadenas pesada y liviana se refiere como "regiones complementarias-determinantes", o "CDRs".

Como se usa aquí, el término "epítipo" incluye cualquier proteína determinante capaz de enlazarse específicamente a una inmunoglobulina, a un scFv, o a un receptor de célula T. Epitopicos determinantes normalmente consisten de grupos de superficies químicamente activas de moléculas como aminoácidos o cadenas de lado de azúcar y usualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga

específicas. Por ejemplo, anticuerpos pueden ser creados contra péptidos de terminales-N o terminales-C DE un polipéptido.

Como se usa aquí, los términos “enlace inmunológico”, y “propiedades de enlace inmunológico” se refieren a interacciones no covalentes del tipo del que
5 ocurren entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para adecuar la inmunoglobulina es específica. La fuerza, o afinidad de las interacciones de enlace inmunológico pueden ser expresadas en términos de una constante disociación (K_d) de la interacción, donde una K_d más pequeña representa una afinidad mayor. Las propiedades de enlace inmunológico de polipéptidos seleccionados puede ser
10 cuantificada utilizando métodos bien conocidos en el arte. Uno de dichos métodos conlleva medir las proporciones de lugares de enlace de antígeno / formación de complejo de antígeno y disociación, en donde dichas proporciones dependen en las concentraciones de los patrones complejos, la afinidad de la interacción, y parámetros geométricos que influyen de forma igual la proporción en ambas
15 direcciones. Por lo tanto la “constante en proporción” (K_{on}) y la “constante fuera de proporción” (K_{off}) pueden ser determinadas calculando las concentraciones y las proporciones actuales de asociación y disociación. (Véase Nature 361: 186-87 (1993)). El radio entre K_{off}/K_{on} permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados a la afinidad, y es igual a la constante disociación K_d . (Véase,
20 *generalmente*, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Un anticuerpo de la presente invención se dice que específicamente se enlaza a un epítipo de influenza cuando el equilibrio de la constante de enlace (K_d) es $\leq 1 \mu M$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$, más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$, y más preferiblemente $\leq 100 \text{ pM}$, como es medido por ensayos como los ensayos de enlace radioligand o
25 ensayos similares conocidos a aquellos con habilidad en el arte.

Una proteína de influenza (*p.e.* HA o neuraminidasa) de la invención, o un derivado, fragmento, análogo, homólogo u ortólogo del mismo puede ser utilizado

como gen inmunológico en la generación de anticuerpos que se enlazan inmunológica-específicamente estos componentes de proteínas.

Aquellos con habilidad en el arte reconocerán que es posible determinar, sin la experimentación de vida, si un anticuerpo monoclonal humano tiene la misma especificidad que un anticuerpo monoclonal humano de la invención estableciendo si el primero previene que el último se enlace a la proteína HA del virus de influenza. Si el anticuerpo monoclonal humano que se está probando compite con el anticuerpo monoclonal humano de la invención, como se muestra en una disminución en la capacidad de enlace del anticuerpo monoclonal humano de la invención, entonces es muy probable que los dos anticuerpos monoclonales se enlacen al mismo, o muy parecido, epítipo.

Otra forma de terminar si un anticuerpo monoclonal humano tiene la especificidad de un anticuerpo monoclonal humano de la invención es la pre incubación del anticuerpo monoclonal humano de la invención con la proteína de influenza HA, que es normalmente reactiva, y luego añadir el anticuerpo monoclonal humano que se está probando para determinar si el anticuerpo monoclonal humano probado es inhibido en su habilidad de enlazarse con la proteína HA. Si el anticuerpo monoclonal humano que está siendo probado es inhibido entonces, con toda probabilidad, éste tiene la misma, o funcionalmente equivalente, especificidad de epítipo como el anticuerpo monoclonal de la invención. La examinación de anticuerpos monoclonales humanos de la invención, también puede ser llevada a cabo utilizando el virus de influenza y determinando si el anticuerpo monoclonal de prueba es capaz de neutralizar el virus de influenza.

Varios procedimientos conocidos dentro del arte pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra una proteína de la invención, o contra derivados, fragmentos, análogos, homólogos u ortólogos del mismo. (Véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual,

Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, incorporado aquí por referencia).

Los anticuerpos puede ser purificados por técnicas bien conocidas, como cromatografía de afinidad utilizando proteínas A o proteínas G, que proveen
5 principalmente la fracción IgG de un suero inmune. Subsecuentemente, o alternativamente, el antígeno específico que es el objetivo de la inmunoglobulina buscada, o un epítipo de la misma, puede ser inmovilizada en una columna para purificar el anticuerpo inmune específico por la cromatografía de inmuno-afinidad. La purificación de inmunoglobulinas se discute, por ejemplo, por D. Wilkinson
10 ((The Scientist, publicado por The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28).

El término "anticuerpo monoclonal" o "MAb" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa aquí, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie molecular de molécula de anticuerpo
15 que consiste de un único producto del gen de cadena liviana y un único producto de gen de cadena pesada en particular, las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Las MAbs contienen un lugar de enlace de antígeno capaz de inmuno-reaccionar con un epítipo particular de los antígenos
20 caracterizados por una afinidad de enlace única para el mismo.

Anticuerpos monoclonales pueden ser preparados utilizando métodos hibridoma, así como los descritos por Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un métodos hibridoma, un ratón, hámster, u otro animal huésped apropiado, es típicamente inmunizado con un agente inmunizante para obtener linfocitos que
25 producen o son capaces de producir anticuerpos que se enlazarán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*.

El agente inmunizante incluirá típicamente la proteína antígeno, un fragmento de la misma a una proteína fusión de la misma. Generalmente, ya sea linfocitos de sangre periférica son utilizados sin células de origen humano son necesitadas, o células del bazo o células de ganglio linfático son utilizadas y

5 fuentes mamíferas no humanas son necesitadas. Los linfocitos son entonces fusionados con una línea de células inmortalizadas utilizando un agente de fusión adecuado, como el glicol polietileno, para formar una célula hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Las líneas de células inmortalizadas son normalmente células mamíferas

10 transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino o humano. Usualmente, líneas de células de mieloma de rata o ratón son empleadas. Las células hibridoma puede ser cultivadas en un medio de cultivo apropiado que contenga preferiblemente una o más sustancias que inhiban el crecimiento o supervivencia de las células no fusionadas, inmortalizadas. Por

15 ejemplo, si las células paternas les falta la enzima hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), el medio de cultivo para las hibridomas típicamente incluirá hypoxanthine, aminopterin, y thymidine ("medio HAT"), cuyas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

20 Las líneas de células inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente soportan una expresión estable de alto nivel de anticuerpos por las células seleccionadas productoras de anticuerpos, y son sensitivas a un medio como el medio HAT. Líneas de células inmortalizadas más preferidas son líneas mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, del

25 Centro de Distribución de Células Salk Insitute, San Diego, California y la Colección de Cultivos Tipo Americana, Manassas, Virginia. Líneas de células humanas mieloma y ratón-humanas heteromieloma también han sido descritas

para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase Kozbor, 1. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63)).

El medio de cultivo en el que las células hibridomas son cultivadas pueden
5 ser ensayados para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de enlace de anticuerpos monoclonales producido por las células hibridomas es determinado por la inmuno precipitación o por un ensayo de enlace *in vitro*, así como el ensayo radio inmunológico (RIA) o ensayo inmuno absorbente de enzimas enlazadas (ELISA). Dichas técnicas y
10 ensayos son conocidos en el arte. La afinidad de enlace de los anticuerpos monoclonales puede, por ejemplo, ser determinado por el análisis Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980). Aún más, en aplicaciones terapéuticas de anticuerpos monoclonales, es importante identificar anticuerpos que tengan alto grado de especificidad y una alta afinidad de enlace hacia el
15 antígeno objetivo.

Después que las células hibridomas deseadas han sido identificadas, los clones pueden ser sub clonados limitando los procedimientos de dilución y crecimiento por métodos estándar. (Véase Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Medios de cultivo
20 adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, Dulbecco's Modified Eagle's Medium y el medio RPMI-1640. Alternativamente, las células hibridomas pueden ser cultivadas *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los sub clones pueden ser aislados o purificados de los medios de cultivo o fluido ascitis por procedimientos
25 convencionales de purificación de inmunoglobulina como, por ejemplo, proteína Sefarosa-A, cromatografía hidroxipatita, gel electroforesis, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Anticuerpos monoclonales también pueden ser métodos de recombinación de DNA, así como los descritos en U.S. Patent No. 4,816,567. La codificación de DNA de los anticuerpos monoclonales de la invención puede ser prontamente aislada y secuenciada utilizando procedimientos convencionales (*p.e.*, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de enlazar específicamente a genes codificando las cadenas pesada y liviana de anticuerpos de murinos). Las células híbridomas de la invención sirven como una fuente preferida de dicho DNA. Una vez aislado, el DNA puede ponerse en vectores de expresión, que luego son transferidos hacia las células huésped así como células COS de simios, células de ovario de hámster chinos (CHO), o células mieloma que de otra forma no producen la proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinadas. El DNA también puede ser modificado, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de código para dominios constantes de cadenas pesada y livianas humanas en lugar de secuencias de murinos homólogos (véase U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison, Nature 368,812-13 (1994)) o juntando covalentemente a las secuencias de código de inmunoglobulina todas o parte de las secuencias codificadas para un polipéptido no de inmunoglobulina. Tal polipéptido de no inmunoglobulina puede ser sustituido por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede ser sustituido por dominios variables de un lugar de antígeno combinado de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Anticuerpos completamente humanos son moléculas de anticuerpo en los cuales la secuencia completa de ambas cadenas liviana y pesada, incluyendo las CDRs, provienen de genes humanos. Tales anticuerpos son aquí definidos “anticuerpos humanos”, o “anticuerpos humanos completos”. Anticuerpos monoclonales humanos pueden ser preparados utilizando la técnica trioma; la técnica hibridoma de célula-B humana (véase Kozbor, et al., 1983 Immunol Today

4: 72); y la técnica hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Los anticuerpos monoclonales humanos pueden ser utilizados y pueden ser producidos por hibridomas humanos (véase Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) o transformando células-B humanas con el Epstein Barr Virus *in vitro* (véase Cole, et al., 1985 en: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Adicionalmente, anticuerpos humanos también puede ser producidos utilizando técnicas adicionales, incluyendo colecciones de visualización phage. (véase Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Similarmente, anticuerpos humanos pueden ser creados introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, *p.e.*, Ratones en los cuales los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Una vez tratados, la producción de anticuerpos humanos se observa, lo cual se parece mucho a lo visto en humanos en todos los aspectos, incluyendo la reorganización de genes, ensamblaje, y repertorio de anticuerpos. Esta aproximación se describe, por ejemplo, en U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, y en Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild et al, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); y Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

Los anticuerpos humanos pueden adicionalmente ser producidos utilizando animales transgénicos no humanos que son modificados para que produzcan anticuerpos completamente humanos en vez de los anticuerpos endógenos del animal en respuesta al reto por parte del antígeno. (Véase PCT publication

W094/02602). Los genes endógenos codificando las cadenas de inmunoglobulina pesada y liviana en el huésped no humano han sido incapacitadas, y la codificación loci activa de cadenas de inmunoglobulina pesada y liviana son insertadas en el genoma del huésped. Los genes humanos son incorporados, por ejemplo, utilizando cromosomas de levaduras artificiales que contienen los segmentos de DNA humano requeridos. Un animal que probé todas las modificaciones deseadas se obtiene entonces como progenie cruzando animales transgénicos intermedios que contienen menos de las modificaciones o complementos completos. La materialización preferida de tales animales no humanos es un ratón, y el denominado el XenomouseTM como se revela en PCT publications WO 96/33735 y WO 96/34096. Este animal produce células B que secretan inmunoglobulinas completamente humanas. Los anticuerpos pueden ser obtenidos directamente del animal después de la inmunización con un inmuno gen de interés, como, por ejemplo, una preparación de anticuerpos policlonales, o alternativamente de células B inmortalizadas derivadas del animal, como los hibridomas producidos por anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, los genes codificando las inmunoglobulinas con regiones variables humanas pueden ser recobrados y expresados para obtener los anticuerpos directamente, o pueden ser todavía más modificados para obtener análogos de los anticuerpos como, por ejemplo, moléculas de cadena simple Fv (scFv).

Un ejemplo de un método para producir un huésped no humano, ejemplificado un ratón, que no tenga la expresión de una cadena pesada de inmunoglobulina endógena es revelado en U.S. Patent No. 5,939,598. Puede ser tenido por un método, que incluye la eliminación de genes de segmento J de por lo -1 lugar de cadena pesada endógena en una célula madre de embrión para prevenir la reorganización del lugar y para prevenir la formación de una transcripción de un lugar de cadena pesada de inmunoglobulina reorganizada, la

eliminación se efectúa focalizando un vector que contenga un gen codificando un marcador seleccionable; y produciendo desde la célula madre de embrión un ratón transgénico cuyas células somáticas y de germen contienen el gen codificando un marcador seleccionado.

5 Un método para producir un anticuerpo de interés, tal como un anticuerpo humano, es revelado en U.S. Patent No. 5,916,771. Este método incluye la introducción de un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótido codificando una cadena pesada en una célula huésped de mamífero en cultivo, introduciendo un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótido
10 codificando una cadena liviana en otra célula huésped de mamífero, y fusionando las dos células para formar una célula híbrida.

 En un mejoramiento de este procedimiento, un método para identificar un epítipo clínicamente relevante en un inmuno gen, y un método correlativo para seleccionar un anticuerpo que se enlace inmuno específicamente al epítipo
15 relevante con una afinidad alta, es revelado en PCT publication WO 99/53049.

 El anticuerpo puede ser expresado por un vector que contiene un segmento de DNA codificado en el anticuerpo de cadena sencilla de escritorio.

 Éstos pueden incluir vectores, liposomas, DNA desnudo, DNA adyuvante asistido, cañón de gen, catéteres, etc. los vectores incluyen conjugados químicos
20 como los descritos en WO 93/64701, que tienen un grupo funcional destino (*p.e.* una ligadura a un la superficie celular), y un grupo funcional enlazando ácido nucleico (*p.e.* polilisina), vector viral (*p.e.* un vector viral de DNA o RNA) proteínas de fusión como las descritas en PCT/US 95/02140 (WO 95/22618) que es una proteína de fusión que contiene un grupo funcional destino (*p.e.* un anticuerpo
25 específico para una célula destino) y un grupo funcional de enlace de ácido nucleico (*p.e.* una protamina), plasmidas, phage, etc. los vectores pueden ser cromosomáticos, no cromosomáticos o sintéticos.

Los vectores preferidos incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Vectores retrovirales incluyen virus es de leucemia moloney murino. Los vectores virales de DNA son preferidos. Estos vectores incluyen vectores pox como los vectores ortopox o avipox, vectores de herpesvirus como el

5 vector de virus de herpes simplex I (HSV) (véase Geller, A. I. et al., J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F., et al., in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. et al., Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90:7603 (1993); Geller, A. I., et al., Proc Natl. Acad. Sci USA 87:1149 (1990), Vectores de Adenovirus (véase LeGal LaSalle et al., Science, 259:988

10 (1993); Davidson, et al., Nat. Genet 3:219 (1993); Yang, et al., J. Virol. 69:2004 (1995) y Vectores de Virus Adeno-asociados (véase Kaplitt, M. G .. et al., Nat. Genet. 8:148 (1994).

Los vectores virales Pox introducen el gen al citoplasma de la célula. Los vectores de virus Avipox resultan en sólo una expresión de corto término del ácido

15 nucleico. Vectores Adenovirus, vectores de virus adeno-asociados y vectores de virus de herpes simplex (HSV) son preferidos para introducir el ácido nucleico a células neurales. El vector adenovirus resulta en una expresión de término más corta (más o menos 2 meses) que un virus adeno-asociado (más o menos 4 meses), que además es más corto que los vectores HSV. El vector particular

20 escogido dependerá de las células destino y la condición a ser tratada. La introducción puede ser por técnicas estándar, *p.e.* infección, transfección, transducción o transformación. Ejemplos de modos de transferir genes incluyen *p.e.* DNA desnudo, precipitación CaPO_4 , dextran DEAE, electroporación, fusión proto plástica, lipofección, micro inyección a células, y vectores virales.

25 El vector puede ser utilizado para dirigirse a esencialmente cualquier célula destino. Por ejemplo, la inyección estereotáctica puede ser utilizada para dirigir los vectores (*p.e.* adenovirus, HSV) a una ubicación deseada. Adicionalmente las

partículas se pueden entregar por infusión intra-cerebro-ventricular (icv) utilizando un sistema de infusión de mini bomba, así como el SynchroMed Infusion System. Un método basado en el flujo masivo, convección de término, también ha sido probado efectivo en la entrega de moléculas grandes áreas extensas del cerebro y puede ser útil para entregar el vector a la célula objetivo. (Véase Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994); Morrison et al., Am. J. O Physiol. 266:292-305 (1994)). Otros métodos que también pueden ser utilizados incluyen catéteres, intravenosas, parenteral, intra peritoneal e incisiones sub cutáneas, y oral u otras rutas conocidas por administración.

Estos vectores pues el utilizados para expresar largas cantidades de anticuerpos que puede ser utilizados en una variedad de formas. Por ejemplo, para detectar la presencia de virus de influenza ofan }en una muestra. El anticuerpo también puede ser utilizado para tratar de enlazarse a y perturbar la fusión de membrana de las células de los virus de influenza.

Las técnicas puede ser adaptadas por la producción de anticuerpos de cadena sencilla específicos a una proteína de antígeno de la invención (véase p.e. U.S. Patent No. 4,946,778). Adicionalmente, los métodos puede ser adaptados para la construcción de colecciones de expresión F_{ab} (véase p.e. Huse, et al., 1989 Science 246: 1275-1281) para permitir una rápida y efectiva identificación de fragmentos monoclonales F_{ab} con la especificidad deseada para una proteína o derivados, fragmentos, análogos u homólogos del mismo. Los fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos a un antígeno de proteína puede ser producido por técnicas conocidas en el arte incluyendo, pero no limitado a: (i) un fragmento $F_{(ab')_2}$ producido por digestión de pepsina de una molécula anticuerpo; (ii) un fragmento F_{ab} generado por la reducción de los puentes disulfidos de un fragmento $F_{(ab')_2}$; (iii) un fragmento F_{ab} generado por el tratamiento de la molécula anticuerpo con papaina y un agente reductor y (iv) fragmentos F_v .

Anticuerpos hetero conjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos hetero conjugados están compuestos por dos anticuerpos covalentemente unidos. Tales anticuerpos han, por ejemplo, sido propuestos para dirigirse a las células del sistema inmune hacia células no
5 deseadas (véase U.S. Patent No. 4,676,980), y para tratar infecciones de VIH (véase WO 92/200373; EP 03089). Se ha contemplado de los anticuerpos pueden ser preparados *in vitro* utilizando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellas involucradas en agentes de enlace cruzado. Por ejemplo, las inmuno toxinas pueden ser construidas utilizando una reacción de
10 cambio de disulfido o formando una unión thioether. Ejemplos de reagentes adecuados para este propósito incluyen iminothilate y methul-4-mercaptobutyrimidate y aquellos revelados, por ejemplo, en U.S. Patent No. 4,676,980.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a
15 la función efectora, para mejorar, p.e., La efectividad del anticuerpo en el tratamiento de influenza. Por ejemplo, el (los) residuo (s) de cisteína pueden ser introducidos a la región Fc, por lo tanto permitiendo la formación de uniones disulfidas entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimerico así generado puede tener una capacidad de internación mejorada y/o un incremento en la
20 eliminación de células de complemento mediático y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). (Véase Caron et al., J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). Alternativamente, un anticuerpo puede ser diseñado de tal forma que tenga regiones Fc duales y puede por lo tanto tener lisis complementaria mejorada y capacidades ADCC. (Véase
25 Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

La invención también está relacionada con inmuno conjugados comprendidos de un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico como una toxina

(p.e. una toxina enzimáticamente activa de origen bacterial, de hongos, plantas o animales, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (p.e. un radio conjugado).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que
5 pueden ser utilizadas incluyen cadena de difteria A, fragmentos de no enlazantes
activos de toxina de difteria, cadena exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*),
cadena de ricino A, cadena de abrin A, cadena modécina A, alpha-sarcina,
proteínas Aleurites fordii, proteínas diantinas, proteínas Phytolaca americana
(PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor
10 sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y
los tricothecenes. Una variedad de radio nucleidos están disponibles para la
producción de anticuerpos radio conjugados. Ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In ,
 ^{90}Y , y ^{186}Re .

Conjugados del anticuerpo y agente citotóxico son hechos utilizando una
15 variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales como N-
succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), derivados
bifuncionales de imidoesters (como dimethyl adipimidate HCL), esters activos
(como disuccinimidyl suberate), aldehydes (como glutarelddehyde), compuestos
bis-azido (como bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), derivados de bis-diazonium
20 (como bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (como tolyene
2,6-diisocyanate), y compuesto fluorino bis-activo (como 1,5-difluoro-2,4-
dinitrobenzene). Por ejemplo, una inmuno toxina ricina puede ser preparada como
se describe en Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-
isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) es
25 un agente quelante ejemplar para la conjugación de radio nucleótido al anticuerpo
(Véase WO94/11026).

Aquellos de habilidades ordinarias en el arte reconocerán que una larga variedad de posibles fracciones pueden ser juntadas con los anticuerpos resultantes o a las otras moléculas de la invención. (Véase, *por ejemplo*, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), el contenido completo de los cuales se incorpora aquí por referencia).

Las juntas pueden ser logradas por cualquier reacción química que enlace las dos moléculas en tanto el anticuerpo y la otra fracción retengan sus actividades respectivas. Este enlace puede incluir muchos mecanismos químicos, por ejemplo enlace covalente, enlace de afinidad, intercalación, enlace de coordinación y complexación. El enlace preferido es, sin embargo, el enlace covalente. El enlace covalente puede ser logrado ya sea por condensación directa de cadenas laterales existentes o por la incorporación de moléculas de puente externas. Muchos agentes bivalentes o polivalentes son útiles en la junta de moléculas de proteína, como los anticuerpos de la presente invención, a otras moléculas. Por ejemplo, agentes representativos de junta puede incluir compuestos orgánicos como thioesters, carbodiimides, succinimide esters, diisocyanates, glutaraldehyde, diazobenzenes y hexamethylene diamines. Este listado no intenta ser exhaustivo para las varias clases de agentes de junta conocidos en el arte pero, más bien, es ejemplo de los agentes de junta más comunes. (Véase Killen and Lindstrom, Jour . Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62:185-216 (1982); y Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)). Los enlazantes preferidos son descritos en la literatura. (Véase, *por ejemplo*, Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984) describiendo el uso de MBS (M-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester). Véase también, U.S. Patent No. 5,030,719, describiendo el uso del derivado de halogenated acetyl hydrazide juntado con un anticuerpo por medio de un enlazante oligopéptido. Los enlazantes

particularmente preferidos incluyen: (i) EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride; (ii) SMPT (4-succinimidylloxycarbonyl-alpha-methyl-alpha-(2-pyridyl-dithio)-toluene (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (succinimidyl-6-[3-(2-pyridyldithio) propionamido]hexanoate (Pierce Chem. Co.,
5 Cat #21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidyl-6-[3-(2-pyridyldithio)-propionamide] hexanoate (Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G); y (v) sulfo-NHS (N-hydroxysulfo-succinimide: Pierce Chem. Co., Cat. #24510) conjugado a EDC.

Los enlazantes descritos arriba contienen componentes que tienen diferentes atributos, por lo tanto llevando a conjugados con diferentes propiedades
10 físico químicas. Por ejemplo, sulfo-NHS esters de alkyl carboxylates son más estables que sulfo-NHS esters de aromatic carboxylates.

NHS-esters que contienen enlazantes son menos solubles que sulfo-NHS esters. Además, el enlazante SMPT contiene una unión sterically hindered disulfide, y puede formar conjugados con incrementada estabilidad. Enlazantes
15 disulfide, son en general, menos estables que otros enlazantes porque el enlazante disulfide es dividido *in vitro*, resultando en menos disponibilidad de conjugación. Sulfo-NHS, en particular, puede mejorar la estabilidad de juntas carbodimide. Las juntas carbodimide (como EDC) cuando se utilizan en conjunción con sulfo-NHS, forman esters que son más resistentes a hidrólisis que las juntas
20 de reacción carbodimide solas.

Los anticuerpos revelados aquí puede ser formulados como inmuno liposomas. Liposomas que contienen el anticuerpo son preparados por métodos conocidos en el arte, como se describe en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y
25 U.S. Pat. Nos. 4,485,045 y 4,544,545. Liposomas con tiempo de circulación mejorada son reveladas en U.S. Patent No. 5,013,556.

Liposomas particularmente útiles puede ser generados por el método de evaporación de fase reversa con una composición del lípidos que componen phosphatidylcholine, colesterol, y PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Los liposomas son extruídos a través de filtros de una dimensión de
5 poro definida para producir liposomas con el diámetro deseado. Fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención puede ser conjugados a los liposomas como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) por medio de una reacción de intercambio de disulfide.

10 Uso de Anticuerpos Contra el Virus de Influenza

Métodos para la detección de anticuerpos que poseen la especificidad deseada incluye, pero no está limitada a, ensayos inmuno absorbente de enzimas enlazadas (ELISA) y otras técnicas mediatas inmunológicas conocidas dentro del
15 arte.

Los anticuerpos dirigidos contra una proteína de virus de influenza como la HA (o fragmento de la misma) puede ser utilizada en métodos conocidos dentro del arte que se relacionan a la localización y/o cuantificación de una proteína de virus de influenza (*p.e.*, para uso en la medición de niveles de la proteína de virus
20 de influenza dentro de muestras fisiológicas apropiadas, para uso en métodos de diagnóstico, para uso en formación de imágenes de la proteína, y así por el estilo). En una materialización dada, anticuerpos específicos a una proteína de virus de influenza, o derivado, fragmento, análogo u homólogo del mismo, que contienen el dominio de enlace de antígeno derivado del anticuerpo, son utilizados como
25 compuestos farmacológicamente activos (referidos de quien adelante como "Terapéuticos").

Un anticuerpo específico para una proteína de virus de influenza de la invención puede ser utilizada para aislar un poli péptido de virus de influenza por técnicas estándar, así como la inmuno afinidad, cromatografía o inmuno precipitación. Los anticuerpos dirigidos contra una proteína de virus de influenza (o
5 fragmento de la misma) puede ser utilizada diagnóstica mente para monitorear los niveles de proteína en tejido como parte de un procedimiento de prueba clínica, *p.e.*, para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede ser facilitada juntando (*p.e.*, físicamente enlazando) el anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables
10 incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de horseradish (rábano picante), fosfatasa alcalina, β -galactosidase, o acetylcholinesterase; ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen streptavidin/biotin y avidin/biotin; ejemplos
15 de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride o phycoerythrin; ejemplos de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferase, luciferin, y aequorin, y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

20 Los anticuerpos de la invención, incluyendo anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados y completamente humanos, pueden ser usados como agentes terapéuticos. Tales agentes generalmente serán empleados para tratar o prevenir una enfermedad o patología relacionada con el virus de la influenza (*p.e.* gripe aviar) en un sujeto. Una preparación de anticuerpo, preferiblemente una que
25 tenga alta especificidad y alta afinidad para con su antígeno destino, es administrada al sujeto y generalmente tendrá un efecto debido a su enlace con el objetivo. La administración del anticuerpo puede abrogar o inhibir o interferir con la

internalización del virus a una célula. En este caso, el antivirus se enlaza con el objetivo y enmascara un lugar de enlace de la ligadura que naturalmente ocurre, por lo tanto bloqueando la fusión del virus a la membrana de la célula inhibiendo la internalización del virus.

5 Una cantidad terapéutica en el que efectiva de un antivirus de la invención se relaciona generalmente con la cantidad necesitada para lograr un objetivo terapéutico. Como se anotó arriba, puede ser una interacción de lazo entre el anticuerpo y su antígeno objetivo que, en ciertos casos, interfiere con la funcionalidad del objetivo. La cantidad requerida que debe ser administrada
10 dependerá también de la afinidad de enlace del anticuerpo para con su antígeno específico, y también dependerá en la proporción según la cual se la aplicación del anticuerpo se acabe del volumen libre para otro sujeto al cual se suministra. Rangos comunes para la dosis de aplicación terapéutica efectiva de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención puede ser, en forma de un ejemplo no
15 limitante, de más o menos 0.1 mg/kg de peso corporal a más o menos 50 mg/kg de peso corporal. Las frecuencias de dosificación comunes pueden estar en el rango de, por ejemplo, dos veces al día a una vez por semana.

 Anticuerpos específicamente se enlacen a una proteína de virus de influenza o fragmento de la misma de la invención, así como otras moléculas
20 identificadas por los ensayos de estudios revelados aquí, pueden ser suministrados para el tratamiento de desórdenes relacionados con el virus de influenza en la forma de composiciones farmacéuticas. Los principios y consideraciones involucradas en la preparación de dichas composiciones, así como la alianza en la selección de componentes se provee, por ejemplo, en
25 Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers,

Langhome, Pa., 1994; y Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

En donde los fragmentos de anticuerpos son utilizados, los fragmentos inhibitorias más pequeños que específicamente se enlazan al dominio de enlace
5 de la proteína objetivo es preferida. Por ejemplo, basado en las secuencias de región variable de un anticuerpo, moléculas de péptido puede ser diseñadas que retengan la habilidad de enlazarse a la secuencia de proteínas destino. Tales péptidos puede ser sintetizados químicamente y/o producidos por tecnología de recombinación de DNA. (Véase, p.e., Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
10 90: 7889-7893 (1993)). La formulación también puede contener más de un compuesto activo como sea necesario para la indicación particular que sea tratada, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten adversamente entre sí. Alternativamente, o en adición, la composición puede comprometer una gente que mejora su función, como, por ejemplo, un
15 agente citotóxico, citocina, agente químico terapéutico, o una gente de inhibición de crecimiento. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinaciones en cantidades que son efectivas para el propósito buscado.

Los ingredientes activos también puede ser atrapados en micro cápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización
20 interfacial, por ejemplo, hydroxymethylcellulose o micro cápsulas de gelatina y micro cápsulas poly-(methylemethacrylate), respectivamente, en sistemas de entrega de droga coloidal (por ejemplo, liposomas, micro esferas de albúmina, micro emulsiones, nano-partículas, y la nano-cápsulas) o en macro emulsiones.

La formulación a ser usada para administración *in vivo* debe ser estéril.
25 Éstos se logra fácilmente filtrando por medio de membranas de filtración estéril.

Preparaciones de dispensa sostenida puede ser preparadas. Ejemplos apropiados de preparaciones de dispensa sostenida incluyen matrices semi

permeables de polímeros hidrofóbicos que contengan el anticuerpo, cuyas matrices son en forma de artículos moldeados, *p.e.*, películas, o micro cápsulas. Ejemplos de matrices de dispensa sostenida incluyen poliesters, hidrogels (por ejemplo, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), o poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutamic y γ ethyl-L-glutamate, acetato vinil-etileno no degradable, copolímeros de ácido ácido-glicólico láctico degradable como el LUPRON DEPOTTM (micro esferas inyectables impuestas de copolímero de ácido ácido-glicólico láctico y acetato leuprolide), y ácido poly-D-(-)-3-hydroxybutyric. Mientras que polímeros como el acetato vinil-etileno y el ácido

5 ácido-glicólico láctico permiten la liberación de moléculas por más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas por períodos de tiempo más cortos.

Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser utilizado como un agente para detectar la presencia de virus de influenza (o una proteína o un fragmento de proteína de la misma) en una muestra. Preferiblemente, el

15 anticuerpo contiene una etiqueta detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Un anticuerpo intacto, o fragmento del mismo (*p.e.*, F_{ab}, scFv, o F_{(ab)2}) puede ser utilizado. El término “etiquetado”, en referencia a la sonda o anticuerpo, es intencionada para cubrir directamente la rotulación de la sonda o anticuerpo juntando (*p.e.*, enlazando

20 físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como rotulación indirecta de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reagente que está directamente rotulado. Ejemplos de etiquetación indirecta incluye la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo etiquetado fluorescente y la etiquetación final de una sonda de DNA con biotina como aquella que se pueden

25 detectar con streptavidina etiquetada fluorescente. El término “muestra biológica” tiene la intención de incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Incluido

dentro del uso del término "muestra biológica", por lo tanto, está la sangre y una fracción o componente de sangre incluyendo suero de sangre, plasma de sangre, o linfas. Esto es, que el método de detección de la invención puede ser utilizado para detectar un analyte mRNA, proteína o DNA genómica en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, técnicas *in vitro* para la detección de analyte mRNA incluyen hibridaciones *nórdicas* e hibridaciones *in situ*. Técnicas *in vitro* para la detección de una proteína analyte incluyen ensayo inmunoabsorbente de enzimas enlazadas (ELISAs), Western blots, inmuno precipitaciones, e inmuno fluorescencias. Técnicas *in vitro* para la detección de un analyte genomic DNA incluyen Southern hybridizations. Procedimientos para conducir inmuno ensayos son descritos, por ejemplo en "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; y "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Aún más, Técnicas *in vivo* para la detección de una proteína analyte incluye la introducción en un sujeto de un anticuerpo de proteína etiquetada anti-analyte. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser etiquetado con un marcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto puede ser detectada con técnicas de obtención de imágenes estándar.

Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos o agentes de la invención (también se refieren aquí como "componentes activos"), y derivados, fragmentos, análogos y homólogos del mismo, pueden ser incorporados en composiciones farmacéuticas apropiadas para el suministro. Tales composiciones típicamente se componen de la

anticuerpo o agente y un portador farmacéutica mente aceptable. Como se utiliza aquí, el término "portador farmacéutica mente aceptable" se pretende que incluya cualquier y todos los solventes, medios de dispersión, cubiertas, agentes anti bacteriales y anti fungicidas, agentes isotónicos y de absorción demorada, y otras
5 por el estilo compatibles con el suministro farmacéutico. Portadores apropiados son descritos en la más reciente edición de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en el campo, que es incorporado aquí por referencia. Ejemplos preferidos de tales portadores o diluyentes incluyen, pero no están limitados a, agua, solución salina, solución de ringer, solución de dextrosa, y
10 suero humano de albúmina al 5%. Los liposomas y vehículos no acuosos como aceites fijos pueden ser utilizados. El uso de tales medios o agentes para sustancias farmacéutica mente vivas es bien conocido el arte. Excepto hasta ahora como algunos medios convencionales o agentes son incompatibles con el compuesto activo, el uso de los mismos en las composiciones es contemplado.
15 Compuestos activos suplementarios también pueden ser incorporados en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención es formulada para ser compatible con su ruta intencionada de suministro. Ejemplos de rutas de suministro incluyen administraciones parenteral, *p.e.*, intravenosas, intradérmicas
20 subcutáneas, orales (*p.e.*, inhalación), trasdérmicas (*p.e.*, tópicas), transmucosas, y rectales. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicaciones parental, intradérmicas, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, glicoles polietilenos, glicerina, glicoles propilenos u otros solventes sintéticos; agentes
25 antibacteriales como alcohol bencílico o methyl parabens; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfato de sodio; agentes quelantes como el ácido ethylenediaminetetraacético (EDTA); tampones como acetatos, citratos o fosfatos,

y agentes para el ajuste de tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ser ajustado con ácidos o bases, así como el ácido hidrocórico o el hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede ser contenida en ampollas, jeringas desechables o ampollas de dosis múltiples hechas de vidrio o plástico.

- 5 Composiciones farmacéuticas apropiadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (donde el agua soluble) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones estériles inyectables o dispersión. Para administración intravenosa, portadores apropiados incluyen solución salina fisiológica, agua bacterio-estática, Cremophor ELTM (BASF,
- 10 Parsippany, N.J.) o solución tampón de fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida al alcance que sea fácilmente inyectable. Debe ser estable bajo las condiciones de manufactura y almacenaje y debe ser preservada contra la contaminación de microorganismos como bacteria y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga,
- 15 por ejemplo, agua, etanol, polyol (por ejemplo, glicerol, glicol propileno, y líquido glicol polietileno, y parecidos), y mezclas apropiadas de los mismos. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, utilizando una cubierta como lecitina, manteniendo el tamaño de partículas requeridos en el caso de dispersión y por el uso de surfactantes. La prevención de acción de microorganismos se
- 20 puede lograr por varios agentes anti bacteriales y anti fungicidas, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, el timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcar, polialcoholes como el manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo
- 25 incluyendo la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Soluciones inyectables estériles pueden ser preparadas incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado uno o una combinación de los ingredientes enumerados arriba, como sea requerido, seguido por la filtración de esterilización. Generalmente, las dispersiones son preparadas incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados arriba. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, métodos de preparación son el secado al vacío y secado-congelado que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional que se desee de una solución previamente esterilizada-filtrada del mismo.

Composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte un portador indigerible. Éstos pueden ser contenidos en cápsulas de gelatina o comprimidos en tabletas. Para el propósito de suministro oral terapéutico, el compuesto activo puede ser incorporado con excipientes y utilizado en la forma de tabletas, trociscos, o cápsulas. Composiciones orales también pueden ser preparadas utilizando un portador líquido para utilizar como enjuague bucal, en el cual el compuesto en el portador líquido es aplicado oralmente y se hace un buche y es expectorado o tragado. Agentes de enlace farmacéutica mente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden ser incluidos como parte de la composición. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos, y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante como celulosa micro cristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente como almidón o lactosa, un agente desintegrante como el ácido alginico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante como stearato de magnesio o Sterotes; un deslizante como un dióxido de silicio coloidal; un agente endulzante como

sacarosa o sacarina; o un agente saborizante como la menta, salicilato de metilo, o saborizante de naranja.

Para administración por inhalación, los compuestos son entregados en la forma de spray aerosol de un contenedor presurizado o dispensador que contiene
5 un propulsor adecuado, *p.e.*, un gas como el dióxido de carbono o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, penetrantes apropiados a la barrera que debe ser permeada son utilizados en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en el arte, e incluyen, por ejemplo,
10 para administración transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados del Ácido fusídico. La administración transmucosa puede ser lograda por medio del uso de sprays nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos son formulados en ungüentos, sales, geles, o cremas como generalmente es conocido en el arte.

15 Los compuestos también puede ser preparados en forma de supositorios (*p.e.*, con bases de supositorios convencionales como la manteca de cacao y otros glicéridos) o en enemas de retención para entrega rectal.

En otras materializaciones, los compuestos activos son preparados con portadores que protegen al compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, así
20 como formulaciones de dispensa controlada, incluyendo implantes y sistemas de entrega microencapsulada. Polímeros biodegradables, biocompatibles pueden ser utilizados, como el acetato de etileno de vinilo, polyanhydrides, el ácido poliglicólico, el colágeno, polyorthoesters, y el ácido poliláctico. Métodos de preparación para tales formulaciones serán aparentes para aquellos con habilidad
25 en el arte. Los materiales también pueden ser obtenidos comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales a

antígenos virales) también puede ser utilizados como portadores farmacéutica mente aceptables. Éstos pueden ser preparados de acuerdo a métodos conocidos a aquellos con habilidad en el arte, por ejemplo, como se describe en U.S. Patent No. 4,522,811.

5 Es especialmente ventajoso formular sesiones orales o parenterales en la forma de unidades de dosis para el fácil suministro en dosis uniformes. Formas de unidad de dosis como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas apropiadas como dosis unitarias para el sujeto que va a ser tratado; cada unidad conteniendo una cantidad predeterminada del compuesto activo calculado para
10 producir el efecto terapéutico deseado en asocio con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas de unidad de dosis de la invención están dictadas por indirectamente dependientes de las características únicas del compuesto activo y de los efectos terapéuticos particulares que se quiere lograr, y las limitaciones inherentes en el arte de lograr tales compuestos activos para el
15 tratamiento de individuos.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser incluidas en un contenedor, paquete, o dispensador junto con instrucciones para suministro.

Métodos de Detección

20

La invención provee métodos (también referidos aquí como "ensayos de detección") para identificar moduladores, *p.e.*, candidatos compuestos de prueba o agentes (*p.e.*, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otras drogas) que modulen o de otra forma interfieran con la fusión de un virus de influenza a la
25 membrana celular. También se proveen métodos de identificación de compuestos útiles para tratar la infección de influenza. La invención también contiene compuestos identificados utilizando los ensayos de detección aquí descritos.

Por ejemplo, la invención provee ensayos para detectar candidatos o compuestos de prueba que modulen la interacción entre el virus de influenza y la membrana celular. Los compuestos de prueba de la invención puede ser obtenidos utilizando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos conminatorios de colecciones conocidos en el arte, incluyendo: colecciones biológicas; fase sólida espacialmente direccionable en paralelo o solución de fase de colecciones; la colección de métodos de síntesis que requiere deconvolución; el método de colección de "una-cama un-compuesto"; y métodos de colección sintéticos utilizando selecciones de cromatografía de afinidad. En enfoque de colección biológica está limitado a colecciones de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a péptidos, oligómeros no péptidos o colecciones de compuestos de moléculas pequeñas. (Véase, *p.e.*, Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12: 145).

Una "molécula pequeña" como se utiliza aquí, se refiere a una composición que tiene un peso molecular de menos de más o menos 5 kD y más preferiblemente menos de 4 kD. Las moléculas pequeñas pueden ser, *p.e.*, ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas. Colecciones de mezclas químicas y/o biológicas, así como extractos de hongos, bacterias, o algas, son conocidos en el arte y pueden ser detectados con cualquiera de los ensayos de la invención.

Ejemplos de métodos de la síntesis de colecciones moleculares pueden ser encontradas en el arte, por ejemplo en: DeWitt, et al., 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6909; Erb, et al., 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 11422; Zuckermann, et al., 1994. *J. Med. Chem.* 37: 2678; Cho, et al., 1993. *Science* 261: 1303; Carrell, et al., 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carell, et al., 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; y Gallop, et al., 1994. *J. Med. Chem.* 37: 1233.

Colecciones de compuestos pueden ser presentadas en solución (Véase, *p.e.*, Houghten, 1992. *Biotechniques* 13: 412-421), o en esferas (Véase Lam, 1991. *Nature* 354: 82-84), en chips (Véase Fodor, 1993. *Nature* 364: 555-556), bacteria (Véase U.S. Patent No. 5,223,409), esporas (Véase U.S. Patent 5,233,409), plasmidas (Véase Cull, et al., 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5 1865-1869) o en fages (Véase Scott and Smith, 1990. *Science* 249: 386-390; Devlin, 1990. *Science* 249: 404-406; Cwirla, et al., 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 6378-6382; Felici, 1991. *J. Mol. Biol.* 222: 301-310; y U.S. Patent No. 5,233,409.).

10 En una materialización, un compuesto candidato es introducido a un complejo anticuerpo-antígeno y determinando si el compuesto candidato perturba el complejo anticuerpo-antígeno, en donde una perturbación de este complejo indica que el compuesto candidato modula la interacción entre el virus de influenza y la membrana celular. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser anticuerpo 15 monoclonal D7, D8, F10, G17, G40, A66, D80, E88, E90, y H98 y el antígeno puede estar ubicado en la proteína HA de un virus de influenza.

En otra materialización, se provee por lo menos una proteína HA, que es expuesta a por lo menos un anticuerpo monoclonal neutralizante. La formación de un complejo anticuerpo-antígeno es detectada, y uno o más compuestos 20 candidatos son introducidos al complejo. Si el complejo anticuerpo-antígeno es perturbado después de la introducción de uno o más compuestos candidatos, el compuesto candidato es útil para tratar una enfermedad o desorden relacionado con el virus de influenza, *p.e.*, la gripe aviar. Por ejemplo, por lo menos una proteína de virus de influenza puede ser proveída como una molécula de virus de 25 influenza.

Determinando la habilidad del compuesto prueba para interferir con o perturbar el complejo anticuerpo-antígeno puede ser logrado, por ejemplo,

juntando el compuesto prueba con una etiqueta de radio isótopo o enzimática de tal forma que el enlace del compuesto prueba al antígeno o porción biológicamente activa del mismo pueda ser determinado detectando el compuesto etiquetado en un complejo. Por ejemplo, el compuesto prueba puede ser etiquetado con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , o ^3H , ya sea directa o indirectamente, y el radio isótopo detectado contando directamente las radio emisiones o contando los destellos. Alternativamente, compuestos de prueba pueden ser etiquetados enzimáticamente con, por ejemplo, peróxido de horseradish, fosfatasa alcalina, o luciferasa, y la etiqueta enzimática detectada determinando la conversión de un sustrato apropiado a producto.

En una materialización, el ensayo comprende contactar un complejo anticuerpo-antígeno con un compuesto prueba, y determinar la habilidad del compuesto prueba de interactuar con el antígeno o de otra forma perturbar el complejo anticuerpo-antígeno existente. En esta materialización, determinar la habilidad del compuesto prueba para interactuar con el antígeno y/o perturbar el complejo anticuerpo-antígeno comprende determinar la habilidad del compuesto prueba para enlazarse preferiblemente al antígeno o a la porción biológicamente activa del mismo, comparado con el anticuerpo.

En otra materialización, el ensayo comprende contactar un complejo anticuerpo-antígeno con un compuesto prueba y determinar la habilidad del compuesto prueba para modular al complejo anticuerpo-antígeno. Determinar la habilidad del compuesto prueba para modular el complejo anticuerpo-antígeno puede ser logrado, por ejemplo, determinando la habilidad del antígeno para enlazarse o interactuar con el anticuerpo, en la presencia del compuesto prueba.

Aquellos con habilidad en el arte reconocerán que, en cualquier método de detección revelado aquí, el anticuerpo puede ser un anticuerpo neutralizante de virus de influenza, así como un anticuerpo monoclonal D7, D8, F10, G17, H40,

A66, D80, E88, E90 y H98. Adicionalmente, el antígeno puede ser una proteína HA, una porción de la misma. En cualquiera de los ensayos descritos aquí, la habilidad de un compuesto candidato para interferir con el enlace entre el anticuerpo monoclonal D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 y H98 y la proteína HA indica que el compuesto candidato será capaz de interferir con o modular la fusión del virus de influenza y la membrana celular. Aún más, ya que el enlace de la proteína HA a la célula es responsable por la entrada de virus de influenza dentro de la célula tales compuestos candidatos también serán útiles en el tratamiento de enfermedades o desórdenes relacionadas con el virus de influenza, *p.e.*, gripe aviar.

Los métodos de detección revelados aquí pueden ser llevados a cabo como un ensayo basado en células o un ensayo libre de células. Los ensayos libres de células de la invención son favorables al uso de tanto la forma soluble o la forma rodeada de membrana de las proteínas HA, es deseable utilizar un agente soluble de tal forma que la forma rodeada de membrana de las proteínas sea mantenida en solución. Ejemplos de tal agente soluble incluyen detergentes no iónicos como n-octylglucoside, n-dodecylglucoside, n-dodecylmaltoside, octanoyl-N-methylglucamide, decanoyl-N-methylglucamide, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecypoly(ethylene glycol ether)_n, N-dodecyl--N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane sulfonate, 3-(3-cholamidopropyl) dimethylamminiol-1-propane sulfonate (CHAPS), o 3-(3-cholamidopropyl)dimethylamminiol-2-hydroxy-1-propane sulfonate (CHAPSO).

En más de una materialización, puede ser deseable inmovilizar ya sea el anticuerpo o el antígeno/facilitar la separación de complejos de formas no complejas de uno o ambos después de la introducción del compuesto candidato, así como permitir la automatización del ensayo. Observación del complejo anticuerpo-antígeno en la presencia y ausencia de un compuesto candidato,

puede ser lograda en cualquier recipiente apropiado para contener los reactivos. Ejemplos de tales recipientes incluyen platos microtiter, tubos de ensayo, y tubos de micro centrifuga. En una materialización, una proteína de fusión puede ser proveída que adiciona un dominio que permite uno o ambas de las proteínas que serán unidas a una matriz. Por ejemplo, proteínas de función anticuerpo GST o proteínas de función antígeno GST pueden ser absorbidas en esferas glutathione sepharose (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o platos microtiter derivados de glutathione, que son entonces combinados con el compuesto prueba, y la mezcla es incubada bajo condiciones conductivas a la formación de complejos (p.e., en condiciones fisiológicas para sal y pH). Después de la incubación, las esferas o pozos de platos microtiter son lavados para remover cualquier componente no enlazado, la matriz inmovilizada en el caso de esferas, complejos determinados ya sea directa o indirectamente. Alternativamente, los complejos pueden ser disociados de la matriz, y el nivel de formación de complejos anticuerpo-antígeno puede ser determinada utilizando técnicas estándar.

Otras técnicas para inmovilizar proteínas en matrices también pueden ser utilizada en los ensayos de detección de la invención. Por ejemplo, ya sea el anticuerpo o el antígeno (p.e., el) puede ser inmovilizado utilizando una conjugación de biotina y streptavidina. Un anticuerpo biotinilizado o moléculas de antígeno pueden ser preparadas de biotin-NHS (N-hydroxy-succinimide) utilizando técnicas bien conocidas dentro del arte (p.e., biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), E inmovilizadas en pozos de platos de pozo con cubierta streptavidina 96 (Pierce Chemical). Alternativamente, un otros anticuerpos reactivos con el anticuerpo o antígeno de interés, pero que no interfiere con la formación del complejo anticuerpo-antígeno de interés, puede ser derivado a los pozos del plato, y anticuerpos o antígenos sin enlace atrapados en los pozos por conjugación de anticuerpo. Los métodos para detectar tales complejos, en adición

a los descritos arriba para los complejos inmovilizados GST, incluyen inmuno detección de complejos utilizando otros ante cuerpos reactivos tales con el anticuerpo o antígeno.

La invención además está relacionada con agentes novedosos identificados por cualquiera de los ensayos de detección antes mencionados y el uso por lo tanto de tratamientos como se describe aquí.

Ensayos de Diagnóstico

10 Los anticuerpos presentes en la invención pueden ser detectados por ensayos apropiados, *p.e.*, tipos convencionales de inmuno ensayos. Por ejemplo, un ensayo puede ser llevado a cabo en el cual una proteína influenza (*p.e.*, HA1, HA2 o neuraminidasa) o fragmentos de la misma son fijados a una fase sólida. La incubación se mantiene por un período de tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo en la muestra se enlace al polipéptido inmovilizado en la fase sólida. Después de esta primera incubación, la fase sólida es separada de la muestra. La fase sólida es lavada para remover material no enlazado y sustancias que interfieren como proteínas no específicas que pueden también estar presentes en la muestra. La fase sólida que contiene el anticuerpo de interés enlazado al polipéptido inmovilizado es subsecuentemente incubado con un segundo, anticuerpo etiquetado o anticuerpo enlazado a un agente de junta como el biotin o avidin. Este segundo anticuerpo puede ser otro anticuerpo anti influenza u otro anticuerpo. Etiquetas para los anticuerpos son bien conocidos en el arte e incluyen radionucleidos, enzimas (*p.e.*, deshidrogenasa maleato, peroxidasa de horseradish, glucosa oxidasa, catalasa), harinas (isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficocianina, fluorescarmine), biotina, y otros similares. Los anticuerpos etiquetados son incubados con el sólido y el enlace etiquetado a la fase sólida es

15

20

25

medida. Estos y otros inmuno ensayos pueden ser fácilmente llevados a cabo por aquellos con habilidades ordinarias en el arte.

Un método ejemplar yo para detectar la presencia o ausencia de virus de influenza (en una muestra biológica involucra la obtención de muestras biológicas de un sujeto de prueba y contactar la muestra biológica con un anticuerpo monoclonal etiquetado o scFv de acuerdo con la invención de tal forma que la presencia del virus de influenza es detectada en la muestra biológica.

Como se utiliza aquí, el término “etiquetado”, con referencia a la sonda o anticuerpo, se pretende que abarque la etiquetación directa de la sonda o anticuerpo juntando (*p.e.*, físicamente uniendo) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como la etiquetación indirecta de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reagente que es directamente etiquetado. Ejemplos de etiquetación indirecta incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario fluorescente mente etiquetado y la etiquetación final de sonda de DNA con biotin de tal forma que pueda ser detectado con estreptavidina fluorescente mente etiquetada. El término “muestra biológica” se pretende que incluya tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Esto es, que el método de detección de la invención puede ser utilizado para detectar un virus de influenza en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, técnicas *in vitro* para la detección de un virus de influenza incluyen ensayos inmuno absorbente de enzimas enlazadas (ELISAs), Western blots, inmuno precipitaciones, e inmuno fluorescencias. Aún más, Técnicas *in vivo* para la detección de un virus de influenza incluye la introducción en un sujeto de un anticuerpo de virus anti influenza etiquetado. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser etiquetado con un marcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto puede ser detectada con técnicas de obtención de imágenes estándar.

En una materialización, la muestra biológica contiene moléculas de proteínas del sujeto de prueba. Una muestra biológica preferida es una muestra de leucocitos de sangre periférica aislada de un sujeto por métodos convencionales.

La invención también abarca paquetes para detectar la presencia de un virus de influenza en una muestra biológica. Por ejemplo, el paquete puede 5 contener: un compuesto etiquetado o a gente capaz de detectar un virus de influenza (p.e., un anticuerpo anti influenza scFv o monoclonal) en una muestra biológica; métodos para determinar la cantidad de un virus de influenza en una muestra; y métodos para comparar la cantidad de un virus de influenza en una 10 muestra con un estándar. El compuesto o agente puede ser empacado en un contenedor apropiado. El paquete puede además contener instrucciones para el uso del paquete para detectar un virus de influenza en una muestra.

Inmunización Pasiva

15

La inmunización pasiva ha probado ser una estrategia efectiva y segura para la prevención y tratamiento de enfermedades virales. (Véase Keller et al., Clin. Microbiol. Rev. 13:602-14 (2000); Casadevall, Nat. Biotechnol. 20: 114 (2002); Shibata et al., Nat. Med. 5 :204-10 (1999); y Igarashi et al., Nat. Med. 20 5:211-16 (1999), cada uno de los cuales se incorporan aquí por referencia)). La inmunización pasiva utilizando anticuerpos monoclonales humanos neutralizantes puede proveer una estrategia de tratamiento inmediato para emergencias de profilaxis y tratamiento de influenza como la gripe aviar mientras que la alternativa y el desarrollo que consume más tiempo de vacunas y nuevas drogas se 25 encuentran desarrollo.

Vacunas de subunidad potencialmente ofrecen ventajas significativas sobre inmuno genes convencionales. Éstas evitan los peligros de seguridad inherentes

en la producción, distribución y su ministro de vacunas con patógenos completos convencionalmente muertos o atenuados. Además, éstas pueden ser racionalmente diseñadas para incluir sólo epítomos de protección confirmados, por lo tanto evitando epítomos de supresión T (véase Steward et al., J. Virol. 69:7668 (1995)) o epítomos inmuno dominantes B que subvierten el sistema inmune incluyendo respuestas inútiles, que no protegen (p.e. epítomos "señuelo"). (Véase Garrity et al., J. Immunol. 159:279 (1997)).

Más aún, aquellos con habilidad en el arte reconocerán que una buena correlación que existe entre las actividades neutralizantes del anticuerpo *in vitro* y la protección *in vivo* para muchos diferentes virus, rutas de reto, y modelos de animales. (Véase Burton, Natl. Rev. Immunol. 2:706-13 (2002); Parren et al., Adv. Immunol. 77:195-262 (2001)). Los datos presentados aquí demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos D7, D8, F10, G 17, H40, A66, D80, E88, E90, y H98 pueden además ser desarrollados y probados en estudios animales *in vivo* para determinar la utilidad clínica como un potente inhibidor de entrada viral para emergencias de profilaxis y tratamiento de influenza.

Quimeras Antígeno-Ig en Vacunación

Ya hace más de una década desde que los primeros anticuerpos fueron utilizados como andamio para la presentación eficiente de determinantes antigénicos a los sistemas inmunológicos. (Véase Zanetti, Nature 355:476-77 (1992); Zaghouani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:631-35 (1995)). Cuando un péptido es incluido como una parte integral de una molécula IgG (p.e., el anticuerpo monoclonal 11A o 256 IgG1 descrito aquí), la antigenicidad e inmunogenicidad de los epítomos péptido es altamente mejorada comparado con el péptido libre. Tal mejora es posible por la vida media más larga de las quimeras

antígeno-IgG, mejor presentación y conformación constreñida, que imita a sus estructuras nativas.

Más aún, una ventaja más de utilizar una quimeras antígeno-Ig es que ya sea la variable o la región Fc de la quimera antígeno-Ig puede ser utilizada para dirigirse a células de presentación de antígeno profesionales (APCs). A la fecha, lgs recomendados han sido generados en los cuales las regiones complementariamente determinantes (CDRs) del gen variable de cadena pesada (V_H) son reemplazados con varios péptidos antigénicos reconocidos por células B o T. tales quimeras antígeno-Ig han sido utilizadas para introducir respuestas inmunes humorales y celulares. (Véase Bona et al., Immunol. Today 19:126-33 (1998)).

Las quimeras epítomos específicos implantadas en la curva CDR3 han sido utilizadas para inducir respuestas humorales ya sea a HIV-1 gp120 V3-loop o al primer dominio extracelular (D1) de receptor humano CD4. (Véase Lanza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11683-87 (1993); Zaghouani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:631-35 (1995)). El suero inmune fue capaz de prevenir infección de células CD4 SupT1l por HIV-1MN (anti-gp120 V3C) o inhibir la formación de sincitias (anti-CD4-D1). Las CDR2 y CDR3 pueden ser reemplazadas con péptidos epítomos simultáneamente, y la longitud del péptido insertado puede ser hasta de 19 aminoácidos de longitud.

Alternativamente, un grupo ha desarrollado una estrategia "troybody" en la cual antígenos péptidos son presentados en las curvas de la región constante (C) Ig y la región variable de la quimera puede ser utilizada para dirigirse a IgD en la superficie de las células B o moléculas MHC clase II en APCs profesionales incluyendo células B, células dendríticas (DC) y macrófagos. (Véase Lunde et al., Biochem. Soc. Trans. 30:500-6 (2002)).

Una quimera antígeno-Ig puede también ser hecha por la fusión directa del antígeno con la porción Fc de una molécula IgG. You et al., Cancer Res. 61:3704-11 (2001) fueron capaces de obtener todas las armas de una respuesta inmune específica, incluyendo muy altos niveles de anticuerpos para el antígeno núcleo del virus de hepatitis B utilizando este método.

Vacuna de DNA

Las vacunas de DNA son estables, pueden proveer al antígeno una oportunidad para ser naturalmente procesado, y pueden incluir una respuesta de larga duración. Aunque es una estrategia de inmunización muy atractiva, las vacunas de DNA frecuentemente tienen una potencia muy limitada para inducir respuestas inmunes. Una acogida pobre de DNA inyectado por APCs profesionales, como células dendríticas (DCs), puede ser la causa principal de tal limitación. Combinadas con las vacunas quimera antígeno-Ig, una prometedora nueva estrategia de vacuna de DNA basada en el mejoramiento de la presentación del antígeno APC se ha reportado (véase Casares, et al., Viral Immunol. 10:129-36 (1997); Gerloni et al., Nat. Biotech. 15:876-81 (1997); Gerloni et al., DNA Cell Biol. 16:611-25 (1997); You et al., Cancer Res. 61:3704-11 (2001)), que toma ventaja de la presencia de receptores Fc (FcγRs) en la superficie de las DCs.

Es posible generar una vacuna de DNA codificando una quimera antígeno (Ag)-Ig. Frente a la inmunización, proteínas de fusión Ag-Ig serán expresadas y secretadas por las células que toman las moléculas de DNA. Las proteínas de fusión Ag-Ig secretadas, mientras que introducen respuestas a células B, puede ser capturadas e internalizadas por interacción del fragmento Fc con FcγRs en la superficie de DC, lo que promoverá presentación eficiente de antígeno e

incrementará notablemente la respuestas inmunes antígeno específicas. Aplicando el mismo principio, las quimeras antígeno-Ig que codifican DNA que cargan una región funcional anti-MHC II específica scFv de gen también puede dirigirse a los inmuno genes de todos los tres tipos de APCs- las respuestas

5 inmunes pueden además ser incrementadas con el uso de los mismos antígenos de proteína generados *in vitro* (p.e., "preparación e incremento"), de ser necesario. Utilizando esa estrategia, respuestas inmunes celulares y humorales específicas contra la infección del virus de influenza fueron logradas a través de inyecciones intramusculares (i.m.) de una vacuna de DNA (véase Casares et al., Viral.

10 Immunol. 10:129-36 (1997)).

Composiciones de Vacunas

Composiciones terapéuticas o profiláctica es se proveen aquí, las cuales

15 generalmente se componen de mezclas de uno o más anticuerpos monoclonales o ScFvs y combinaciones de los mismos. Las vacunas profiláctica su pueden ser utilizadas para prevenir una infección del virus de influenza y las vacunas terapéuticas pueden ser utilizadas para tratar individuos después de una infección del virus de influenza. Los usos profilácticos incluyen la provisión de titer de

20 anticuerpos incrementada a un virus de influenza en un sujeto de vacunación. En esta forma, sujetos en alto riesgo de contraer influenza se les puede proveer con inmunidad pasiva a un virus de influenza.

Estas composiciones de vacunas pueden ser administradas en conjunto con agentes inmuno regulatorios auxiliares. Por ejemplo, cytokines, lymphokines, y

25 chemokines, incluyendo, pero no limitado a, IL-2, IL-2 modificado (Cys125 → Ser125), GM-CSF, IL-12, γ -interferon, IP-10, MIP1 β , y RANTES.

Métodos de Inmunización

Las vacunas de la presente invención tienen inmuno protección superior y propiedades inmuno terapéuticas sobre otras vacunas antivirales. La invención
5 provee un método de inmunización, *p.e.*, induciendo una respuesta inmune, de un sujeto. Un sujeto es inmunizado administrándole al sujeto una composición conteniendo una proteína de fusión de membrana de un virus patogénico envuelto. La proteína de fusión es cubierta o contenida en una matriz biológicamente compatible.

10 La proteína de fusión es glicosilada, *p.e.* contiene fracción de acarbohydrate. La fracción de carbohidrato puede ser en la forma de monosacárido, disacárido(s). oligosacárido(s), polisacárido(s), o sus derivados (*p.e.* sulfuro- o fósforo-sustituidos). El carbohidrato es lineal o ramificado. La fracción de carbohidrato está ligada N o ligada O a un polipéptido. La glicosilación
15 ligada N es a la amida nitrógeno de de cadenas laterales de asparagina y la glicosilación ligada N es al hidróxido de oxígeno de cadenas laterales de serina y treonina.

La fracción de carbohidrato es endógena al sujeto que se va a vacunar. Alternativamente la fracción de carbohidrato es exógena al sujeto que se va a
20 vacunar. La fracción de carbohidrato son fracciones de carbohidrato que no son típicamente expresadas en polipéptidos del sujeto que se va a vacunar. Por ejemplo, las fracciones de carbohidrato son carbohidratos específicos de plantas. Fracciones de carbohidrato específicas de plantas incluyen por ejemplo glicanos ligados N que tienen un enlace de núcleo α 1,3 fucose o un enlace de núcleo β 1,2
25 xylose. Alternativamente, la fracción de carbohidrato son fracciones de carbohidratos son expresadas en polipéptidos o lípidos del sujeto que se va a vacunar. Por ejemplo muchas células huésped han sido genéticamente diseñadas

para producir proteínas humanas con accesorios de azúcar que parecen humanos.

Por ejemplo, la proteína de fusión es una proteína de hemaglutinina trimerica. Opcionalmente, la proteína de hemaglutinina es producida en una célula
5 no mamífera como una célula de planta. El sujeto está en riesgo de desarrollar o sufrir de una infección viral. Virus envueltos incluyen por ejemplo, virus epstein-barr, virus de herpes simplex, tipo 1 y 2, cytomegalovirus humano, herpesvirus humano, tipo 8, virus de varicela zoster, virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, virus de inmunodeficiencia humana, virus de influenza, virus del sarampión, virus
10 de paperas, virus parainfluenza, virus respiratorio sincitial, virus de rabia, y virus de rubéola. Los métodos descritos aquí llevan a la reducción en la severidad o la alivianción de uno o más síntomas de una infección viral las infecciones son diagnosticadas y o monitoreadas, típicamente por médicos utilizando metodologías estándar. Un sujeto que requiere inmunización es identificado por
15 métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, sujetos son inmunizados como se determina en el CDC's General Recommendation on Immunization (51(RR02) ppl-36). El cáncer es diagnosticado por ejemplo por un examen físico, biopsia, examen de sangre o rayos X. El sujeto es *p.e.*, cualquier mamífero *p.e.*, un humano, un primate, ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo, cerdo, un pescado o un
20 pájaro. El tratamiento es administrado antes del diagnóstico de la infección. Alternativamente, el tratamiento es administrado después del diagnóstico.

La eficacia del tratamiento se determina en asociación con cualquier método conocido para el diagnóstico o tratamiento de la infección o desorden particular. El alivio de uno o más de los síntomas del desorden indica que el
25 compuesto confiere un beneficio clínico.

Evaluación de Fragmentos de Proteína Antigénica (APFs) para Potencial

Vacunación

Una vacuna candidata que se dirija a la inmunidad humoral debe llenar por lo menos tres criterios para ser exitosa: debe provocar una respuesta de anticuerpos fuerte ("inmunogenicidad"); una fracción significativa de los anticuerpos que provoca deben tener una reacción cruzada con el patógeno ("salud inmunogénica"); y los anticuerpos que provoca deben proteger. Mientras la inmunogenicidad puede normalmente ser incrementada utilizando adyuvantes o portadores, salud inmunogénica y la habilidad de inducir protección (como se evidencia por la neutralización) son propiedades intrínsecas de un antígeno que ultimadamente determinará el éxito de ese antígeno como un componente de vacuna.

Evaluación de Salud inmunogénica

"Salud inmunogénica" es definida como la fracción de anticuerpos inducidos por un antígeno tienen reacción cruzada con el patógeno. (Véase Matthews et al., J. Immunol. 169:837 (2002)). Es diferente de la inmunogenicidad, que es medida por el titer de todos los anticuerpos inducidos por un antígeno, incluyendo aquellos anticuerpos que no tuvieron reacción cruzada con el patógeno. Una salud inmunogénica inadecuada probablemente ha contribuido a un historial decepcionante de vacunas de péptido a la fecha. Péptidos que se enlazan con alta afinidad a anticuerpos y provocan altos titers de anticuerpo frecuentemente les falta la adecuada salud inmunogénica, y, por lo tanto, éstos fallan como potenciales componentes de vacuna. Por lo tanto, es importante incluir la salud

inmunogénica como un criterio de selección de candidatos de vacuna para influenza.

Una explicación común para la pobre salud inmunogénica es la flexibilidad de conformación de la mayor parte de los péptidos cortos. Específicamente, un péptido flexible puede enlazarse bien a anticuerpos desde los pacientes, y producir titers de anticuerpos sustancial en sujetos ingenuos. Sin embargo, si el péptido tiene un largo repertorio de conformaciones, una preponderancia de anticuerpos que éste induce en sujetos ingenuos puede fallar en la reacción cruzada con el correspondiente epítipo ingenuo en patógenos intactos.

Así como los péptidos cortos, algunas APFs puede ser altamente flexibles y, por lo tanto puede fallar como componentes de vacunas. Las APFs más inmunogénicamente convenientes es probable que consistan de sub dominios de proteínas de doblado propio que están intrínsecamente constreñidas afuera del contexto de toda la proteína.

El hecho que la salud inmunogénica es una propiedad de la APF en sí misma, y no del sistema inmune que responde, la salud inmunogénica puede ser evaluada en un modelo animal (*p.e.* en un ratón) aunque ultimadamente la APF tendrá que desempeñarse en humanos.

La salud inmunogénica alcanzada por APFs es evaluada por la inmuno absorción de suero anti-APF con puntas purificadas o proteína de membrana, en un procedimiento análogo al descrito en Matthews et al., J. Immunol. 169:837 (2002). IgG es purificado del suero recogido de ratones que han sido inmunizados. Proteínas purificadas, biotinylated (como se ha apropiado, dependiendo del APF particular con el cual los ratones fueron inmunizados) son mezcladas con el IgG de ratón e incubado. Esferas sepharose cubiertas con streptavidina son entonces añadidas en cantidades suficientes para capturar todos las proteínas biotiniladas, junto con cualquier IgG enlazado. Las esferas cubiertas con streptavidina son

removidas por centrifuga a 13,000 rpm en una micro centrifuga, dejando los IgG que han sido despojados de anticuerpos dirigidos contra la proteína, respectivamente. Inmuno absorciones falsas son llevadas a cabo en paralelo de la misma forma, excepto que los BSA biotinilados serán sustituidos por proteínas de
5 influenza como un absorbente falso.

Para medir la salud inmunogénica de las APFs, los anticuerpos absorbidos y los anticuerpos falsamente absorbidos son titer lado a lado en ELISA contra la APF inmunizante. Para la afinidad de APFs seleccionadas de un visor fago NPL, el antígeno para estos ELISAs será purificado con proteínas de fusión APF-GST-
10 para las potencialmente glicosiliadas APFs de las células de mamífero de visor NPL, el antígeno para estas ELISAs serán proteínas de fusión APF-Fc secretadas por células mamíferas el purificadas con proteínas A. el porcentaje de disminución en el titer anti-APF de anticuerpos absorbidos comparado con los anticuerpos falsamente absorbidos proveerán una medida de la salud inmunogénica de las
15 APF.

Métodos de Tratamiento

La invención provee ambos métodos profiláctico y terapéutico de tratar un
20 sujeto en riesgo de (o susceptible a) contraer enfermedad o desorden relacionada con el virus de influenza. Tales enfermedades o desórdenes incluyen pero no están limitadas a ,p.e., gripe aviar.

Métodos Profilácticos

25 En un aspecto, la invención provee métodos para prevenir una enfermedad o desorden relacionada con el virus de influenza en un sujeto suministrando de al

sujeto un anticuerpo monoclonal o anticuerpo scFv de la invención a un agente identificado de acuerdo con los métodos de la invención. Por ejemplo, anticuerpos scFV y/o monoclonal D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 y H98 puede ser administrado en cantidades terapéuticamente efectivas. Opcionalmente, dos o
5 más anticuerpos anti influenza son co administrados.

Sujetos en riesgo de contraer una enfermedad o desorden relacionada con virus de influenza incluye pacientes que han entrado en contacto con una persona infectada o han estado expuestos al virus de influenza en otra forma. La administración de un agente profiláctico puede ocurrir antes de la manifestación de
10 síntomas característicos de la enfermedad o desorden relacionada con el virus de influenza, de tal forma que una enfermedad o desorden desprevenido o, alternativamente, demorado en su progresión.

El agente apropiado puede ser determinado en base a ensayos de detección descritos aquí. Alternativamente, o en adición, el agente a ser
15 administrado es un anticuerpo scFv o monoclonal que neutraliza un virus de influenza que ha sido identificado de acuerdo con el método de esta invención.

Métodos Terapéuticos

Otro aspecto la invención se relaciona con métodos de tratamiento de una enfermedad o desorden relacionada con virus de influenza en un paciente. En una materialización, el método involucra administrar una gente (*p.e.*, un agente identificado por un ensayo de detección escrito aquí y/o un anticuerpo scFv o un anticuerpo monoclonal identificado de acuerdo con el método de la inversión), o
20 combinación de agentes que neutralizan la influenza a pacientes que sufren la enfermedad o desorden.

Métodos combinados

La invención provee tratamiento de una enfermedad o desorden relacionada con influenza, como la gripe aviar, en pacientes administrando dos o
5 más anticuerpos, como D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90 y H98 que se enlazan al mismo epítipo de la proteína HA.

La invención además se describe en los siguientes ejemplos, los que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

10

EJEMPLOS

Ejemplo 1: métodos generales

Expresión y preparación de varios antígenos de inmunopurificación para la selección de colección de anticuerpos que exhiben fago.

HA1. HA1 es el fragmento de terminal N (aa17-338) de (A/Thailand/2(SP-
15 33)/2004(H5N1). El gen es codón optimizado y expresado como proteína de fusión con una etiqueta de 19 aminoácidos de terminal C (etiqueta C9:GTETSQVAPA **(SEQ ID NO: 103)**). Se expresa la proteína de fusión HA1-C9 en células 293T transitoriamente y se purifica la proteína secretada del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad. Se utiliza la proteína A Sefarosa acoplada de forma
20 covalente con el anticuerpo 1D4 anti-C9 (National Cell Culture Center) para purificación de HA1-C9.

HA0 Trimérico. Se expresa el ectodominio (HA0) del gen de hemagglutinina (HA) de A/Viet Nam/1203/2004 en células de insecto como una proteína de fusión al adaptar el protocolo descrito previamente³³. Esta construcción contiene una
25 secuencia 'foldon' que trimeriza el terminal C de la fibrina T4 del bacteriófago para estabilizar la estructura trimérica, seguida por un sitio de trombina y una etiqueta His6 **(SEQ ID NO: 104)**. El cADN de la proteína de fusión se clona en el vector de

transferencia de baculovirus, pAcGP67A (BD Biosciences, Bedford, MA) que permite la secreción eficiente de la proteína recombinante. Se infectan 9×10^6 células con la estirpe vírica. 3 días después de la infección, se centrifugan las células y se incuban el sobrenadante con 6 ml de microesferas de Ni-NTA (Qiagen Inc, Valencia, CA). Se lavan las microesferas con regulador TBS (Tris.HCl 10 mM/ NaCl 80 mM, pH 8.0) con imidazol 10 mM y se eluye con TBS con imidazol 250 mM. La proteína HA5 eluida se dializa contra el regulador TBS y se purifica adicionalmente mediante intercambio iónico utilizando la columna Mono Q HR10/10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se digiere el HA5 purificado mediante trombina durante la noche. Se examina la integridad y propiedad del trímero HA0 utilizando filtración Gel (columna Superdex 200) y SDS-PAGE.

Selección de colección de anticuerpo fago y detección de anticuerpos contra H5.

Dos colecciones de scFv humanas no inmunes (un total de 2.7×10^{10} miembros) construidas de células B de 57 donantes no inmunizados fueron utilizados para seleccionar scFv contra el HA1 purificado o HA0 trimérico. 5×10^{11} pfu de fago-scFvs preparados de cada colección fueron incubados con inmuno tubos (Nunc, Naperville, IL) cubiertos con 10 μ g de HA1 o HA0, separadamente. Los procedimientos de selección fueron los mismos descritos anteriormente. Después de dos rondas de selección, clones de fago-scFv sencillo escogidos aleatoriamente fueron detectados para enlace específico a HA1 o HA0 por ensayos inmuno absorbente de enzimas enlazadas (ELISA) como se describió anteriormente. Los clones que se enlazaron a HA1 o HA0 con valores A_{450} de >1.0 fueron calificados como positivos, mientras que clones negativos dieron valores de <0.1 . Para clones HA1 o HA0 específicamente enlazados, los genes de regiones variables de cadenas pesadas (VH) y livianas (VL) fueron secuenciados y sus

secuencias de aminoácidos correspondientes fueron alineados para identificar anticuerpos con diferente secuencia para más caracterización.

Expresión y purificación de scFv-Fcs soluble y humano de IgG1 longitud completa.

5

Fago-scFvs de clones individuales fueron producidos por ensayo de neutralización utilizando el mismo método que para hacer la colección fago. Partículas fago fueron concentradas 25 veces utilizando precipitación PEG/NaCl. scFv-Fcs e IgG1s humanos completos fueron producidos como se describió anteriormente. En resumen, los scFvs seleccionados fueron convertidos a scFv-Fcs subclonando los scFv en vector de expresión Fc pcDNA 3.1-Hinge que contiene la bisagra, CH2 y dominios CH3 de IgG1 humano pero le falta CH1. Para IgG1 humanos completos, los fragmentos de gen VH y VL de scFv fueron subclonados separadamente en IgG1 humanos cadena liviana kappa o cadena liviana lambda vectores de expresión TCAE5 o TCAE6. scFv-Fcs o IgG1s fueron expresados en células 293T o 293F (Invitrogen) por transfección transiente y purificados por cromatografía de afinidad de proteína A sepharose.

20

Análisis de Superficie de la Resonancia de Plasmón (SPR)

25

Análisis cinéticos de los enlaces H5 HA Mabs al trímero recombinante HA0 (VietNam1203/04) fueron llevados a cabo en una Biacore T100 (Biacore) a 25°C. El anticuerpo IgG Fc antihumano (Biacore) fue covalentemente cubierta a superficies celulares de flujo individuales con un chip sensor CM4 por amino-juntura utilizando el paquete de juntura amino (Biacore). HA Mabs fueron capturados en superficies IgG Fc anti humanas a la velocidad de flujo de 10ul/min en tapón HBS (Biacore) para asegurar que el enlace Mab-HA0 ocurriera como una

interacción Langmuir homogénea 1:1. HA0 fue inyectado sobre cada cédula de flujo a la velocidad de flujo de 30ul/min en tapón HBS, y en concentraciones en un rango desde 0.31 a 20 nM. Una inyección de tapón sirvió como control negativo. Todos los experimentos contenidos en un control de superficie de anticuerpo IgG Fc anti humano adicional que sirvió para llevar cuenta de cambios en el índice refractivo de tapón y para probar interacciones potenciales no específicas entre HA0 y IgG Fc anti humano. Después de completar a cada ciclo de asociación y disociación, la superficies fueron regeneradas con una solución 3M MgCl₂. La proporción de asociaciones (k_a), constantes de proporción de disociación (k_d), y constantes de afinidad (KD) fueron calculadas utilizando el software de evaluación Biacore T100. La benevolencia de cada ajuste fue basada en el acuerdo entre los datos experimentales y los ajustes calculados, donde los valores χ^2 estuvieron por debajo de 1.0. Las densidades de superficie de Mabs contra HA0 fueron optimizadas para minimizar la transferencia de masa y evitar cualquier contribución de efectos de avidéz. Todos dos k_a , k_d , KD reportados aquí representan los promedios y errores estándar de tres experimentos.

Virus y Células

Los virus de influenza de tipo salvaje A/Vietnam/1203/2004 (H5N1; H5-VN04), A/HongKong/483/1997 (H5N1; H5-HK97), A/Netherlands/219/2003 (H7N7; H7-NL03), y A/Ohio/4/1983 (H1N1; H1-0H83) así como cepas de vacuna adaptadas a frío de A/Ann Arbor/6/1960 (H2N2) fueron obtenidas de la red WHO Global Influenza Surveillance Network y provistas por Alexander Klimov (CDC, Atlanta, USA). H1-PR34 y células Madin-Darby canine kidney (MDCK) fueron obtenidas de la American Type Culture Collection y propagadas en Dulbecco's Modification del Eagle's Medium con 10% de suero fetal bovino. La infectividad

viral fue determinada por ensayos de placa en células MDCK. Virus vivo de tipo salvaje H5N1 fueron manejados en contención de bioseguridad nivel 3, incluyendo mejoras requeridas por el Departamento de Agricultura de los EEUU y el programa de

	Agentes	Seleccionados
--	---------	---------------

5 <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/bmb15toc.htm>.

Ensayo de neutralización con virus HA-pseudotipo

Plásmidos y Montajes

10

El gen HA de longitud completa de A/Thailand/2(SP-33)/2004(H5N1)), H5-SP33, y gen de neuraminidasa de A/Vietnam 1203/2004, N1, fueron codón-optimizadas y clonadas en vector pcDNA3.1 para obtener la expresión plásmida pcDNA3.1-H5-SP33 y pcDNA3.1-N1, separadamente. La plásmida codificada pCAGGS-H1(SC) A/South Carolina/1/1918 (H1N1) proteína HA de largo completo

15 HA protein fue amablemente proveida por forma de Dr. P.Palese (Mount Sinai School of Medicine, US). La plásmida codificada pCAGGS-H1(PR) A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) proteína HA fue un obsequio generoso del Dr. M. Farzan (Harvard Medical School, US).

20

Construyendo los virus HA-pseudotipo

La ronda simple de reporte de virus HIV luciferase de H5N1 o H1N1 pseudotipo por H5-SP33, H1-SC/1918 o H1-PR/34 fueron hechos por co-transfección de células 293T con 4 plásmidos que son pcDNA3.1-H5-SP33, vector de empaque HIV pCMVΔR 8.2 codificando HIV-1 Gag-Pol⁵⁷, vector de transferencia pHIV-Luc codificando el gen reporte de luciferase de luciérnaga bajo

25

el control del HIV-1 LTR, y expresando plásmida pcDNA3.1-N1. 36 horas post-transfección, sobrenadantes virales fueron cosechados y almacenados a 4°C.

Ensayos de neutralización

5 Antes de transducir células, sobrenadantes virales de virus pseudotipo H1-SC/1918 o H1-PR/34F fueron incubados con 16µg/mL TPCK-tratado trpsin por una hora a 25 °C y después neutralizados con solución neutralizante trypsin (TNS, Cambrex) a la proporción de 1:1 (V/V). Anticuerpos de prueba o suero fueron incubados con cantidad adecuada de pseudotipo H5-SP33 o virus pseudotipo H1

10 trpsin-tratado por 30 mins a RT. La mezcla fue entonces adicionada hacerlas 293T en 96 platos de pozo y se continuó el cultivo por 48 horas. El nivel de entrada viral fue evaluado midiendo la actividad luciferase en las células objetivo con un luminometro de micro plato.

15 *Mapeo de epítipo de de anticuerpo 8, 10 y 66*

Plásmidos y Montajes

pcDNA3.1-H5-SP33, pCAGGS-H1(SC) y pCAGGS-H1(PR) fueron descritos

20 arriba pCAGGS-H7 (FPV) que codifica proteínas HA para A/FPV/Rostock/34 (H7N1) fue amablemente provista por el Dr. X. Yang (Beth Israel Deaconess Medical Center). Todas las mutaciones de pcDNA3.1-H5-SP33 o pCAGGS-H7 (FPV) fueron construidas por el método QuikChange (Stratagene). Análisis de flujo de citometría del enlace de anticuerpos anti-H5 a células expresando HA. Varias

25 HA y mutaciones de HA de tipo salvaje y longitud completa expresando plásmidas para H1, H5 o H7 fueron transfectadas transientemente en células 293T. 48 horas después de la transfección, anticuerpos anti-H5 (10ug/ml) fueron incubados con

células 293T transfectadas a 4 °C por 1 hora. Las células fueron entonces lavadas tres veces con PBS que contenía 0.5% BSA y 0.1 % NaN₃. Para la detección de anticuerpos anti-H5 enlazándose a células transfectadas HA, IgG de cabra anti humano etiquetado-FITC (Pierce) fue utilizado como segundo anticuerpo he
5 incubado con células a 4 °C por 30 min. Las células fueron lavadas nuevamente como se describió arriba y analizadas utilizando un Becton Dickinson FACScaliber con software CellQuest.

Ensayo de micro neutralización

10

El método fue llevado a cabo como se describió anteriormente⁴⁸. En corto, 100 TCID₅₀ (dosis infecciosas de cultivo de tejido medían) de virus fueron mezcladas en igual volumen con diluciones de solución de anticuerpo de reserva (1 mg/ml) en 96 platos de pozo de cultivo de tejidos, seguidos por incubación a 37
15 °C por 20 horas. Para establecer el punto final, mono capas de células fueron lavadas con PBS, fijada en acetona, y antígeno viral detectado por ELISA indirecto con un mAb contra influenza A NP (A-3, preciso).

Ensayo de Reducción en Placa

20

Virus A/Viet Nam 1203/2004 (H5N1) o A/Netherland/219/03 (H7N7) (10,000 pfu) fueron incubados con anti-H5 scFv-Fcs a tres diferentes concentraciones 100ug/ml, 10ug/ml y 1ug/ml a 37 °C por 30 mins. La mezcla virus-anticuerpo fue transferida a células mono capa MDCK en 12 platos de pozo incubadas a 37 °C
25 por 1 hora y las células fueron después lavadas y sobrepuestas con agar. Después de 4 días de incubación, la sobreposición de agar fue desechada, y las placas fueron visualizadas por teñido de cristal violeta.

Ensayo de inhibición de hemaglutinización (HI)

Virus de influenza aviar preferiblemente enlazado a receptores de ácido siálico que contienen uniones de ácido N-acteylneuraminic $\alpha 2,3$ -galactose ($\alpha 2,3$ Gal) mientras que virus humano preferencialmente enlazados a aquellos
5 conteniendo uniones de ácido N-acteylneuraminic $\alpha 2,6$ -galactose ($\alpha 2,6$ Gal). La base molecular para especificidad de receptor es más probablemente determinada por un set complejo de residuos en la HA viral. Las pruebas de inhibición de hemaglutinización (HI) son un método sencillo y ampliamente utilizado para evaluar las respuestas de anticuerpos a la hemaglutinina de influenza. Stephenson
10 et al. Reportaron que utilizando eritrocitos de caballo y por lo tanto incrementando la proporción de uniones de $\alpha 2,3$ Gal disponibles para enlace, la sensibilidad de los ensayos de hemaglutinización fueron mejorados. Adicionalmente, los titers del ensayo HI se correlacionaron bien con los titers del ensayo de micro neutralización. Los virus pseudotipo serán titered primero utilizando
15 hemaglutinización de eritrocitos de caballo como se describió. Las pantallas iniciales de salida alta serán similarmente llevadas a cabo utilizando suspensiones de eritrocitos de caballo y ensayando la habilidad de los anticuerpos fago para inhibir el punto final de HI de los virus titered H5/N1. Pantallas secundarias más detalladas para la inhibición de la entrada de reporte de virus H5N1 y HI serán
20 preformadas utilizando estudios de respuesta de dosis con proteínas solubles scFvFc producidas por la células 293T transientemente transfeccionadas y purificadas por esferas de proteína A.

Ensayo de inhibición de enlace viral

25 0.5x10⁶ células 923T fueron incubadas con virus H5-TH04-pseudotipo HIV (~ 500 ng de p24) en la presencia de anti-H5 mAbs, control mAbs, en la ausencia de anticuerpos, en un tapón de PBS conteniendo 0.5% BSA y 0.02% NaN₃ a 4 °C.

Después de una hora incubación, las células fueron centrifugadas. Los sobrenadantes fueron recolectados y probados por p24 niveles utilizando un paquete ELISA de captura HIV-1 p24^{CA} (NCI, Frederick, NIH) para cuantificar los virus no enlazados. Las células fueron entonces lavadas una o dos veces y lisis
5 para cuantificar los virus enlazados a células utilizando el mismo método.

Ensayo de inhibición de fusión celular

Células 293T, ~90% confluentes en seis platos de pozo, fueron trasfectadas con plásmidas pcDNA3.1-H5-TH04 y pcDNA 3.1-N1 a una proporción de 4:1 (3 µg
10 total DNA / pozo) utilizando lipofectamine 2000 (Invitrogen). El medio de cultivo fue suplantado con 1 ml de anti-H5, control o falsos mAbs a 6 horas post-transfección, y células cultivadas por 36 horas. Las células fueron observadas por formación de sincitias con un microscopio de fase contrastante. Micro fotografías fueron tomadas a una magnificación de 10x.

15

Expresión y preparación de varias proteínas HA para inmunopurificación

El HA1 es un fragmento de terminal N de HA de H5N1 A/Thailand/2(SP-33)/2004 (H5-TH04), residuos 11 a 325 (numeración H3). El gen es el codón optimizado y expresado como proteína de fusión con una etiqueta de 9
20 aminoácidos en el terminal C (etiqueta C9 GTETSQVAPA (**SEQ ID NO: 103**)). Se expresa la proteína de fusión HA1-C9 en células 293T transitoriamente y se cosechan la proteínas secretadas en el sobrenadante 48 horas después de la transfección y se purifica del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad utilizando Proteína A Sefarosa que se acopla de forma covalente con el anticuerpo
25 1D4 anti-C9 (National Cell Culture Center). El método para producir la proteína HA0 de H5-VN04 es el mismo como se describe adelante para la cristalización del complejo H5-F10 pero sin la coinfección de baculovirus para la división de furina.

ELISA

0.2 µg de proteínas H5 HA horas fueron cubiertas en 96 platos de pozo Maxisorb ELISA (Nunc, NY) a 2 µg/mL en PBS a 4 °C durante la noche. El plato fue lavado con PBS por 3 veces para remover proteínas sin cubrir. Para ELISA regular, 1 µg/mL de anti-H5 scFv-Fcs seguido por IgG1 HRP anti humano fueron utilizados para detectar el enlace de anti-H5 scFv-Fcs a proteínas H5 HA. Para completar ELISA, 50 µL(10^{12} pfu) de anti-H5 fago-scFvs fueron mezclados con 5 µg/mL de anti-H5 scFv-Fcs y aplicados a platos H5-VN04 HA cubiertos de ELISA. La competición de scFv-Fcs para el enlace de fago-scFvs a HA0 fueron determinados midiendo los enlaces restantes de fago-scFvs utilizando HRP-anti-M13. La densidad óptica a 450 nm fue medida después de incubación de sistema de sustrato peroxidase tetramethylbenzidine (TMB) (KPL, Gaithersburg MD).

Expresión, purificación, y cristalización del complejo H5-F10

El gen que codifica la cadena sencilla (V_H -ligador- V_L) F10 (scFv) se clona en el vector pSynI que contiene una señal de secreción periplasmática de terminal N pelB, y una etiqueta 6xHis de terminal C (**SEQ ID NO: 104**). Se expresa el F10 scFv en células XL10 en medios 2YT que contienen 0.1% de glucosa (p/v) a 25° C durante 15 horas con IPTG 0.5 mM. Se purifica la proteína primero mediante Hisbind Ni-NTA (Novagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y luego mediante Superdex 200 (Amersham Biosciences) en Tris-HCl 50 mM , NaCl 0.5 M, pH 8.

Se expresa el ectodominio del gen Ha H5-VN04 en células de insecto como una proteína de fusión al adaptar el protocolo descrito previamente⁶. Esta construcción contiene una secuencia 'foldon' que trimeriza el terminal C de la fibrina T4 del bacteriófago para estabilizar la estructura trimérica, seguida por un sitio de

trombina y una etiqueta His₆ (**SEQ ID NO: 104**). El cADN de la proteína de fusión se clona en el vector de transferencia de baculovirus, pAcGP67A (BD Biosciences, Bedford, MA) que permite la secreción eficiente de la proteína recombinante. Para obtener HA completamente dividido (como trímeros HA1-HA2), se coinfectan
5 células sf9 con estirpes de baculovirus de HA0 y furina en una relación empíricamente derivada. El cADN de furina es un obsequio del Dr. Robert Fuller (Universidad de Michigan). Tres días después de infección, se centrifugan las células y se incuba el sobrenadante con microesferas de Ni-NTA (Qiagen Inc., Valencia, CA). Se lavan las microesferas con regulador TBS (Tris.HCl 10 mM/
10 NaCl 80 mM, pH 8.0) con imidazol 10 mM y se eluye con TBS con imidazol 250 mM. La proteína H5 eluida se dializa contra el regulador TBS y se purifica adicionalmente mediante intercambio iónico utilizando la columna Mono Q HR10/10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se digiere el H5 purificado mediante trombina durante la noche. Y se purifica adicionalmente mediante columna
15 Superdex 200 en el regulador TBS.

Los complejos H5-F10 fueron formados mezclando los dos componentes purificados, y aislando por Superdex 200 en tapón TBS (Figura suplementaria 1b). Fracciones pico fueron reunidas y concentradas a ~11 mg/ml. La integridad del trímero H5 fue examinada utilizando filtración Gel (Superdex 200 columna) y SDS-
20 PAGE. Cristales creciendo por el método de vapor difusión de caída colgante a 22 °C. Dos µL de H5-F10 fueron mezclados con un volumen igual de 12.5% PEG 1K, 25% glicol etileno, 100 mM Tris, pH 8.5. Cristales fueron ultra congelados en nitrógeno líquido antes de la recolección de datos.

25 *Co-cristalización del complejo H5-F10*

Para co-cristalización del complejo H5-F10, F10 fue expresada en *E. coli* y purificada por Ni-NTA y filtración de gel. H5 fue expresada por co-infección de H5

y furin baculovirus de reservas en células sf9, y purificadas por Ni-NTA, intercambio de ion anión, y cromografía de filtración de gel. Los complejos H5-F10 fueron obtenidos mezclando H5 con un exceso de F10 y aislando por filtración de gel. Cristales fueron cultivados mezclando 2 μ L de complejos (~11 mg/ml) con un volumen igual de 12.5% PEG 1K, 25% glicol etileno, 100 mM Tris, pH 8.5 utilizando el método de vapor difusión de caída colgante a 22 °C. La estructura de cristal fue determinada a 3.2 Å de resolución por Reemplazo Molecular y refinado a un R_{FREE} de .29 con excelente geometría.

10 *Recolección de datos, determinación de estructura, y refinamiento*

Datos de difracción por rayos X fueron recolectados en el Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL) líneas de rayos 7.1 y 9. 2. Los datos fueron procesados con XDS⁷ y el paquete HKL2000.

La estructura del complejo H5-F10 fue determinada por reemplazo molecular con PHASER utilizando la estructura de H5 (A/Vietnam/1194/04; PDB code 2IBX) y la estructura scFv de SARS nAb 80R (PDB code 2GHW) como modelos de búsqueda. La estructura scFv de modelo homólogo fue construida con WHATIF⁹. La unidad asimétrica tiene todos trímeros H5 y seis moléculas F10.

Soluciones para reemplazo molecular fueron objeto de varias rondas de refinamiento con el programa REFMAC5 con un recocido simulado en CNS y reconstrucción de modelo manual con Coot y Xtalview. El modelo final incluye residuos 506/503/503/496/495/496 para 6 copias idénticas de HA, respectivamente, 233 residuos por cada nAb10, 24 N-acetyl-d-glucosamine y 6 β -d-mannose, 0 moléculas de agua. Los parámetros geométricos fueron evaluados con PROCHECK y Rampage.

Protección de ratones con hMabs contra H5

Todos los estudios de ratones fueron realizados en facilidades animales acreditadas por USDA y CDC como nivel de bioseguridad 3 (BSL3) conforme con los protocolos aprobados por el CDC Animal Care y el Use Committee. Ratones hembra de 8-10 semanas de vida Balb/C (5 por grupo) fueron utilizados en todos los experimentos. Para todos los grupos, los ratones fueron observados por 2 semanas, el peso y las muertes anotadas a diario.

Estudio profiláctico en ratón

Tres hMabs (D8-IgG1, F10-IgG1 y A66-IgG1) o hMab 80R-IgG1 de control a 2 dosis de 10 mg/kg y 2.5 mg/kg⁵³ fueron administradas a los ratones intraperitonealmente (i.p.). 24 horas después de la administración de hMabs, todos los grupos de ratones fueron retados con A/Vietnam/1203/04(H5N1) o A/HK/483/97 (H5N1) intranasalmente (i.n.) en dosis de virus de 10 MLD₅₀ (el 50% de la dosis letal para ratón) bajo anestesia suave.

Estudio terapéutico en ratón

Los ratones primeros fueron infectados i.n. con 10 MLD₅₀ de A/Vietnam/1203/04(H5N1) o A/HK/483/97 (H5N1). Tres hMabs contra H5 o hMab de control a 10 mg/kg fueron entonces administrados i.p. a los ratones 24, 48 y 72 horas después del infección con A/Vietnam/1203/04(H5N1). Para ratones infectados con A/HK/483/97 (H5N1), hMabs fue inyectado solamente 24 horas después del reto viral.

Identificación de anticuerpos anti-H5 fago

Anticuerpos contra HA1

HA1 recombinante purificado fue utilizado para seleccionar anticuerpos de dos colecciones separadas de scFv humano no inmune. Después de dos rondas de selección en HA1, 58 de 96 clones detectados por ELISA fueron clones HA1 específicamente positivos. Tres anti-HA1 únicos scFvs fueron identificados (38B y 1C) por análisis de secuencia de los 58 clones HA1 positivos. Experimentos de selección y detección similares fueron repetidas; no se identificaron nuevos clones pero se obtuvieron los mismos tres scFvs descritos arriba. Secuencia de aminoácidos 2A se muestra en la tabla 1B.

10 Anticuerpos contra el ectodominio de H5 (HA0)

Trimerico HA0 recombinante purificado fue utilizado para seleccionar la misma colección de anticuerpos como se utilizó para HA1. Después de dos rondas de selección en HA0, un total de 392 clones fueron detectados para HA0 de enlace específico por ELISA. 97 clones reconocieron la proteína HA0 específicamente. Diez únicos anti-HA0 scFvs (7, 8, 10, 17, 40, 66, 80, 88, 90 y 98) fueron identificados por el análisis de secuencia. Seis genes VH diferentes y 10 genes VL diferentes fueron revelados (algunos scFvs compartían el mismo gen VH). Cinco de los seis VH diferentes pertenecían a una familia de gen, IGHV1-69. El gen VL fue mucho más diverso que los genes VH, tres de 10 VL son cadena Kappa. (Figura 4).

Establecimiento de un sistema fiable de reporte de virus en una sola ronda

Los reportes de virus HIV luciferase de una sola ronda de H5N1 o H1N1 pseudotipo por H5-SP33, H1-SC/1918 o H1-PR/34 fueron realizados por co-transfección de células 293T con 4 plásmidos que son pcDNA3.1-H5-SP33, HIV empaque de vector pCMVΔR 8.2 codificación HIV-1 Gag-Pol, Vector de transferencia pHIV-Luc codificando el reporte de gen de luciérnaga luciferase bajo

control del HIV-1 LTR, y expresando plásmido pcDNA3.1-N1. 36 horas post-trasfección, sobrenadantes virales fueron recogidos y almacenados a 4 °C. El titer de los virus HA0-pseudotipo fue medido infectando células 293T. Incluyendo el plásmido expresando N1 en la trasfección de realización de los virus pseudotipo
5 puede incrementar dramáticamente el titer de los virus H5-pseudotipo. El comportamiento debido de los virus H5-pseudotipo fue examinado utilizando suero inmune de hurón contra H5N1 (A/VietNam/2004). Estos virus puede ser neutralizados patentemente por anti-suero, mientras que no por el suero pre sangrado. Por lo tanto un sistema fiable de reporte de virus en una sola ronda
10 altamente eficiente fue establecido para la detección eficiente de anticuerpo neutralizante.

**Ejemplo 2: identificación de anticuerpos neutralizantes contra H5N1
utilizando los virus pseudotipo con H5-SP33 y ensayos de micro
15 neutralización.**

Resultados de ensayos de neutralización utilizando los virus pseudotipo.

scFvFc's bivalentes de anticuerpos anti-H5 fueron producidos y probados para actividades de neutralización contra los virus HA0-pseudotipo. Encontramos
20 que 2A es un anticuerpo moderadamente neutralizante, 38B y 1C son anticuerpos no neutralizantes (datos no mostrados). El anticuerpo 2A ha sido utilizado como un reagente anti-HA para otros ensayos (mapeo de epítipo) descrito abajo.) Utilizando el trímero HA0 como un objetivo, hemos identificado 10 nuevos anticuerpos únicos contra HA0. Estos Abs fueron detectados para actividades de
25 neutralización utilizando un método de detección novedoso de alta salida fago-scFv que ha sido recientemente instalado en nuestro laboratorio. En breve, los fago-scFvs de clones individuales fueron directamente utilizados en un ensayo de

neutralización inmediatamente después de ser detectados por ELISA para clones positivos en 96 platos de pozo. En este esquema, la actividad de neutralización será conocida en 48 horas. Haciendo esto, sobrepasamos los pasos de subclonar y expresar los Abs solubles que es una tarea que consume tiempo.

5 Como se muestra en la figura, los Abs neutralizantes que fueron indicados por fago-scFv resultaron ser potentes neutralizantes cuando se confirmó con scFvFc Abs solubles. Todos los días anticuerpos detectados por fago-scFvs son potentes Abs neutralizantes. También convertimos tres de los 10 anticuerpos (D8, F10 y A66) en IgG1 humano de longitud completa, la potente actividad
10 neutralizante fue nuevamente vista en los virus H5-SP33 pseudotipo. Los tres anticuerpos también realizaron neutralización cruzada de H1N1: cepa potencialmente neutralizada de H1-SC/1918 y cepa moderadamente neutralizada de H1-PR/34 (Ver figuras 4A-4C).

 Los resultados de ensayos de micro neutralización. Como se muestra en
15 las figuras 4A-4C y 9B, los 10 anticuerpos anti-H5 exhibieron diferentes niveles de neutralización. F10-Fc, A66-Fc, E88-Fc y E90-Fc parecen ser los inhibidores más potentes, los cuales neutralizaron más de 95% de 10,000pfu virus a 10ug/ml y más de 50% a 1ug/ml. También hemos visto reducción de placa completa cuando
 100pfu fue utilizado para estos cuatro anticuerpos a 10ug/ml o 1ug/ml (datos no
20 mostrados).

 Se encontró que los 10 anticuerpos (scFv-Fcs) neutralizaron los pseudo-virus H5 (partículas parecidas a virus con sólo núcleos HIV-1 que demostraban H5 en su superficie), en este caso desde el virus clade 1, A/Thailand/2-SP-33/2004 (H5N1) ("H5-TH04"). Todos los 10 anticuerpos también exhibieron niveles altos
25 pero distintos de neutralización contra los virus H5-VN04 (Clade 1) y A/Indonesia/5/2005 ("H5-IN05", Clade 2.1) en un ensayo de reducción de placa astringente, sugiriendo que el (los) epítipo (s) neutralizantes se conservan a

través de diferentes clades H5. Sin embargo, ninguno de los Abs neutralizó un virus Grupo 2, cepa HPAI H7N7, A/Netherlands/219/03 (H7N7) (H7-NL03) (Figura 4A).

Todos los 10 nAbs enlazados a trimérico H5 y de competencia cruzada en
5 contra de cada uno (Figura 9), indicando que ellos reconocen un epítipo superimpuesto. Basado en este hallazgo así como la diversidad de secuencia de VH y potencia de neutralización, tres nAbs (D8, F10 y A66) fueron seleccionados y convertidos en IgG1 humano de longitud completa. Todos los tres nAb IgG1s enlazados a H5 recombinante (H5-VN04) *in vitro* con alta afinidad ($K_d \sim 100\text{-}200$
10 pM) y proporciones de disociación muy lentas ($k_d \sim 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) (Figura 10).

Ejemplo 3: Caracterización cinética del enlace de HA0 (el ectodominio de HA de A/Vietnam1203/04) a D8-IgG1, F10-IgG1 y A66-IgG1 utilizando Biacore T-100

15 Mabs fueron capturados en un chip CM4 via IgG1 anti humano, y trimérico HA0 a varias concentraciones (20, 10, 5, 2.5, 2.5, 1.25, 0.625 nM) fue inyectado sobre la superficie del chip. La cinética de enlaces fue evaluada utilizando un modelo de enlace Langmuir 1:1. Las curvas de enlace registradas (con la referencia en blanco sustraída) son mostradas en negro y las curvas calculadas en
20 rojo. Todas las k_a , k_d , K_D representan los promedios y errores estándar de tres experimentos. Utilizando Biacore T100 y software de evaluación Biacore T100, determinamos las proporciones simétricas y constantes de afinidad para los tres anti-HA Mabs ajustando un modelo Langmuir 1:1. Como se muestra en la figura abajo, k_a , k_d y K_D similares de D8 y F10 fueron observados, y A66 tuvo un doble
25 1.8 de K_D menor que 8 y 10 debido a la proporción de disociación relativamente más rápida que los otros dos anticuerpos. Los complejos entre Mabs y HA0 fueron estables como se ilustra por una proporción de disociación muy baja ($8.8 \pm 1.1 \times 10^{-5}$

$s^{-1} \sim 1.8 \pm 0.3 \times 10^{-4} s^{-1}$) y enlace de alta afinidad con el trímero H5 a nivel pM. (Figuras 10A y 10B).

Ejemplo cuatro: efectos profiláctico y terapéutico de anticuerpos anti-H5

5 La eficacia de protección de nAbs humano contra la infección de los virus H5N1 y H1N1 fue evaluada en un modelo BALB/c de ratón. Los ratones fueron tratados con diferentes dosis de nAb ya sea después o antes del reto viral letal.

Eficacia profiláctica

10 (Figura 7 a, b, g y h). Los ratones fueron tratados con anti-H5 nAbs o control mAb 24 horas antes del reto letal intranasalmente (i.n.) con 10 dosis letales medias (MLD₅₀) de los H5N1 o H1N1s. Inyección intra-peritoneal (i.p.) de 10 mg/kg de cualquiera de los tres nAbs proveen completa protección a los ratones retados con H5-VN04 (A/Vietnam/1203/04 (H5N1), Clade 1). Una dosis más baja de
15 anticuerpo (2.5 mg/kg) fue también altamente protectora. (Figura 7a) protección profiláctica contra virus H5-HK97 (A/HongKong/483/97 (H5N1), Clade O) fue observada en 80-100% de los ratones tratados con 10 mg/kg de cualquiera de los tres nAbs. (Figura 7b) cualquiera de los tres nAbs (a 10 mg/kg de una inyección) proveyeron protección completa de los ratones retados con los virus H1-WSN33
20 (AWSN/1933(H1N1)). (Figura 7g) D8 y F10 protegieron completamente a los ratones retados con H1-PR34 (A/PuertoRico/8/34 (H1N1)) cuando se les dio 10 mg/kg de una inyección. A66 proveyó completa protección a ratones cuando 25 mg/kg de anticuerpo les fue suministrado en una sola inyección. (Figura 7h)

Eficacia terapéutica

(Figura 7c-f). Los ratones fueron inoculados con H5-VN04 e inyectados con nAbs a las 24, 48, 72 hpi (Figura 7 c, e y f) o con H5-HK92 a 24 hpi (Figura 7 d).

Tratamiento i.p. con 15 mg/kg (una dosis terapéuticamente alcanzable en humanos) de cualquiera de los 3 nAbs a 24h post-inoculación (hpi) protegieron 80-100% de los ratones retados con 10 veces el MLD₅₀ de los virus H5-VN04 o H5-HK97 (Figura 7c-d). Lo ratones tratados con la misma dosis de nAbs a 48 o 72 hpi con H5-VN04 mostraron niveles de protección similar o más altos (Figura 7 2e-f). Lo ratones sobrevivientes en todos los grupos de tratamiento anti-H5 nAb sé mantenernos saludables y mostraron mínima pérdida de peso corporal durante el período de observación de dos semanas (datos no mostrados).

Ejemplo 5: Supresión de titer Vidal en tejidos por anticuerpos anti-H5 en un estudio terapéutico animal

El efecto antiviral de los nAbs utilizados terapéuticamente fue aún más investigado midiendo el titer de virus 4 días después del reto ya fuera en los pulmones, como un indicador de inhibición de replicación local, o en el vaso y cerebro, indicativo del esparcimiento sistémico que es característico de la infección de H5N1. Los nAbs mediaron una supresión significativa de réplica viral en pulmones de lo ratones tratados con H5 nAb comparado con el control cuando se suministró dentro de las 48 horas del reto (Figura 12). Notablemente, dos de los nAbs, D8 y F10, también mostraron efecto antiviral cuando se suministraron 72 hpi. El esparcimiento sistémico de los virus al cerebro fue bajo en animales de control, obscureciendo cualquier efecto del tratamiento nAb. Sin embargo, el impacto de la terapia nAb en esparcimiento sistémico fue dramáticamente demostrado por supresión de esparcimiento de virus ≥ 1000 veces al vaso a un cuando los tres nAbs fueron aplicados dentro de las 72 hpi.

Ejemplo 6: Mapeo de Epítipo inicial de anticuerpo D8, F10 y A66.

Varias plásmidas expresando HA y mutaciones de HA de tipo salvaje y longitud completa para H5-SP33 fueron transfectadas transientemente en células 293T. 48 horas después de la transfección, anticuerpos anti-H5 (10ug/ml) fueron incubados con células 293T transfectadas a 4 °C por 1 hora. Las células fueron entonces lavadas tres veces con PBS conteniendo 0.5% BSA y 0.1% NaN₃. Para la detección de anticuerpos anti-H5 enlazados a células HA transfectadas, IgG de cabra anti humano con etiqueta FITC (Pierce) fue utilizado como un segundo anticuerpo e incubado con células a 4 °C por 30 min. El anticuerpo 2A fue utilizado como anticuerpo control para indicar la expresión de cada mutación. Como podemos ver de la tabla de abajo, los epítomos para Mab D8, 1F0 y A66 son similares y son ubicados en posiciones de 307 en HA1 y 52, 59, 65, 93 en HA2. La posición de estos aminoácidos fue resaltada en la estructura de cristal de H5 (A/Vietnam/1203/04(H5N1))

Ejemplo 7: enlace y neutralización de los virus Cluster H1

La neutralización de clade cruzada de los virus de los virus H5N1 (Figura 4) promovieron las pruebas para neutralización de otros subtipos HA dentro del Grupo 1 cluster H1 (Figura 11). Todos los tres nAbs enlazados a células expresando longitud total de H1 ((A/South Carolina/1/1918 (H1N1) ("H1-SC1918") y A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) ("H1-PR34")), H2 (A/Japan/305/57(H2N2)) ("H2-JP57"), H6 (A/chicken/New York/14677-13/1998(H6N2)) (H6-NY98), pero no un Grupo 2 subtipo, H7 ((A/FPV/Rostock/34 (H7N1) ("H7-FP34")) (Figura 4). Ellos también neutralizaron la infección de los virus H1-SC1918- y H1-PR34-pseudotipo (Figura 4); y en adición, F10 neutralizó PR34 (H1N1), A/Ohio/83 (H1N1) ("H1-OH83") y la infección A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) (Fig. 4). Estos resultados sugieren que estos nAbs reconocen un epítomo en HA esto no solamente es altamente conservado entre clades H5, pero también presente en subtipos H1, H2 y H6, y

potenciales subtipos dentro de los otros clusters. Por lo tanto decidimos investigar el mecanismo de neutralización de virus en detalle.

Ejemplo 8: nAbs inhibe la fusión de células pero no el enlace de virus.

5 Dos formas en las cuales anti-HA Abs pueden mediar neutralización son enlaces de bloqueo HA a su receptor celular, e inhibición de fusión de membrana de virus huésped interfiriendo con cambios de conformación de pH bajo inducido de HA. Encontramos que los tres nAbs no afectaron el enlace del virus a las células ni inhibieron hemaglutinación (el enlace y unión cruzada de células rojas

10 de la sangre), mientras que anti-H5 nAb de ratón, 17A2.1.2, y suero anti-H5N1 de hurón, ambos de los cuales inhibieron hemaglutinación, enlace reducido a niveles de fondo.

Después probamos la habilidad de los nAbs para inhibir la fusión de membrana celular huésped utilizando un sistema de modelo en el cual células

15 293T a alta densidad fueron co-transfectadas con plásmidas expresando H5- y N1- desde H5-TH04. Proteínas virales expresadas en superficie causaron que las células se fusionaran y formaran sincitia, lo cual ocurre espontáneamente entre las 36-48 horas post-trasfección bajo condiciones de cultivo normal. Cuando los nAbs fueron añadidos 6 horas post-trasfección y observadas 36 horas después, una

20 completa inhibición de formación de sincitia fue observado en todos los 3 casos. En la ausencia de nAbs, las células expuestas brevemente (3-4 minutos) a un medio ácido (pH 5) 30 horas post-trasfección formaron extensiva sincitia. Los nAbs (5 µg/ml) también bloquearon completamente la formación de sincitia bajo estas condiciones (datos no mostrados). Juntos, estos resultados indican que los tres

25 nAbs inhibieron la fusión de membrana sin interferir con el enlace receptor.

Ejemplo 9: caracterización estructural del epítipo nAb

Paso siguiente de terminamos el epítipo y el modo de enlace de uno de los nAbs, F10, resolviendo la estructura de cristal de su fragmento scFv en complejo con HA (H5.VN04) a 3.2 Å de resolución, y por mutagénesis. (Figura 6 y Tabla 4)

5 en el complejo, cada trímero H5 enlazó tres moléculas de F10, en lugares de simetría relacionada, enterrando $\sim 1500 \text{ Å}^2$ de superficie de proteína por anticuerpo; la estructura del H5 en sí misma no se alteró significativamente por el enlace del F10. HA es sintetizado como una cadena sencilla, HA0, esto es activado por división proteolítica en dos subunidades, HA1 y HA2. La división
10 conlleva al enterrado del "péptido de fusión" (compuesto de los primeros ~ 21 residuos de HA2) en el tallo de la membrana próxima. El enlace de F10 ocurre exclusivamente en esta región (Figura 6), realizando contactos íntimos con el péptido de fusión, elementos de HA1 y HA2 (ambos de los cuales son integrales a la estructura de esta región) que aseguran el péptido en su lugar en la
15 conformación de pH neutral, así como el largo gancho helicoidal de HA2 que sobrelleva cambio de conformación masivo en pH ácido en busca de propulsar el péptido de fusión de su bolsillo viral de membrana próxima a la superficie distal del virus, donde éste puede disparar la fusión con la membrana endosomal.

La cadena pesada de F10 juega el rol mayor en el enlace H5, utilizando la
20 punta de sus tres regiones complementariamente determinantes (CDRs). Cada molécula F10 hace contacto con ambos subunidades HA1 y HA2 dentro de un mismo monómero del trímero HA (Figura 6). La región de contacto se compone de un bolsillo formado por parte del péptido de fusión HA2, con elementos de HA1 en un lado y una cara expuesta de la hélice αA de HA2 en la otra (Figura 6). Una
25 tríada de residuos de anticuerpo – F55 y M54 de CDR H2, y Y102 de CDR H3 – forman puntos de contacto mayores. El anillo phenyl de F55 se encuentra a través de una superficie plana formada por una curva prominente de la curva de péptido

de fusión (residuos de HA2 DGW 19₂-21₂ (esquema de numeración H3; subíndices 1 y 2 se refiere a cadenas de HA1 y HA2)) y las cadenas de lado aromático de dos histidinas de costado (residuos 18₁ y 38₁) y un tryptophan, W21₂, que forma la parte trasera del bolsillo. La cadena lateral de M54 también contacta
5 los anillos aromáticos de W21₂ y, H38₁ así como la cadena lateral de I45₂ desde la hélice αA, mientras que la cadena principal de enlaces carbonil oxígeno e hidrógeno con la cadena lateral de H38₁. Y102 inserta su cadena lateral en la grieta hidrofóbica creada por cuatro cadenas laterales de la hélice αA, y también enlaces de hidrógeno a una columna de carbonil (D19₂) del péptido de fusión. La
10 curva CDR H1 a. C. múltiples contactos con la punta de terminal C de la hélice αA y una curva de HA1 en la base de la región de cabeza (Figura 6).

En paralelo, experimentos de mutagénesis fueron llevados a cabo en la hélice αA para ayudar a definir el epítipo (Figura 6). Las mutaciones en 3 residuos que directamente contactaron el anticuerpo: V52A/E, N52A e I56A, no tuvieron
15 efecto. Como controles, mutaciones en una cara expuesta diferente de la hélice, la cual no contacta el anticuerpo, no tuvieron efecto de enlace con el anticuerpo. Por lo tanto, mutagénesis de la hélice αA es completamente consistente con el epítipo definido cristalográficamente para F10. Además, los otros dos nAbs, para los cuales no existen datos estructurales, mostraron perfiles de enlace de mutación-
20 nAb casi idénticos, indicativo de una superposición cercana del epítipo y consistente con enlaces competitivos (Figura 6, Figura 9). Si se toman juntos, concluimos que todos los tres nAbs neutralizan virus estabilizando la conformación de pH neutral de HA en una región que provee el desencadenante (muy probablemente la liberación de péptido de fusión desde su bolsillo) para cambios
25 de conformación que llevan al estado fusogénico.

Ejemplo 10: base estructural de neutralización de espectro amplio

La región de HA definida por el epítipo F10 es altamente conservada dentro de los 16 subtipos HA (Figura 6 y Tabla 5). El péptido de fusión debe adoptar una estructura bien definida, tanto en la conformación de pH neutral y durante el proceso de fusión de membrana, y estudios de mutagénesis han demostrado que pocos cambios de secuencias son tolerados. La cara expuesta helicoidal de HA2 α A es también casi sin variación a través de ambos grupos, presumiblemente porque debe reconocer el formar la superficie interna del largo resorte-enrollado trimerico en el estado fusogénico. Por lo tanto, el requerimiento de estos segmentos para adoptar dos muy diferentes estructuras en dos ambientes distintos presuntamente imparte constreñimientos fuertes de evolución en sus secuencias, proveyendo una clara racional para su conservación a través de los 16 subtipos de HA.

Estructuras de cristal han sido determinadas para los subtipos H1, H5, y H9 del Grupo 1 y H3 y H7 del Grupo2, y las estructuras entran en dos clases distintas, coincidentes con los dos grupos definidos por el análisis filo genético. Más comparaciones muestran que las dos clases también son fácilmente distinguibles en el detalle a nivel tridimensional dentro de la región definida por el epítipo F10. Diferentes secuencias en unos pocos aminoácidos clave enterrados en el núcleo que son característica de cada clase (p.e. a 17₁ y 111₂) llevan a diferencias consistentes en la orientación de varias cadenas laterales dentro del epítipo, así como la disposición del bolsillo con respecto a la hélice α A.

Dentro de cada grupo/clase, la región de epítipo es altamente conservada, con muy pocas diferencias en un cluster dado, y sólo unos pocos cambios, generalmente conservativos, entre clusters (p.e., en las posiciones 18₁ y 38₁, Figura 6D). Nuestra observación que los 3 nAbs pueden reconocer todos los 4 miembros del cluster H1 demuestra que las diferencias de aminoácidos en la

periferia del epítipo (así como en el residuo 40₁, que es K, Q o V en este cluster) puede no ser crítico para el enlace.

Los días anticuerpos que nosotros seleccionamos tienen sin con un en diferentes grupos de VH CDR1-3, que pueden variar sustancialmente en 5 secuencia y longitud. No obstante, los tres recibos claves en CDR2 (M54, F55) y CDR3 (Y102) que se insertan en el bolsillo son conservados. La conservación de residuos clave dentro de una variedad de contexto CDR puede expandir el rango del reconocimiento de subtipo/cluster HA por este grupo de nAbs más allá de lo probado aquí. Sin embargo, se debe anotar que 4 de 6 subtipos del Grupo 2 son 10 glycosylated en la posición 38₁, que se encuentra en el perímetro del epítipo F10. Estudios de modelado predicen conflictos estéricos (pero sólo con la curva del CDR H1), lo cual probablemente contribuye a la falta observada de enlace/neutralización de los virus H7.

15 **Ejemplo 11: Enlace de anti-H5 nAbs a un rango grande de subtipos HA del Grupo 1**

Los virus del Grupo 1 contienen 10 del total de 16 subtipos del virus de Influenza A, y es además clasificado dentro de tres “clusters”, H1a, H1b y H9. Nosotros probamos nuestros nAbs para capacidad de enlace a todos los siete 20 subtipos HA de Clusters H1a y H1b, que incluyen aviar H5 así como los subtipos de influenza humana más comunes, con excepción del subtipo del Grupo 2, H3. En adición a H5, encontramos que todos los tres nAb IgG1s enlazados a ser las expresando longitud completa H1 de 2 cepas diferentes de H1N1, incluyendo el 1918 “Spanish flu”; H2 de H2N2; y H6 de H6N2; así como el Cluster 1b subtipos: 25 H11 de H11N9; H13 de H13N6; y H16 de H16N3. Sin embargo, ninguno de ellos enlazado al subtipo del Grupo 2, H7 de H7N1 (Fig 13). Más detalles de la Fig. 13 son como sigue. Análisis FACS de anti-H5 nAbs enlazados a H1, H2, H5, H6

(cluster H1a) y H11, H13 y H16 (Cluster H1b). Células 293T fueron transientemente trasfectadas con diferentes plásmidos expresando-HA. Enlace de nAb a las células fue analizado por FACS. Anticuerpo H5-específico 2A y 80R son control negativo. La falta de enlace a un HA de Grupo 2, H7, también se muestra.

- 5 Detalles en las cepas virales son: H1-SC1918 ((A/South Carolina/1/1918 (H1N1)), H1-PR34 (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)), H2-JP57 (A/Japan/305/57(H2N2)), H5-TH04 (A/Thailand/2-SP-33/2004 (H5N1)), H6-NY98 (A/Chicken/New York/14677-13/1998 (H6N2)), H7-FP34 (A/FPV/Rostock/34 (H7N1)), H1-MP74 (A/Duck/memphis/546/74 (H11N9)), H13-MD77 (A/Gull/MD/704/77 (H13N6)) y
- 10 H16-DE06 (A/Shorebird/DE/172/06 (H16N3)).

REFERENCIAS

1. W.H.O. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/>. World Health Organization factsheet 211: influenza (2003).
2. Webster, R. G. 1918 Spanish influenza: the secrets remain elusive. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 1164-6 (1999).
3. de Wit, E. & Fouchier, R. A. Emerging influenza. J Clin Virol 41, 1-6 (2008).
4. Wright, P., Neumann, G. & Kawaoka, Y. in Fields Virology (eds. Knipe, D., Howley, P., Griffin, D., Lamb, R. & Martin, M.) 1692-1740 (Lippincott Williams & Wilkins 2006).
5. Fauci, A. S. Pandemic influenza threat and preparedness. Emerg Infect Dis 12, 73-7 (2006).
6. Fouchier, R. A. et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J Virol 79, 2814-22 (2005).
7. Ha, Y., Stevens, D. J., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes. Embo J 21, 865-75 (2002).
8. Russell, R. J. et al. H1 and H7 influenza haemagglutinin structures extend a structural classification of haemagglutinin subtypes. Virology 325, 287-96 (2004).
9. W.H.O. (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/summaryH5_20070403.pdf, 2007).
10. W.H.O. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. Emerg Infect Dis 11, 1515-21 (2005).

11. Subbarao, K. et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279, 393-6 (1998).
12. de Jong, J. C., Claas, E. C., Osterhaus, A. D., Webster, R. G. & Lim, W. L. A pandemic warning? *Nature* 389, 554 (1997).
13. W.H.O. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/. (2008).
14. Nicholson, K. G. et al. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. *Lancet* 357, 1937-43 (2001).
15. Stephenson, I. et al. Cross-reactivity to highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses after vaccination with nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a potential priming strategy. *J Infect Dis* 191, 1210-5 (2005).
16. Stephenson, I. et al. Boosting immunity to influenza H5N1 with MF59-adjuvanted H5N3 A/Duck/Singapore/97 vaccine in a primed human population. *Vaccine* 21, 1687-93 (2003).
17. Treanor, J. J., Campbell, J. D., Zangwill, K. M., Rowe, T. & Wolff, M. Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A (H5N1) vaccine. *N Engl J Med* 354, 1343-51 (2006).
18. Treanor, J. J. et al. Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans. *Vaccine* 19, 1732-7 (2001).
19. Bresson, J. L. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated split-virion influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine: phase I randomised trial. *Lancet* 367, 1657-64 (2006).

20. Lin, J. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1) vaccine: a phase I randomised controlled trial. *Lancet* 368,991-7 (2006).

21. W.H.O.

5 <http://www.who.int/csr/disease/influenza/influenzanetwork/en/index.html>
I. (2008).

22. Carrat, F. & Flahault, A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine* 25, 6852-62 (2007).

10 23. Cinatl, J., Jr., Michaelis, M. & Doerr, H. W. The threat of avian influenza A (H5N1). Part IV: Development of vaccines. *Med Microbiol Immunol* 196, 213-25 (2007).

24. Subbarao, K. & Luke, C. H5N1 viruses and vaccines. *PLoS Pathog* 3, e40 (2007).

15 25. Leroux-Roels, I. et al. Broad Clade 2 Cross-Reactive Immunity Induced by an Adjuvanted Clade 1 rH5N1 Pandemic Influenza Vaccine. *PLoS ONE* 3, e1665 (2008).

26. Baras, B. et al. Cross-Protection against Lethal H5N1 Challenge in Ferrets with an Adjuvanted Pandemic Influenza Vaccine. *PLoS ONE* 3, e1401 (2008).

20 27. Marasco, W. A. & Sui, J. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat Biotechnol* 25, 1421-34 (2007).

28. Stevens, J. et al. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312, 404-10 (2006).

25 29. Sui, J. et al. Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101,2536-41 (2004).

30. Huang, C. C. et al. Structural basis of tyrosine sulfation and VH-gene usage in antibodies that recognize the HIV type 1 coreceptor-binding site on gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101,2706-11 (2004).

31. Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69,531-69 (2000).

32. Kida, H., Yoden, S., Kuwabara, M. & Yanagawa, R. Interference with a conformational change in the haemagglutinin molecule of influenza virus by antibodies as a possible neutralization mechanism. *Vaccine* 3,219-22 (1985).

33. Vanlandschoot, P. et al. An antibody which binds to the membrane-proximal end of influenza virus haemagglutinin (H3 subtype) inhibits the 10w-pH-induced conformational change and cell-cell fusion but does not neutralize virus. *J Gen Virol* 79 (Pt 7), 1781-91 (1998).

34. Su, Y., Zhu, X., Wang, Y., Mu, M. & Tien, P. Evaluation of Glu11 and Gly8 of the H5N1 influenza hemagglutinin fusion peptide in membrane fusion using pseudotype virus and reverse genetics. *Acta Virol* 153, 247-257 (2008).

35. Yamada, S. et al. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 444,378-82 (2006).

36. Stevens, J. et al. Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science* 303, 1866-70 (2004).

37. Daniels, R. S. et al. Fusion mutants of the influenza virus hemagglutinin glycoprotein. *Cell* 40, 431-9 (1985).

38. Thoennes, S. et al. Analysis of residues near the fusion peptide in the influenza hemagglutinin structure for roles in triggering membrane fusion. *Virology* 370, 403-14 (2008).
39. Earp, L. J., Delos, S. E., Park, H. E. & White, J. M. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 285, 25-66 (2005).
40. Godley, L. et al. Introduction of intersubunit disulfide bonds in the membrane-distal region of the influenza hemagglutinin abolishes membrane fusion activity. *Cell* 68, 635-45 (1992).
41. Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 371, 37-43 (1994).
42. Ha, Y., Stevens, D. J., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11181-6 (2001).
43. Wilson, I. A., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 289, 366-73 (1981).
44. Kashyap, A. K. et al. Combinatorial antibody libraries from survivors of the Turkish H5N1 avian influenza outbreak reveal virus neutralization strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* Early edition (2008).
45. Huang, I. C. et al. Influenza A virus neuraminidase limits viral superinfection. *J Virol* (2008).
46. Glaser, L. et al. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity. *J Virol* 79, 11533-6 (2005).

47. Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D. & Verma, I. M. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11382-8 (1996).
- 5 48. Rowe, T. et al. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J Clin Microbiol* 37, 937-43 (1999).

Tabla 3. Residuos de contacto en la interfaz H5-F10

	FRH1	CDRH1					CDRH2			CDRH3			
10	S25	V27	T28	S30	S31	M54	F55	T57	P100	S101	Y102	I103	S105
A1	S291	S291 M292		Q40		H38	H18 H38						
A2		I56	V52 N53		I45 T49	W21 I45	V18 D19 Q20 W21	V18	Q42	Q42	D19 K38 T41 Q42 I45	D19 K38	K38

5 Residuos de contacto definidos por tener una distancia inter atómica de < 4.5 . El esquema de color indica contribuciones de residuos individuales a la energía de enlace libre: muy favorable (rojo (V27, T28, I45, D19, W21)), favorable (naranja (S25, S291, M292, I56, V52, N53, T49, H18, V18, G20, T57, T41)), insignificante (azul (S30, S31, Q40, H38)), no favorable (negro), muy no favorable (negro ennegrecido). Basado en cálculos de energía utilizando el servidor en

0 <http://structure.pitt.edu/servers/fastcontact1>.

Tabla 4. Recolección de datos y refinamiento de estadísticas

H5-F10.	
Recolección de Datos	
Parámetros de células	a=205.3, b=118.5, c=338.9 β =99.6°
Espacio de grupo	C2
Resolución (Å)*	3.2(3.28-3.20)
Reflecciones totales	509705
Reflecciones únicas	112570
Cantidad completada (%)*	85.0 (68.4)
Promedio I/ σ (I)*	9.5 (2.0)
RMEZCLA (%)*	12.8 (81.0)
Redundancia*	4.5 (4.5)
σ corte	-3
Refinamiento	
Resolución	50-3.2(3:28-3.20)
RTRABAJO*	0.23 (0.32)
R _{LIBRE} (5% datos)*	0.29 (0.38)
RMSD distancia de enlace (Å)	0.01
RMSD angulo de enlace (°)	1.31
Valor B promedio	75.7
Átomos solventes	0
σ corte	none
Gráfico de Ramachandran	
Residuos en regiones favorecidas (%)	90.0
Residuos en regiones permitidas (%)	9.5
Residuos en regiones outlier (%)	0.5

*Números en parentesis corresponden al shell de resolución mas alta.

Tabla 5*. Comparación de secuencias de epítomos F10 entre 16 subtipos HA.

Grupo	Clasificación	Subtipo	# de secuencias de longitud completa	# de secuencias de longitud parcial	H1A2															
					17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Grupo 1	H1a	H12	510	55	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H15	1020	1173	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H18	1211	201	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H16	276	230	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H14	16	15	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Grupo 2	H1b	H16	8	6	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H14	64	64	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H18	10	10	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H12	60	12	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H10	252	214	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Grupo 3	H1c	H14	105	90	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H14	2	2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H13	2802	1276	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H16	5	5	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H17	334	273	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Grupo 4	H1d	H10	31	28	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H10	31	28	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H10	31	28	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H10	31	28	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
		H10	31	28	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

Esta tabla representa las secuencias disponibles en la base de datos pública de secuencia de influenza (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>) a partir del 17 de Abril de 2008. Resaltado en azul claro: parte superior '()/' (variante(s) de aminoácidos/ aminoácido en consenso en la posición; parte inferior '()/' (número de variantes de aminoácidos/número de aminoácidos en consenso. Los aminoácidos no resaltados se conservan al 100% o se observan variantes ≤5 veces en aquellas posiciones para los subtipos H4, H6, H9, H10, H11. Las histidinas H17 (HA1) y H 111 (HA2) que cumplen una función importante en el desencadenamiento de pH se resaltan en verde. **La Tabla 5 describe "INGW como la SEQ ID NO: 105, "IDGW" como la SEQ ID NO: 106, y "VAGW como la SEQ ID NO: 107.**

OTRAS MATERIALIZACIONES

Aunque materializaciones particulares han sido reveladas aquí en detalle, esto ha sido hecho como ejemplo para propósitos de ilustración solamente, y no es el propósito de ser limitantes con respecto al alcance de las reivindicaciones adjuntas, que siguen. En particular, es contemplado por los inventores que varias sustituciones, alteraciones, y modificaciones pueden ser hechas a la invención sin separarse del espíritu y alcance de la invención como se define en las reivindicaciones. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones consideradas que estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Las reivindicaciones presentadas son representativas de las invenciones reveladas aquí. Otras invenciones no reivindicadas son también contempladas. Los aplicantes se reservan el derecho de perseguir tales invenciones en reivindicaciones posteriores.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado, en donde dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo completamente humano y en donde dicho anticuerpo monoclonal se enlaza a un epítipo en la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de influenza y neutraliza el virus de influenza A.

2. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1 en donde el epítipo comprende el amino ácido en la posición 18, 38, 40, y 291 del polipéptido HA1.

3. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1 o 2, en donde el epítipo comprende el amino ácido en la posición 18, 19, 20, 21, y 38 del polipéptido HA2.

4. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1, 2, o 3, en donde el epítipo además comprende el amino ácido en la posición 41, 42, 45, 49, 52, 53, y 56 del polipéptido HA2.

5. El anticuerpo monoclonal aislado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo es un fragmento scFv.

6. Un anticuerpo monoclonal aislado, o un fragmento scFv del mismo, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento scFv del mismo, se enlaza a un epítipo en la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de influenza, en donde el epítipo comprende el amino ácido en la posición 18, 38, 40, y 291 del polipéptido HA1.

7. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de la reivindicación 6, en donde el epítipo comprende el amino ácido en la posición 18, 19, 20, 21, y 38 del polipéptido HA2.

8. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de la reivindicación 6 o 7, en donde el epítipo además comprende el amino ácido en la posición 41, 42, 45, 49, 52, 53, y 56 del polipéptido HA2.

9. Un anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento scFv del mismo, se enlaza a la proteína HA de un virus de influenza y comprende un dominio variable de cadena pesada en donde el dominio variable de cadena pesada comprende un CDR H1, CDR H2, y CDR H3, en donde:

(a) CDR H1 comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NOs: 44, 45, 46, 47, 48, y 49;

(b) CDR H2 comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NOs: 52, 53, 54, 55, 56, y 57; y

(c) CDR H3 comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NOs: 60, 61, 62, 63, 64, y 65.

10. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de la reivindicación 9, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento scFv del mismo, además comprende un dominio variable de cadena liviana en donde el dominio variable de cadena liviana comprende un CDR L1, CDR L2, y CDR L3, en donde:

(a) CDR L1 comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NOs: 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, y 77;

(b) CDR L2 comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NOs: 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, y 89; y

(c) CDR L3 comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NOs: 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, y 101.

11. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo monoclonal, o fragmento scFv del mismo, comprende una secuencia de amino ácido de

dominio variable de cadena pesada seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NOs: 6, 12, 18, 24, 28, 32, y 36.

12. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo monoclonal, o fragmento scFv del mismo, comprende una secuencia de amino ácido de dominio variable de cadena liviana seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NOs: 8, 10, 14, 16, 20, 22, 26, 30, 34, y 38.

13. Un anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento scFv del mismo, se enlaza a la proteína HA de un virus de influenza y comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena liviana, en donde el dominio variable de cadena pesada comprende un CDR H1, CDR H2, y CDR H3 de cualquiera de los dominios variables de cadena pesada provistos en SEQ ID NOs: 6, 12, 18, 24, 28, 32, y 36 y donde el dominio variable de cadena liviana comprende un CDR L1, CDR L2, y CDR L3 de cualquiera de los dominios variables de cadena liviana provistos en SEQ ID NOs: 8, 10, 14, 16, 20, 22, 26, 30, 34, y 38.

14. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo monoclonal, o fragmento scFv del mismo, estabiliza la conformación de pH neutral de la proteína HA.

15. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho virus de influenza es un virus de influenza del Grupo I.

16. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de la reivindicación 15, en donde dicho virus de influenza es un virus de influenza del grupo H1.

17. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de la reivindicación 16, en donde dicho virus de influenza del grupo H1 es un virus de influenza del grupo H1a o un virus de influenza del grupo H1b.

18. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho epítipo es no-lineal.

19. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho epítipo comprende el polipéptido HA1 y el HA2.

20. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo monoclonal, o fragmento scFv del mismo, inhibe la fusión de membrana viral y celular.

21. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho virus de influenza es un subtipo H1, H2, H5, H6, o H11.

22. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo monoclonal, o fragmento scFv del mismo, compite con el enlace del antiviral D7, D8, F10, G17, H40, A66, D80, E88, E90, o H98 a la proteína HA.

23. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, se enlaza a HA con un valor Kd de 1pm-200mM.

24. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, se enlaza a HA con un valor Kd de no más de unos 100 nM.

25. El anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo monoclonal, o fragmento scFv del mismo, se enlaza a HA con un valor Kd de unos 100-200 pM.

26. Una molécula de ácido nucleico aislada codificando el anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

5 **27.** La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 26, en donde el anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, comprende una secuencia de ácido nucleico del dominio variable de cadena pesada seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NOs: 5, 7, 13, 15, 21, 23, 29, 33, 37, y 40.

10 **28.** La molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 26-27, en donde el anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento scFv del mismo, comprende una secuencia de ácido nucleico del dominio variable de cadena pesada seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NOs: 9, 11, 17,
15 19, 25, 27, 31, 35, 39, y 42.

29. Una composición que comprende el anticuerpo monoclonal, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1-25 y un portador.

20 **30.** La composición de la reivindicación 29, que además comprende una droga anti-viral, un inhibidor de entrada viral o un inhibidor de unión viral.

31. La composición de la reivindicación 30, en donde dicha droga anti-
25 viral es un inhibidor de neuraminidasa, un inhibidor HA, un inhibidor de ácido siálico, o un canal de ion M2.

32. La composición de la reivindicación 31, en donde dicho inhibidor de canal de ion M2 es amantadina o, rimantadina.

30 **33.** La composición de la reivindicación 31, en donde dicho inhibidor de neuraminidasa zanamivir o fosfato oseltamivir.

34. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 29-33, además
35 comprende uno o más anticuerpos específicos a un virus de influenza del Grupo I.

129

35. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 29-34, además comprende un anticuerpo específico a un virus de influenza del Grupo II.

36. Un método para detectar la presencia de un virus de influenza en una muestra, el método comprende:

a) contactar la muestra con el anticuerpo monoclonal, o fragmento scFv del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1-25; y

b) detectar la presencia o ausencia de un complejo anticuerpo-antígeno, por lo tanto detectando la presencia de un virus de influenza en una muestra.

37. El método de la reivindicación 36, en donde la muestra es obtenida de sangre, pelo, raspadura de mejilla, saliva, biopsia, o semen.

38. Un anticuerpo monoclonal aislado, en donde dicho anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de amino ácido VH por la línea de germen IGHV 1-69* del gen VH en donde el amino ácido en la posición: a) 27 es una valina; b) 28 es treonina; c) 30 es serina; d) 31 es serina; e) 54 es metionina; f) 55 es la fenilalanina; g) 58 es treonina; h) 100 es prolina; i) 101 es serina; j) 102 es la tirosina; k) 103 es isoleucina y 105 es serina, en donde dicho anticuerpo monoclonal se enlaza a un epítipo en la región del tallo de la proteína de hemaglutinina (HA) de un virus de influenza, y neutraliza los virus de influenza A.

25

30

RESUMEN

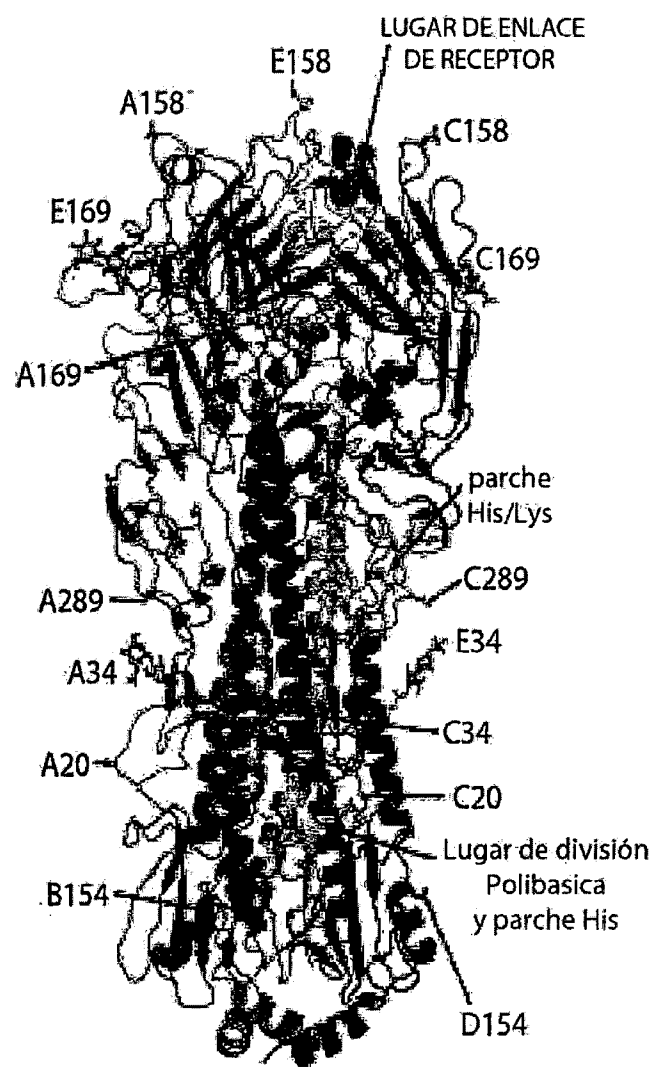
La invención proporciona anticuerpos humanos scFV y anticuerpos monoclonales que neutralizan el virus de influenza. También proporciona métodos de tratamiento y/o prevención de influenza relacionada con una enfermedad o trastorno de dicha influenza. La invención también provee el método de vacunación a un paciente contra la influenza. También proporciona métodos de diagnóstico de influenza – relacionados con enfermedades o trastornos y métodos de detección de la presencia de influenza en una muestra.

10

15

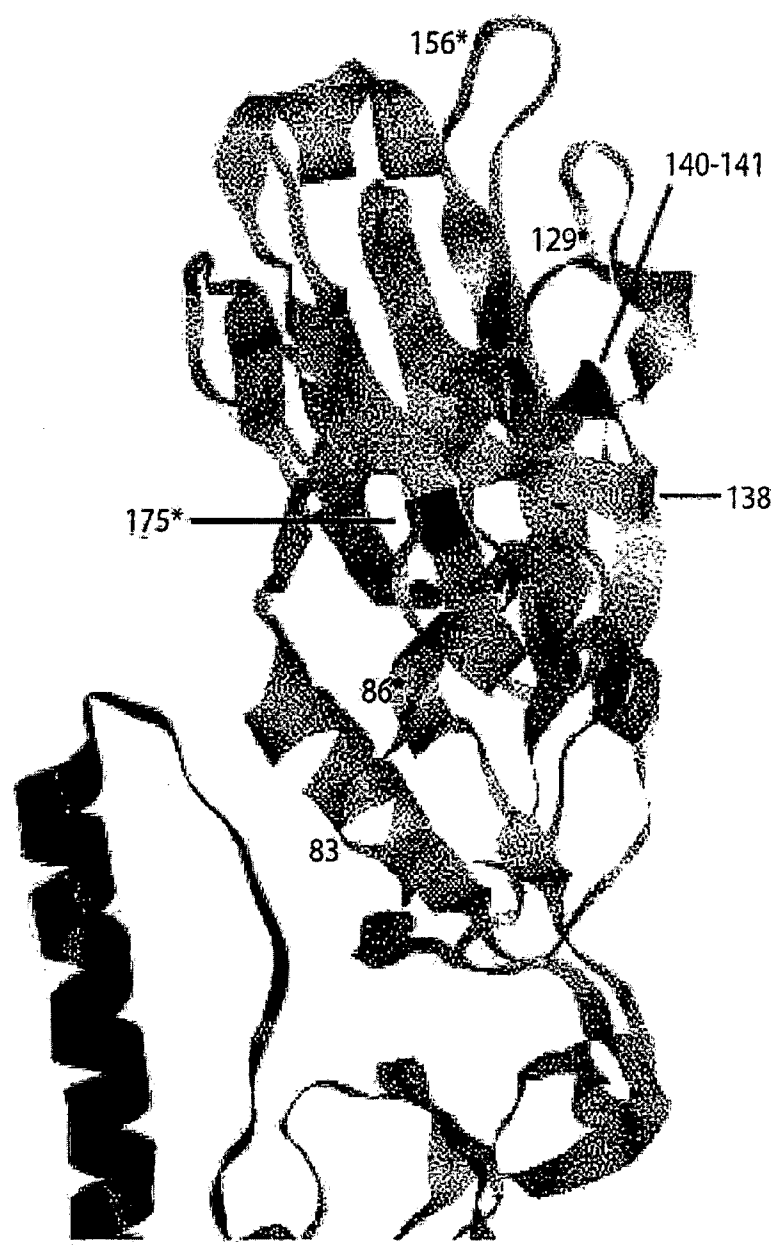
20

25



Vista general de la estructura del trómero A/Vietnam 1203/04, lugar de enlace de receptor y lugares de variación antigénica son resaltados en el monómero (citado de Stevens, 2006).

Fig. 1A



Ubicación de residuos de aminoácidos en la HA de los virus de influenza que estan bajo selección positiva (citado de Smith, 2006).

Fig. 1B

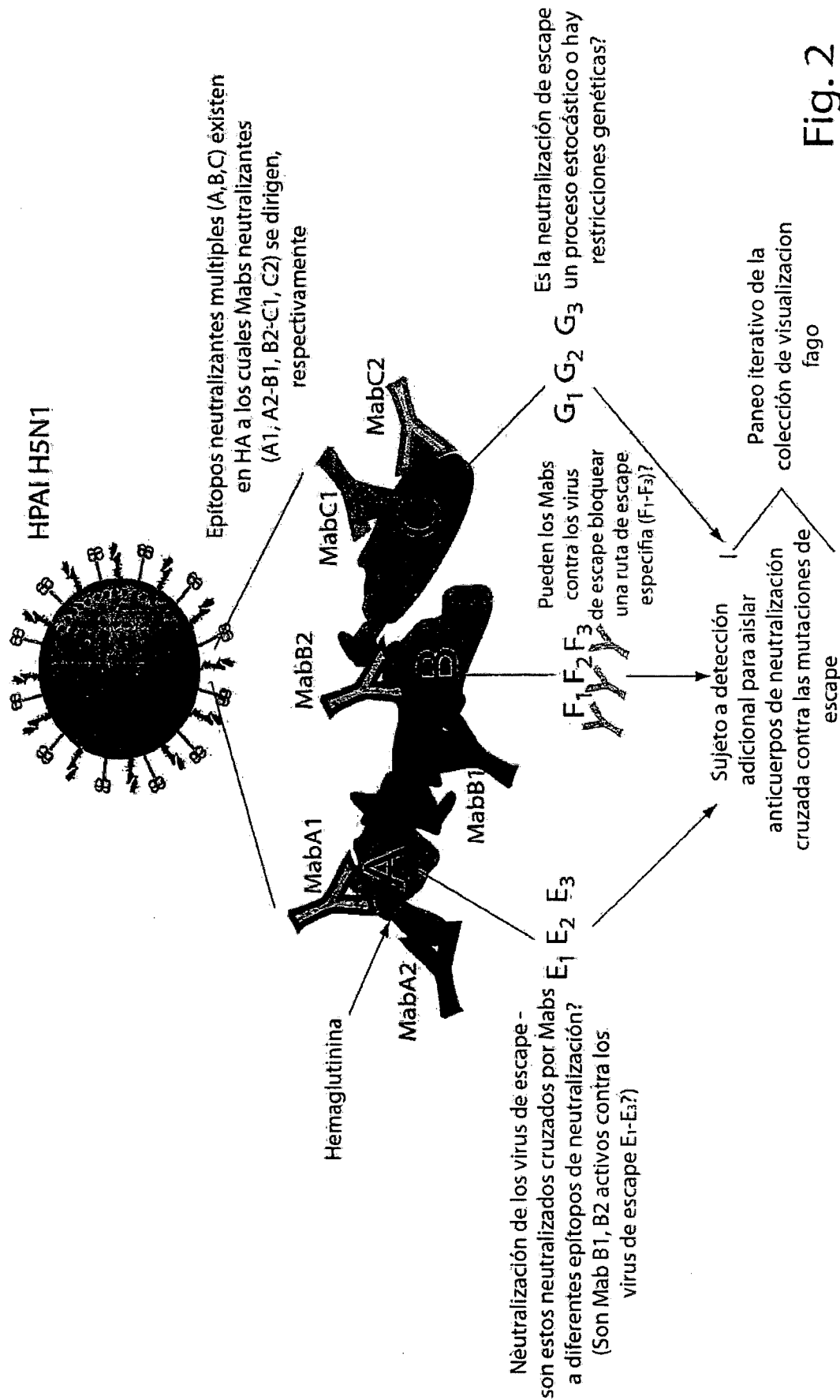


Fig. 2

Secuencias de Aminoácidos de regiones variables de mAbs anti-H5

VH	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	V GENE
Cons.	KKPGSSVKVCKAS	GGTSSYA	ISWVRQAPGQGLEWNGG	IPPEGSP	NYAOKFQGRVTITADESTAYMELSSLRSEPTAVYYC	AR		WGQGTL
IGHV		..GTS..		..GTS..				1-69
F10/E90	TSS	EVVTSF	L..	S..F..T	Q..R...D.R.	SPSVTCSSGTCVFDH		1-69
D8/D80		..GTS..		..GTS..	L..	GLYVTESS	FDY	1-69
A66/E88		..GTS..	FT..L..	..GTS..	N..N..T..K.	ETSSVAPAND-AFAI	M	1-69
G17	A.....	..GTS..		..GTS..	K..	EPGVVCKN-GFDV	M	1-69
D7/H98	P	..GTS..		..GTS..	N..	SSGVVFRSH	L...	1-69
H40	R...A.....	..GTS..		..GTS..	V..M..R..T..IN..	GASVLRVQDP-EALDI	L..T	1-2

VL	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	GENE
Cons.	QPVLTQPPS-ASGSPGQGRVTISCTGS		VAWVQQRPGQAPKLLIY		DRPSCGIPDRFSGSR--SGTASLTISGIQPEDEADYYC			FGCGTKLTVL
D7VA	NFM...H..-V.A...KT	SGNIAANY	Q...R..S..TTV..	EDD	R...V.....IDR.SNS	QTYDTNNHAV	H....	IV6-57
D8VA	S.....	SSDVGGYNS	S...H..K...M..	EVT	K...V...A.K...N...V...A...	CSYAGHSAYV	..T...V...	VL2-11
F10VA	..G.....-V.KGLR.TA.LT..N	SNVGNQG	A..L..HQ.HP...S.	RNN	SE..A...N...T.....	STWDSLSAVV		IV10-54
G17VA	SYE.....-V.KGLR.TA.LT..D	SNVGHOG	T..L..HQ.HP...S.	RNG	N.....SE..A...N...I.....	SVWDSLSAVV		IV10-54
H40VA	-V.VA...TAS.P.G.N	NIGGYS--	..H.....L.V..	DDK	E...AN...S..T...RVEAG..G....	QVWDSGNDRLI		VL3-21
A66VK	EI...S.ATL.L...E.A.L..RA.	QSVSSY--	L.....R....	DAS	N.AT...A...G...DFT...R.E...F.V.P.	QQYGSPPQ---	..Q..R.EIK	KV3-20
D80VK	EI...S.GTL.L...E.A.L..RA.	QSLSSKY-	L.....R....	GAS	S.AT.....G...DFT...R.E...F.V.S.	QQYDGVFRT--	..Q..TVVEIK	KV3-20
E88VA	L.....T.....I..S..	SSNIGSNT	N...L..T.....	SNN	Q...V.....S...A..I..R.....	QSYDRLSASL	..T..TV...	IV1-44
E90VK	DIQM..S..SL.A.V.D...T.RA.	QSISSY--	LN.....K.....	AAS	SLQR.V.S...G...DFT...S...P.V.Y.	QQYDSSPYT--	..Q...VEIK	KV1-39
H98VA	SYE.....KE.....S.G	TSNIGRNH	N...L..T.....	SNE	Q...V.....K...S...AV...S.....	ASWDDNLSGWV		IV1-44

Marco de trabajo de regiones 1-4 (FR1-4) y regiones complementariamente determinantes 1-3 (CDR1-3) para VH y VL son mostrados. FR, CDR y nombres de gen son definidos utilizando la base de datos IMGT. Para VH, los primeros 11 residuos de FR1 (QVQLVQSGAEV) y los últimos 5 residuos de FR4 (VTYSS) son invariantes y no son mostrados. Puntos denotan identidad con la secuencia de consenso, guiones denotan espacios en blanco. Seis genes diferentes VH y 10 genes diferentes VL fueron encontrados. 4 de 6 anticuerpos comparten el mismo gen VH. 5 de los 6 VH pertenecen a una familia de gen, IGHV1-69*01. Los genes VL son mucho mas diversos que los genes VH, consistente con la falta de contactos observados entre F10 y H5; tres de los 10 VL son cadena k. Las 3 cadenas VH utilizadas para generar IgG1s son coloreadas de rojo. Contactos de residuos H5 a F10 son resaltados, junto con residuos correspondientes en otros VHs, en cyan (residuos críticos como se define por calculos de energia de FastContact) y gris (otros contactos <4.5 Å).

Fig.3

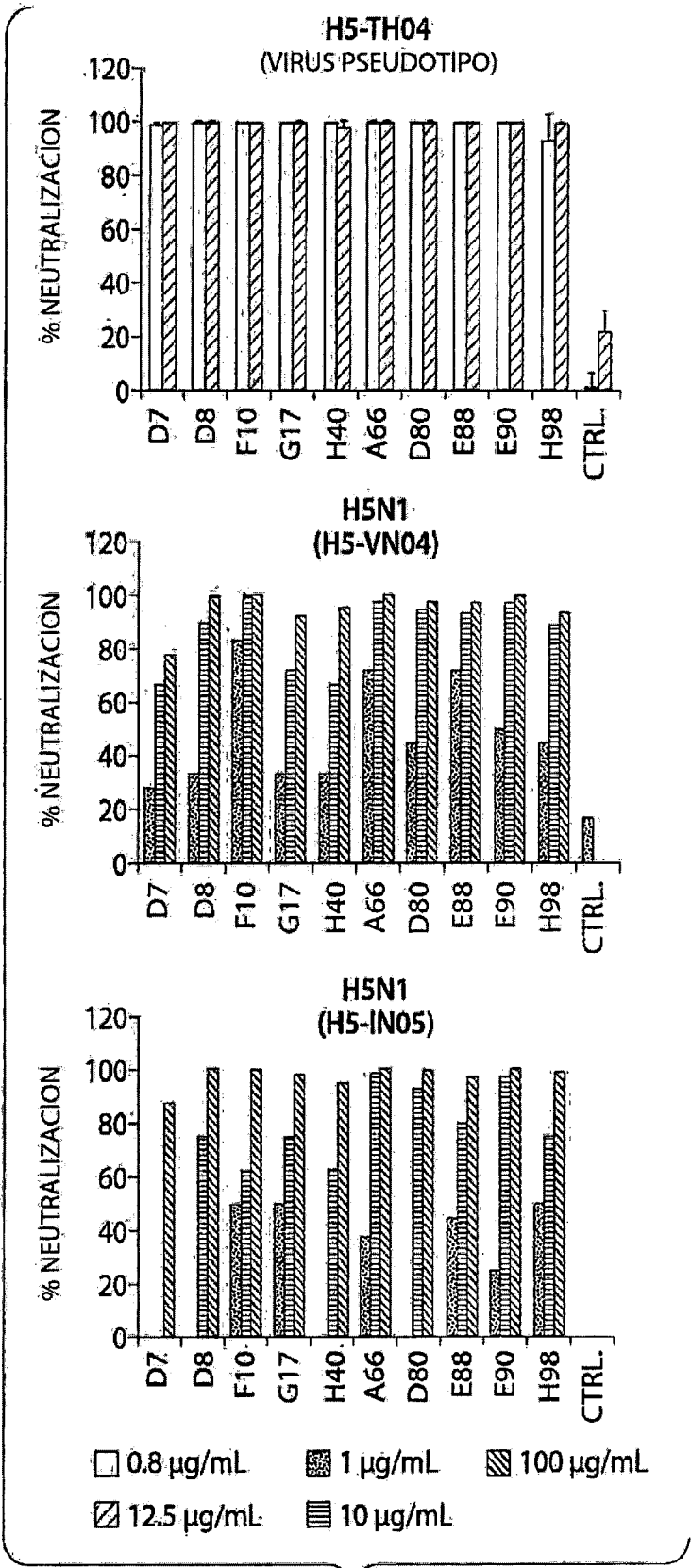


Fig. 4A

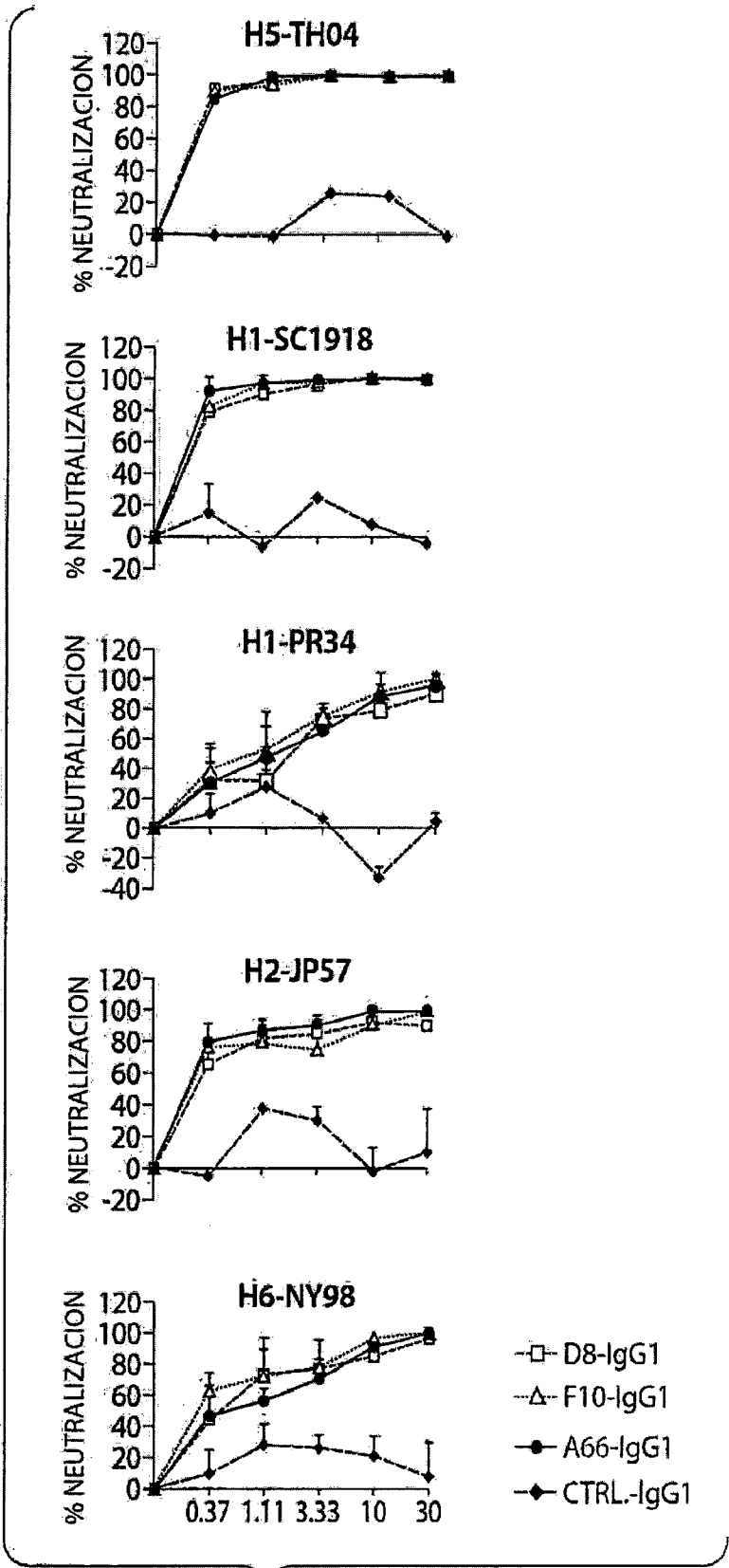


Fig. 4B

VIRUS	HUMANO mAb F10	MARINO mAb 21G8.6	CTRL. 80R
H5-TH04 (H5N1)	40	40	<
H5-HK97 (H5N1)	160	40	<
H1-OH83 (H1N1)	40	<	<
H1-PR34 (H1N1)	320	<	<
H2-AA60 (H2N2)	20	<	<

Fig. 4C

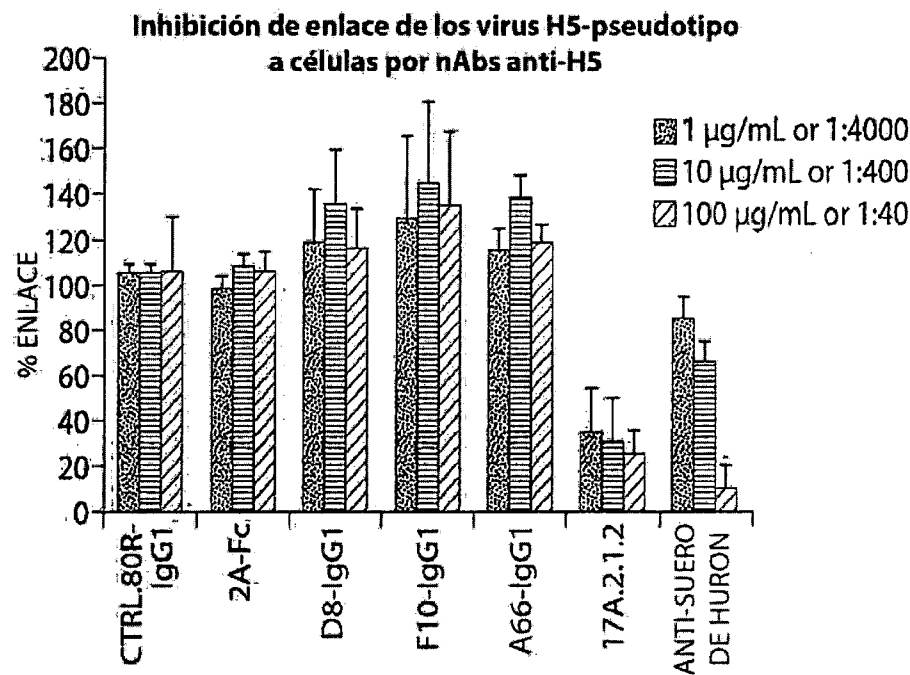


Fig. 5A

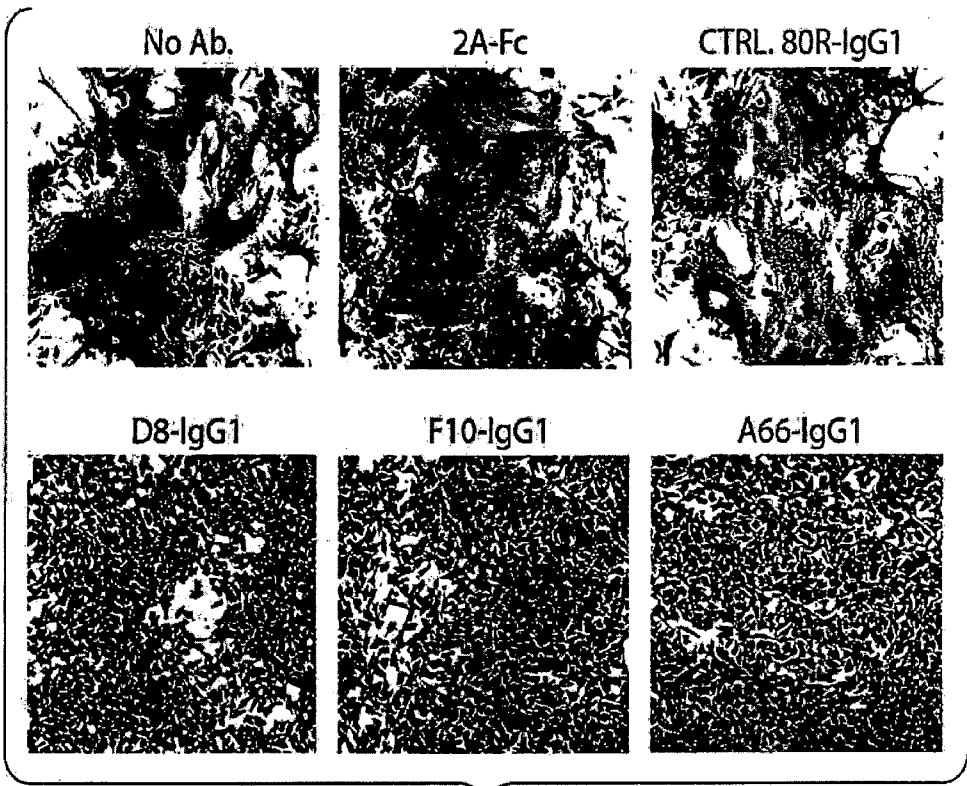


Fig. 5B

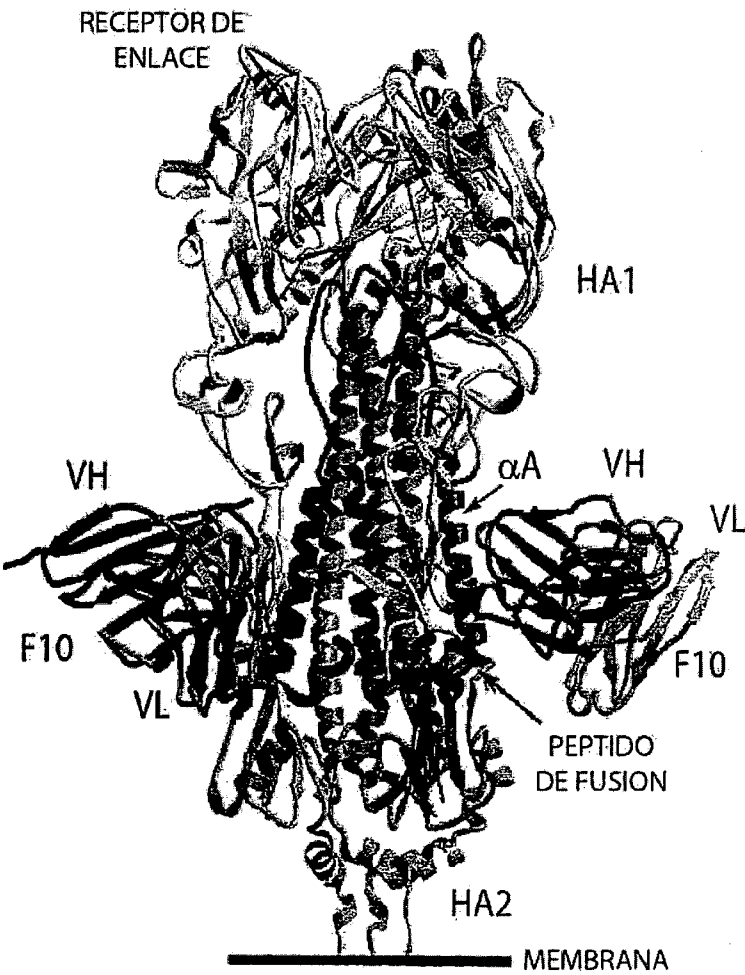


Fig. 6A

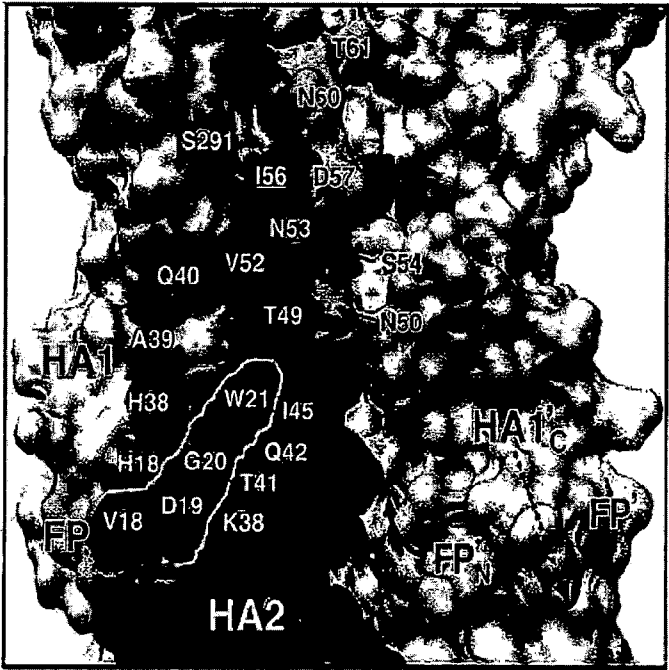


Fig. 6B

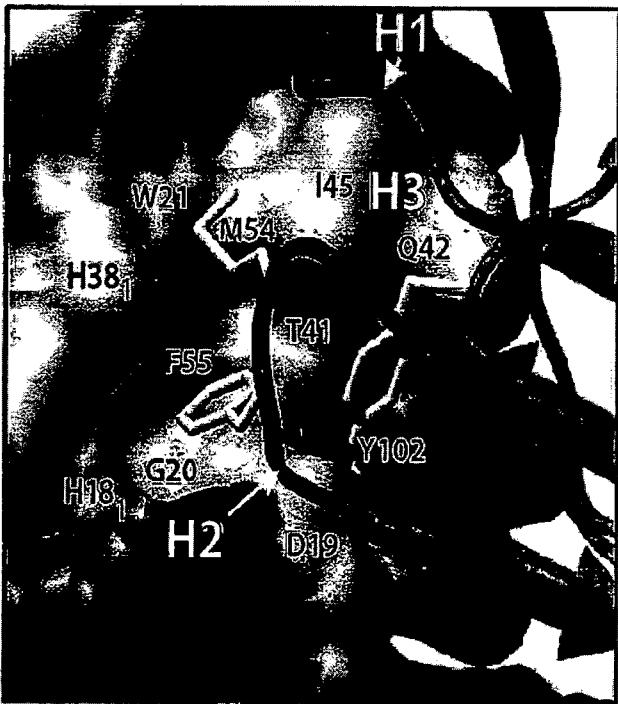


Fig. 6C

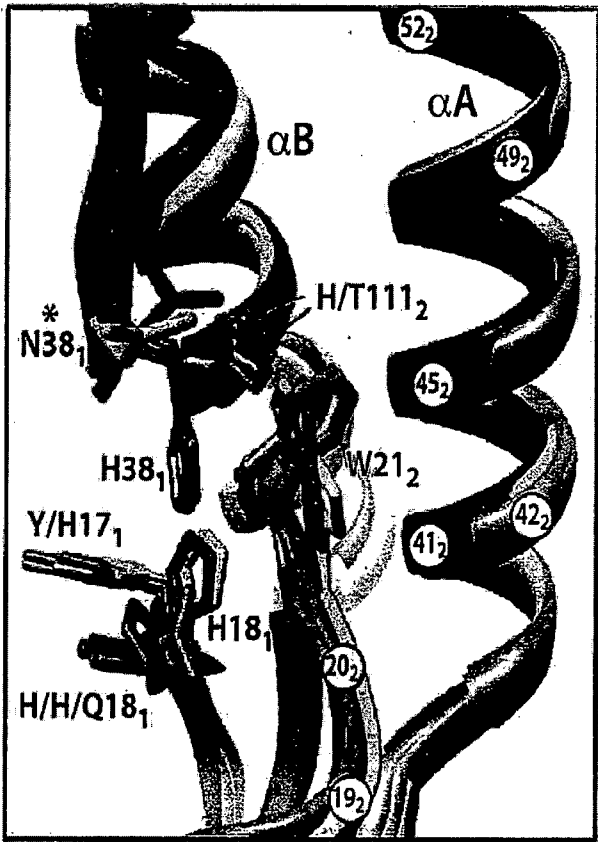


Fig. 6D

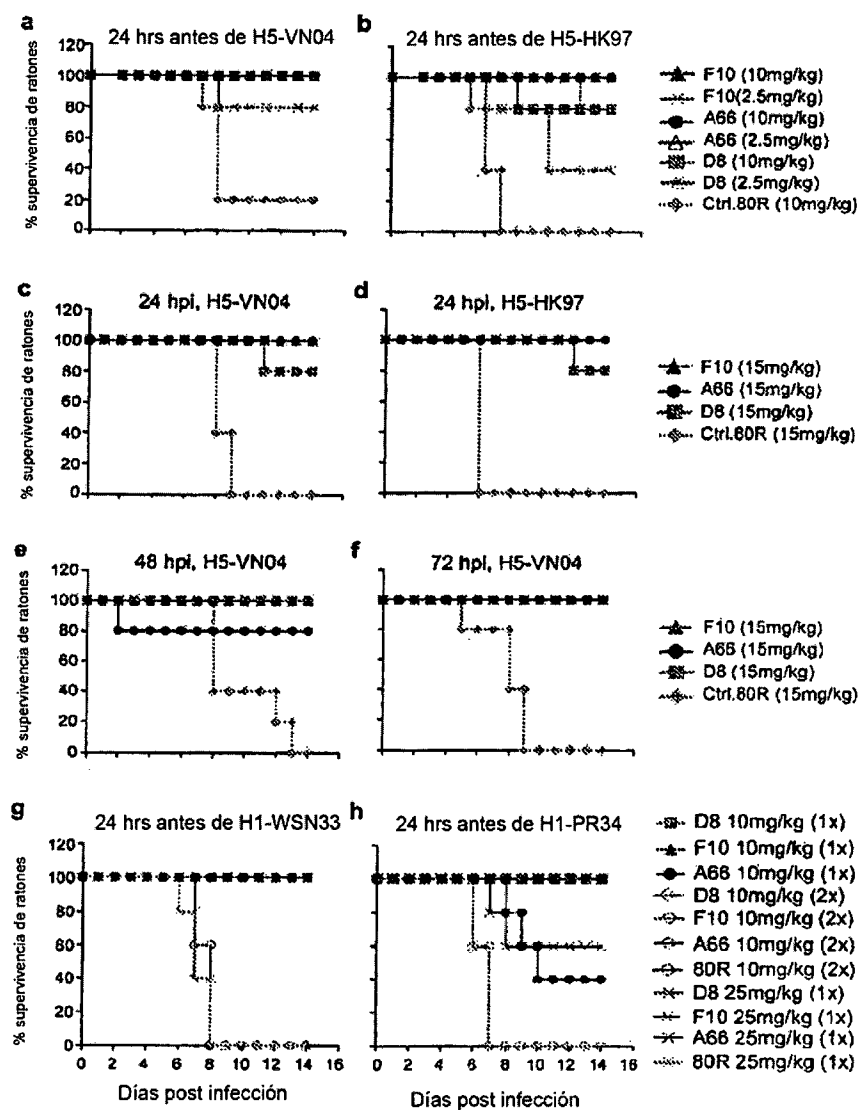


Figura 7

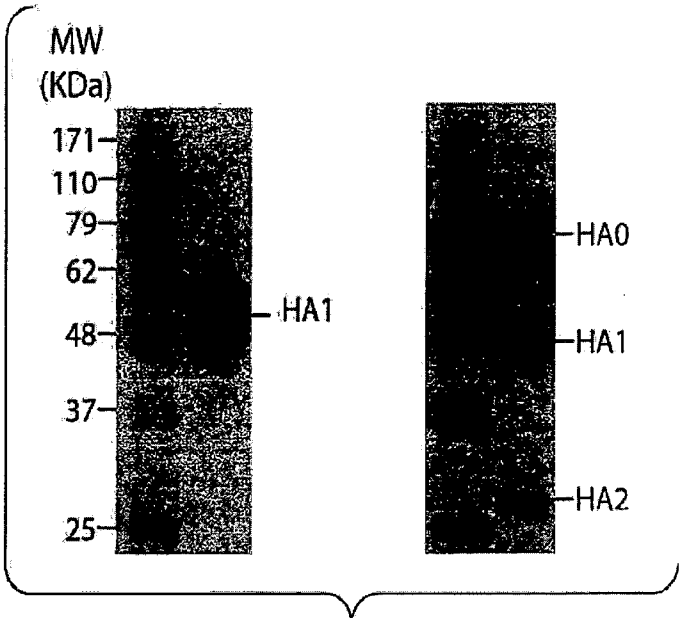


Fig. 8A

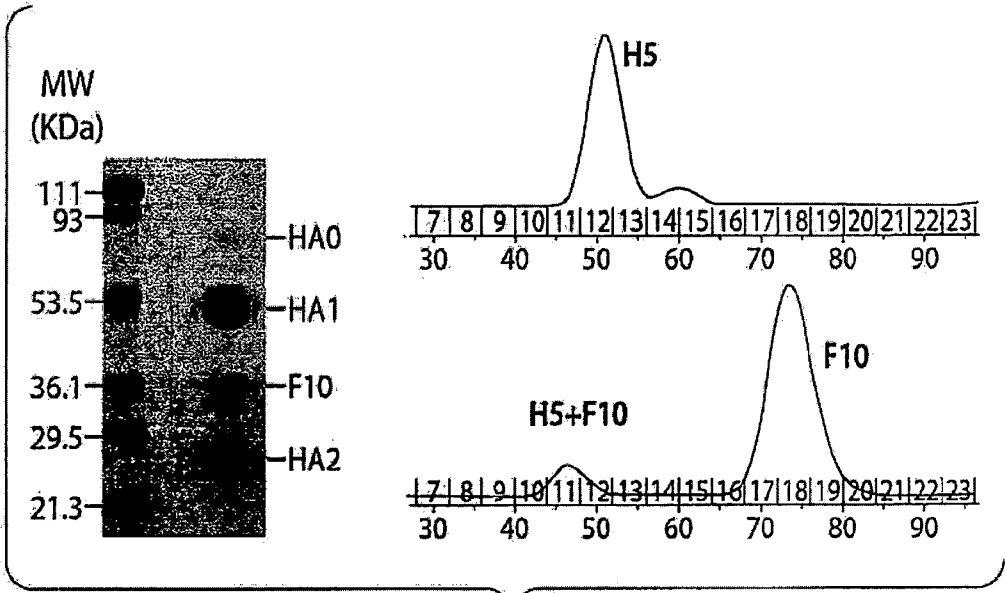


Fig. 8B

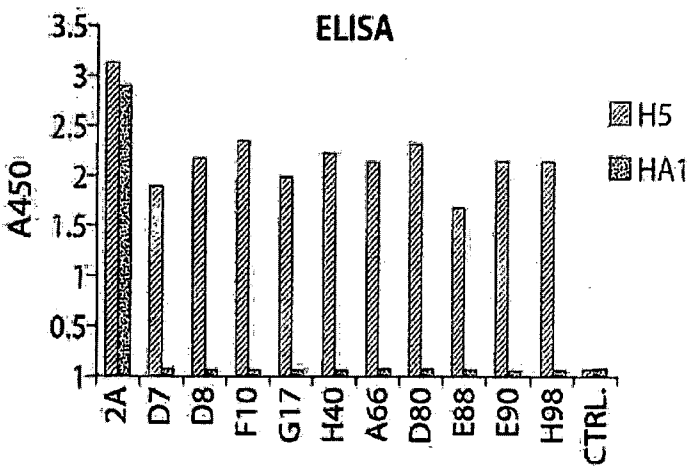


Fig. 9A

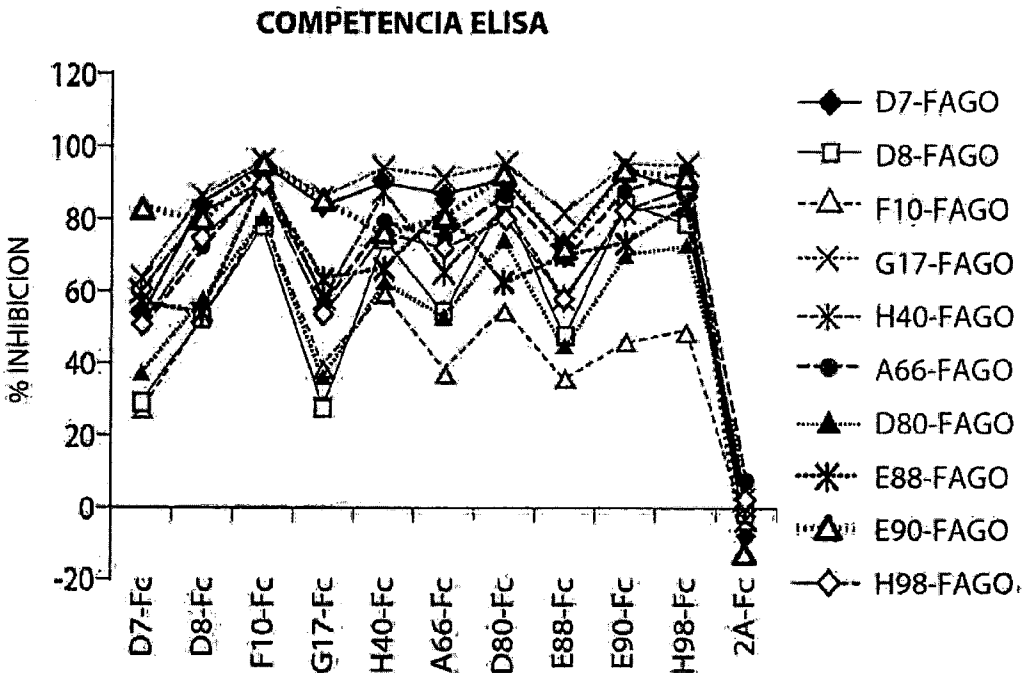


Fig. 9B

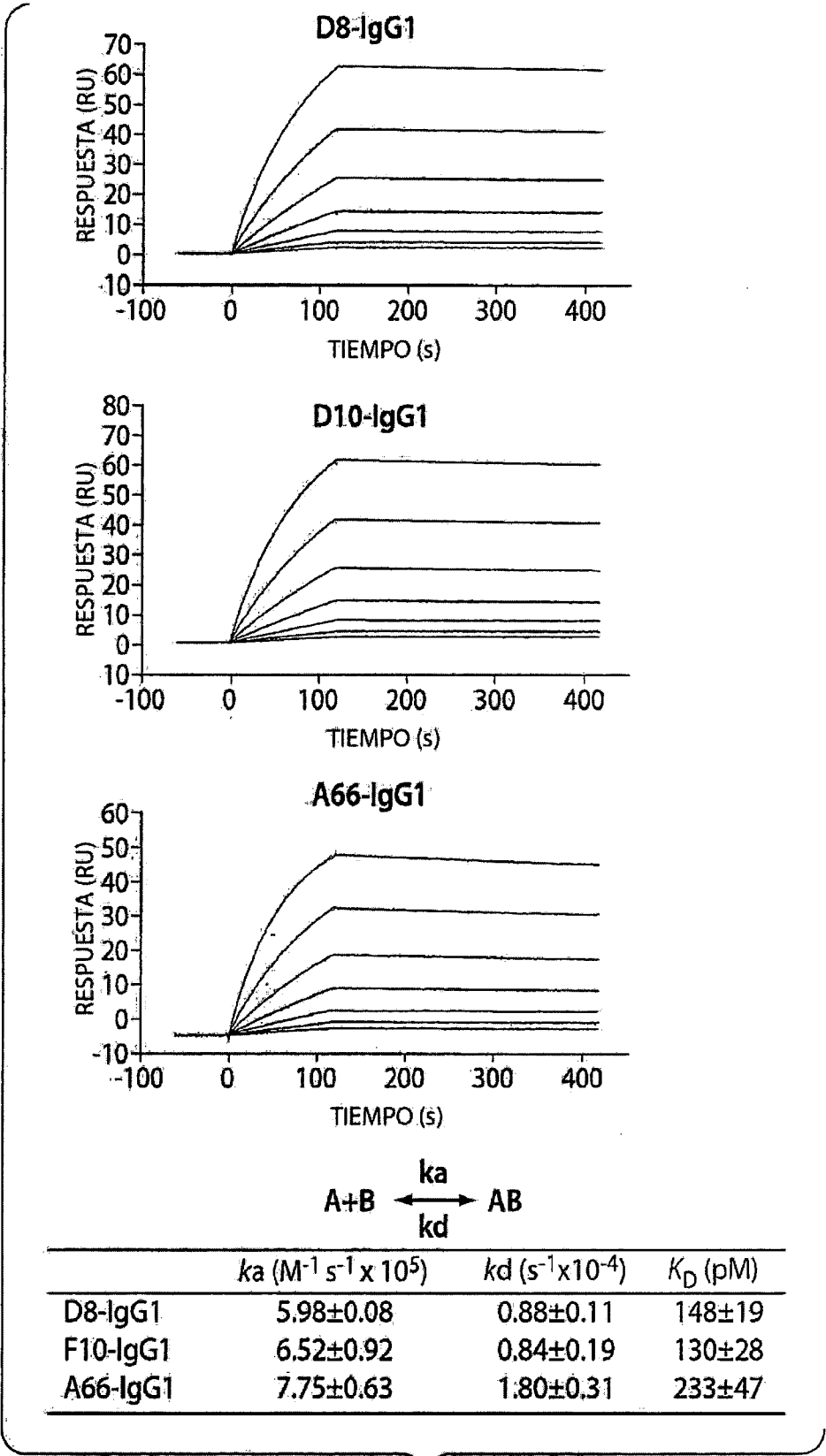


Fig. 10

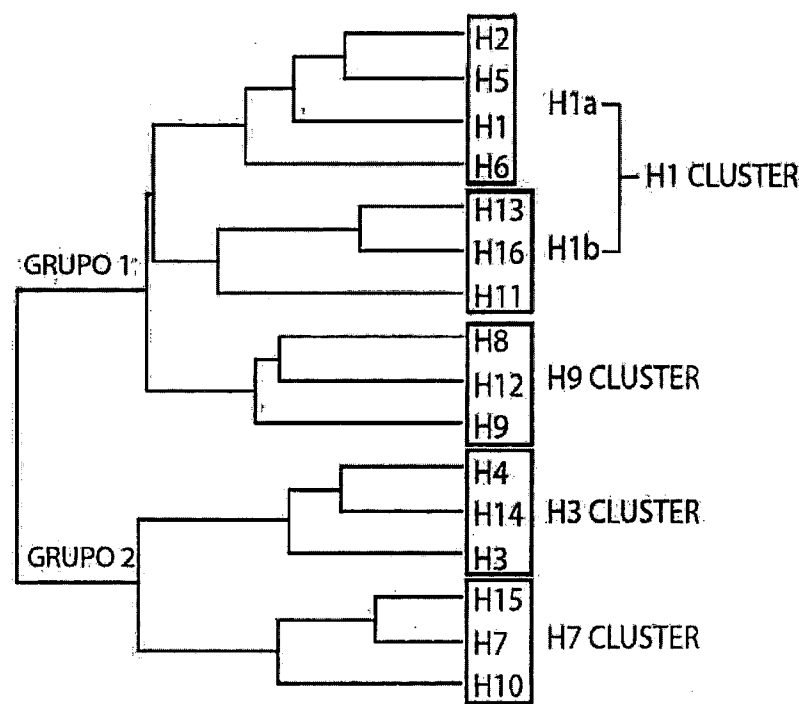
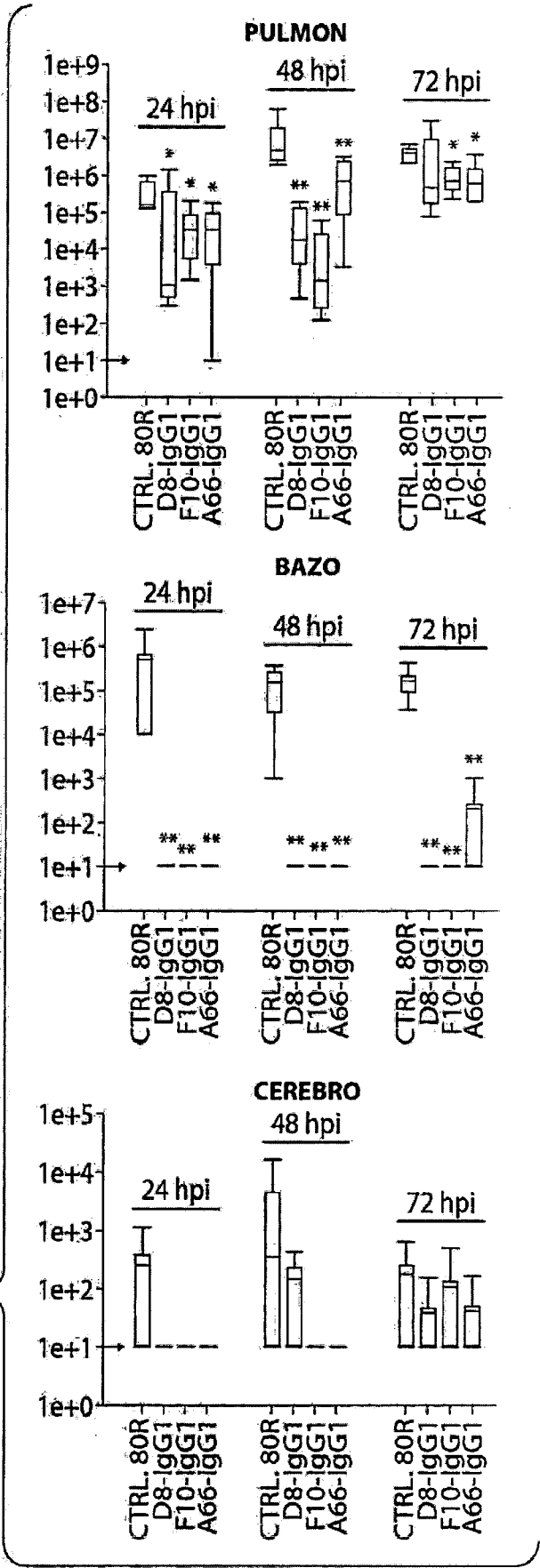


Fig. 11

Fig. 12



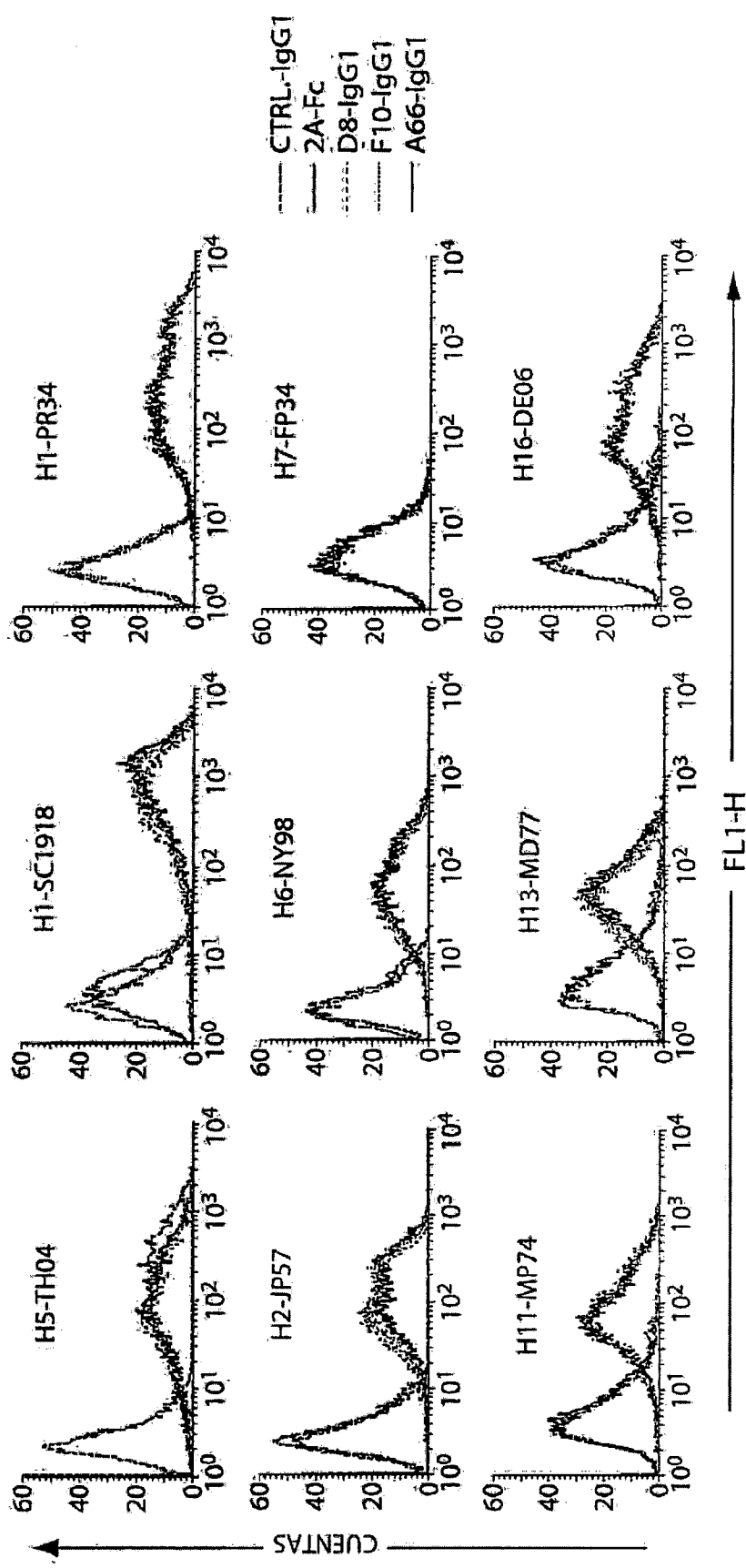


Fig. 13

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9
SEQUENCE LISTING

<110> DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
BURNHAM INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH
MARASCO, WAYNE A.
SUI, JIANHUA
LIDDINGTON, ROBERT C.

<120> ANTIBODIES AGAINST INFLUENZA VIRUS AND METHODS OF USE THEREOF

<130> 50474/022C03

<140> 10.081.516

<141> 2008-12-08

<150> PCT/US2008/085876

<151> 2008-12-08

<150> 61/091,599

<151> 2008-08-25

<150> 61/005,725

<151> 2007-12-06

<160> 177

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 369

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cagggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggagg	caccttcagt	gacaatgcta	tcagctgggt	gcgacaggcc	120
ccaggacaag	ggcttgagtg	gatggggggc	atcattccta	tctttggaaa	accaaactac	180
gcacagaagt	tccagggcag	agtcacgatt	actgcggacg	aatccacgag	cacagcctac	240
atggacctga	ggagcctgag	atctgaggac	acggccgttt	attactgtgc	gagagattca	300
gacgcgtatt	actatggttc	gggggggatg	gacgtctggg	gccaaaggcac	cctggtcacc	360
gtctcctca						369

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9
Met Asp Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Gly Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 335
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
ctgcctgtgc tgactcaatc atcctctgcc tctgcttccc tgggatactc ggtcaagctc 60
acctgcactc tgagcagtgg gcatagtaac tacatcatcg catggcatca acagcagcca 120
gggaaggccc ctcggtactt gatgaaggtt aatagtgatg gcagccacac caagggggac 180
gggatccctg atcgcttctc aggtctccagc tctggggctg accgctacct caccatctcc 240
aacctccagt ctgaggatga ggctagttat ttctgtgaga cctgggacac taagattcat 300
gtcttcggaa ctgggaccaa ggtctccgtc ctcag 335

<210> 4
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Leu Pro Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly His Ser Asn Tyr Ile
20 25 30

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

Lys Val Asn Ser Asp Gly Ser His Thr Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60

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

Asn Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Ser Tyr Phe Cys Glu Thr Trp Asp
85 90 95

Thr Lys Ile His Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Ser Val Leu
100 105 110

<210> 5
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctctggagg tatcttcaac accaatgctt tcagctgggt ccgacaggcc 120

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9
cctggacaag gtcttgagtg ggtgggaggg gtcacccctt tgtttcgaac agcaagctac 180
gcacagaacg tccagggcag agtcaccatt accgcggacg aatccacgaa cacagcctac 240
atggagctta ccagcctgag atctgcggac acggccgtgt attactgtgc gagaagtagt 300
ggttaccatt ttaggagtca ctttgactcc tggggcctgg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 6
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Ser Gly Tyr His Phe Arg Ser His Phe Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctcttgaggg tatcttcaac accaatgctt tcagctgggt ccgacaggcc 120
cctggacaag gtcttgagtg ggtgggaggg gtcacccctt tgtttcgaac agcaagctac 180
gcacagaacg tccagggcag agtcaccatt accgcggacg aatccacgaa cacagcctac 240
atggagctta ccagcctgag atctgcggac acggccgtgt attactgtgc gagaagtagt 300
ggttaccatt ttaggagtca ctttgactcc tggggcctgg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 8
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

<400> 8
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

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

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Arg Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Arg Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Asp Thr
85 90 95

Asn Asn His Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 9
<211> 333
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggcgtctc cggggaagac ggtgaccatc 60
tcctgcaccg gcagcagtgg caacattgcc gccaactatg tgcagtggta ccaacaacgt 120
ccgggcagtg cccccactac tgtgatctat gaggatgacc gaagaccctc tggggtcctc 180
gatcggttct ctggctccat cgacaggtcc tccaactctg cctccctcac catctcagga 240
ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgtcagactt atgataccaa caatcatgct 300
gtgttcggag gaggcacca cctgaccgtc ctc 333

<210> 10
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Lys His Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Ile Tyr Ser Asn Glu Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Val Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Asn Leu

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

<210> 11
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
tcctatgagc tgactcagcc accctcagcg tctgggaaac acgggcagag ggtcaccatc 60
tcttgttctg gaggcacctc caacatcgga cgtaatcatg ttaactggta ccagcaactc 120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaatgaac agcggccctc aggggtccct 180
gaccgattct ctggctccaa atctggcacc tccgcctccc tggccgtgag tgggctccag 240
tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca tcatgggatg acaacttgag tggttgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 12
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Gly Ile Thr Gly Met Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 361
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc gcttatgctt tcacctgggt gcggcaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggc atcaccggaa tgtttggcac agcaaactac 180

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aactcacgag cacagcctac 240
atggagttga gctccctgac atctgaagac acggcccttt attattgtgc gagaggattg 300
tattactatg agagtagtct tgactattgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360
g 361

<210> 14
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Thr Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 15
<211> 361
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaggg cttctggagg caccttcagc gcttatgctt tcacctgggt gcggcaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggc atcaccggaa tgtttggcac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aactcacgag cacagcctac 240
atggagttga gctccctgac atctgaagac acggcccttt attattgtgc gagaggattg 300
tattactatg agagtagtct tgactattgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360
g 361

<210> 16
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ser Ser Lys
20 25 30

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

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

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

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

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Thr Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 17
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 17
cagtctgtgc tgactcagcc accctccgcg tccgggtctc ctggacagtc agtcaccatc 60
tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggg ggttataact ctgtctcctg gtaccaacag 120
caccaggcca aagcccccaa actcatgatt tatgagggtca ctaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgatcgct tctctgcctc caagtctggc aacacggcct ccctgaccgt ctctgggctc 240
caggctgagg atgaggctga ttatttctgc tgctcatatg caggccacag tgcttatgtc 300
ttcggaactg ggaccaaggt caccgtcctg 330

<210> 18
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ser Ser Glu Val Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Ser Gly Gly Thr Cys Val Phe Asp
100 105 110

154

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 19
gaaattgtgc tgactcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtcttagc agcaagtact tagcctggta tcagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaccc tcaccatcag tagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttctgtgcag cagtatgatg gcgtacctcg gacgttcggc 300
caagggacca cggtggaaat caaa 324

<210> 20
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Lys Gly Leu Arg Gln
1 5 10 15

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

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

Ser Tyr Arg Asn Asn Asp Arg Pro Ser Gly Ile Ser Glu Arg Phe Ser
50 55 60

Ala Ser Arg Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

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

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

<210> 21
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 21
caggtgcagc tgggtcagtc aggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcacgt cctctgaagt caccttcagt agttttgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gctgggaggg atcagcccta tgtttgaac acctaattac 180
gcgcagaagt tccaaggcag agtcaccatt accgcggacc agtccacgag gacagcctac 240
atggacctga ggagcctgag atctgaggac acggccgtgt attattgtgc gagatctcct 300

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9
tcttacattt gttctggtgg aacctgcgctc ttgaccatt ggggccaggg aaccctggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 23
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 23
caggtacagc tgcagcagtc aggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcacgt cctctgaagt caccttcagt agttttgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gctgggaggg atcagcccta tgtttggaac acctaattac 180
gcgcagaagt tccaaggcag agtcaccatt accgcggacc agtccacgag gacagcctac 240
atggacctga ggagcctgag atctgaggac acggccgtgt attattgtgc gagatctcct 300
tcttacattt gttctggtgg aacctgcgctc ttgaccatt ggggccaggg aaccctggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 24
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

35

40

45

Gly Gly Ile Ile Gly Val Phe Gly Val Pro Lys Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Pro Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Pro Gly Tyr Tyr Val Gly Lys Asn Gly Phe Asp Val Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 25
cagcctgggc tgactcagcc accctcggtg tccaagggct tgagacagac cgccacactc 60
acctgcactg ggaacagcaa caatgttggc aaccaaggag cagcttggct gcagcagcac 120
cagggccacc ctcccaaact cctatcctac aggaataatg accggccctc agggatctca 180
gagagattct ctgcatccag gtcaggaaac acagcctccc tgaccattac tggactccag 240
cctgaggacg aggctgacta ttactgtctca acatgggaca gcagcctcag tgctgtggta 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 26
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Lys Gly Leu Arg Gln
1 5 10 15
Thr Ala Ile Leu Thr Cys Thr Gly Asp Ser Asn Asn Val Gly His Gln
20 25 30
Gly Thr Ala Trp Leu Gln Gln His Gln Gly His Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ser Tyr Arg Asn Gly Asn Arg Pro Ser Gly Ile Ser Glu Arg Phe Ser
50 55 60
Ala Ser Arg Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ile Gly Leu Gln
65 70 75 80
Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Val Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95
Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

<210> 27
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 27
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagagg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagac ttcactctca ccattagcag cctgcagcct 240
gaagattttg cagtgtatta ctgtcagcag tatgatagtt caccgtacac ttttggccag 300
gggaccaagg tagagatcaa a 321

<210> 28
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Gln Val Trp Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ala Ser Val Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Gln Pro Glu Ala
100 105 110

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

<210> 29
<211> 366
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 29
caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaaga cttctggagt caccttcagc agctatgcta tcagttgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcggtg tctttggtgt accaaagtac 180
gcgcagaact tccagggcag agtcacaatt accgcggaca aaccgacgag tacagtctac 240
atggagctga acagcctgag agctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagccc 300
gggtactacg taggaaagaa tggttttgat gtctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

tctttca 366

<210> 30
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Pro Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Gly Tyr Ser Val
20 25 30

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

Asp Asp Lys Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ala
50 55 60

Asn Ser Gly Ser Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly Asn Asp Arg
85 90 95

Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 31
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 31
tcctatgagc tgactcagcc accctcgggtg tccaagggct tgagacagac cgccatactc 60
acctgcactg gagacagcaa caatgttggc caccaaggta cagcttggct gcaacaacac 120
cagggccacc ctcccaaact cctatcctac aggaatggca accggccctc agggatctca 180
gagagattct ctgcatccag gtcaggaaat acagcctccc tgaccattat tggactccag 240
cctgaggacg aggctgacta ctactgctca gtatgggaca gcagcctcag tgcctgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 32
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

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

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

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

Ala Arg Thr Leu Ser Ser Tyr Gln Pro Asn Asn Asp Ala Phe Ala Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33
<211> 378
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 33
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaggaagc ctggggcctc agtgaaggctc 60
tcatgtaagg cttctggata caccttcacc gggttattata ttacttgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag gacttgagtg gatgggttgg atcaacccta tgactggtgg cacaactat 180
gcacagaagt ttcaggtctg gggtcaccatg acccgggaca cgtccatcaa cacagcctac 240
atggaggtga gcaggctgac atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gaggggggct 300
tccgtattac gatattttga ctggcagccc gaggtctctt atatctgggg cctcggggacc 360
acggtcaccg tctcctca 378

<210> 34
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

<210> 35
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 35
cagcctgtgc tgactcagcc accctcggtg tcagtggccc caggacagac ggccagcatt 60
ccctgtgggg ggaacaacat tggaggctac agtgtacact ggtaccaaca aaagccgggc 120
caggcccccc tcttggtcat ttatgacgat aaagaccggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggcg ccaactctgg gagcacggcc accctgacaa tcagcagggt cgaagccggg 240
gatgagggcg actactactg tcagggtgtg gatagtggta atgatcgtcc gctgttcggc 300
ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 36
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser 15
1 5 10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Pro Phe Ser Met Thr 30
20 25 30
Ala Phe Thr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 45
35 40 45
Gly Gly Ile Ser Pro Ile Phe Arg Thr Pro Lys Tyr Ala Gln Lys Phe 60
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Asn 80
65 70 75 80
Met Glu Leu Thr Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 95
85 90 95
Ala Arg Thr Leu Ser Ser Tyr Gln Pro Asn Asn Asp Ala Phe Ala Ile 110
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser 120
115 120

<210> 37
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 37
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggctcctc ggtgaagggtt 60
tcctgcaagg cttctggagg ccccttcagc atgactgctt tcacctggct gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggtggg atcagcccta tctttcgtac accgaagtac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgaa cacagccaac 240
atggagctga ccagcctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaccctt 300
tcctcctacc aaccgaataa tgatgctttt gctatctggg gccaaaggac aatggtcacc 360

gtctctttca 369

<210> 38
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38
Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ser Ala Ser Leu Phe Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 39
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 39
gaaattgtgt tgacgcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag actggagcct 240
gaagattttg cagtctatct ctgtcagcag tatggtagct cacctcaatt cggccaaggg 300
acacgactgg agattaata 318

<210> 40
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 40
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggctcctc ggtgaagggt 60
tcctgcaagg cttctggagg ccccttcagc atgactgctt tcacctggct gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggtggg atcagcccta tctttcgtac accgaagtac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgaa cacagccaac 240
atggagctga ccagcctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaacctt 300
tcctcctacc aaccgaataa tgatgctttt gctatctggg gccaaaggac aatggtcacc 360
gtctctttca 369

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

```

<210> 41
<400> 41
000

<210> 42
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 42
ctgcctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc      60
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaatactg taaactggta ccagcagctc      120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcggccctc aggggtccct      180
gaccgattct ctggctccag gtcaggcacc tcagcctccc tggccatcat tggactccgg      240
cctgaggatg aagctgatta ttactgtcag tcgtatgaca gcaggctcag tgcttctctc      300
ttcggaaactg ggaccacggt caccgtcctc      330

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of Artificial sequence: Synthetic
consensus sequence

<400> 43
Ser Tyr Ala Phe Ser
1          5

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44
Thr Asn Ala Phe Ser
1          5

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Ala Tyr Ala Phe Thr
1          5

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

<400> 46
Ser Phe Ala Ile Ser
1          5

<210> 47
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

<400> 47
Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Gly Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Met Thr Ala Phe Thr
1 5

<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Asp Asn Ala Ile Ser
1 5

<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence

<400> 51
Gly Ile Ile Pro Met Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Gly Val Ile Pro Leu Phe Arg Thr Ala Ser Tyr Ala Gln Asn Val Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 53
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53
Gly Ile Ile Gly Met Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
Página 17

```
<210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```
<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```
<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```
<210> 57
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```
<210> 58
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

Página 18

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

<210> 59
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence

<400> 59
Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Phe Asp Val
1 5 10

<210> 60
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Ser Ser Gly Tyr His Phe Gly Arg Ser His Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Gly Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Ser Gly Gly Thr Cys Val Phe Asp His
1 5 10 15

<210> 63
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63
Glu Pro Gly Tyr Tyr Val Gly Lys Asn Gly Phe Asp Val
1 5 10

<210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64
Gly Ala Ser Val Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Gln Pro Glu Ala Leu Asp
1 5 10 15

Ile

<210> 65
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

<400> 65
Thr Leu Ser Ser Tyr Gln Pro Asn Asn Asp Ala Phe Ala Ile
1 5 10

<210> 66
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66
Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 67
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67
Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Tyr Val Ala
1 5 10

<210> 68
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68
Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Ala Ala Asn Tyr Val Gln
1 5 10

<210> 69
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence

<400> 69
Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Ser Val Ser
1 5 10

<210> 70
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70
Thr Gly Asn Ser Asn Asn Val Gly Asn Gln Gly Ala Ala
1 5 10

<210> 71
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71
Thr Gly Asp Ser Asn Asn Val Gly His Gln Gly Thr Ala
1 5 10

<210> 72
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9
 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Gly Tyr Ser Val His
 1 5 10

<210> 73
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 73
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 74
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74
 Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ser Ser Lys Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 75
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 75
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Tyr Val Ala
 1 5 10

<210> 76
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 76
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
 1 5 10

<210> 77
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 77
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 78
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 78
 Thr Leu Ser Ser Gly His Ser Asn Tyr Ile Ile Ala
 1 5 10

<210> 79
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 consensus sequence

<400> 79
 Ser Asn Ser Asp Arg Pro Ser

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

1

5

<210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 80
 Glu Asp Asp Arg Arg Pro Ser
 1 5

<210> 81
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 81
 Glu Val Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 82
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 82
 Arg Asn Asn Asp Arg Pro Ser
 1 5

<210> 83
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 83
 Arg Asn Gly Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 84
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 84
 Asp Asp Lys Asp Arg Pro Ser
 1 5

<210> 85
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 85
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 86
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 86
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 87
 <211> 7

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

```

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87
Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1          5

<210> 88
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Arg
1          5

<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89
Ser Asn Glu Gln Arg Pro Ser
1          5

<210> 90
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90
Val Asn Ser Asp Gly Ser His Thr Lys Gly Asp
1          5          10

<210> 91
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      consensus sequence

<400> 91
Gln Ser Tyr Asp Ser Leu Ser Ala Tyr Val
1          5          10

<210> 92
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92
Gln Ser Tyr Asp Thr Asn Asn His Ala Val
1          5          10

<210> 93
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93
Cys Ser Tyr Ala Gly His Ser Ala Tyr Val
1          5          10

<210> 94
<211> 11
<212> PRT

```

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

<213> Homo sapiens

<400> 94

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

<210> 95

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

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

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Gln Val Trp Asp Ser Gly Asn Asp Arg Pro Leu
1 5 10

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln Val
1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Gln Gln Tyr Asp Gly Val Pro Arg Thr
1 5

<210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Leu Ser Ala Ser Leu
1 5 10

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 101

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

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

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

<210> 102
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 102
 Glu Thr Trp Asp Thr Lys Ile His Val
 1 5

<210> 103
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 103
 Gly Thr Glu Thr Ser Gln Val Ala Pro Ala
 1 5 10

<210> 104
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic 6xHis tag

<400> 104
 His His His His His His
 1 5

<210> 105
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Influenza A virus

<400> 105
 Ile Asn Gly Trp
 1

<210> 106
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Influenza A virus

<400> 106
 Ile Asp Gly Trp
 1

<210> 107
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Influenza A virus

<400> 107
 Val Ala Gly Trp
 1

<210> 108
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Influenza A virus

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

<400> 108
Val Asp Gly Trp
1

<210> 109
<211> 4
<212> PRT
<213> Influenza A virus

<400> 109
Ile Ala Gly Trp
1

<210> 110
<211> 87
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 110
Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly
1 5 10 15

Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
20 25 30

Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn
35 40 45

Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser
50 55 60

Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
65 70 75 80

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85

<210> 111
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 111
Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ser Ser Glu Val
1 5 10 15

Thr Phe Ser Ser Phe Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
20 25 30

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Gly Ile Ser Pro Met Phe Gly Thr Pro Asn
35 40 45

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

Thr Arg Thr Ala Tyr Met Asp Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
65 70 75 80

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Ser Gly Gly
85 90 95

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9
 Thr Cys Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105

<210> 112
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 112
 Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Thr Phe Ser Ala Tyr Ala Phe Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
 20 25 30

Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Gly Met Phe Gly Thr Ala Asn
 35 40 45

Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Leu
 50 55 60

Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr
 65 70 75 80

Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Ser Phe
 85 90 95

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100

<210> 113
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 113
 Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Pro Phe Ser Met Thr Ala Phe Thr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln
 20 25 30

Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ser Pro Ile Phe Arg Thr Pro Lys
 35 40 45

Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser
 50 55 60

Thr Asn Thr Ala Asn Met Glu Leu Thr Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr
 65 70 75 80

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

Asp Ala Phe Ala Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105

<210> 114
 <211> 106
 <212> PRT

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

<213> Homo sapiens

<400> 114

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

<210> 115

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

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

<210> 116

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Arg Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
1 5 10 15

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9
 Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
 20 25 30

Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Met Thr Gly Gly Thr Asn
 35 40 45

Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Val Trp Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser
 50 55 60

Ile Asn Thr Ala Tyr Met Glu Val Thr Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr
 65 70 75 80

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

Trp Gln Pro Glu Ala Leu Asp Ile Trp Gly Leu Gly Thr Thr
 100 105 110

<210> 117
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 117
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 118
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 118
 Glu Val Thr Phe Ser Ser Phe Ala
 1 5

<210> 119
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 119
 Gly Gly Thr Phe Ser Ala Tyr Ala
 1 5

<210> 120
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 120
 Gly Gly Pro Phe Ser Met Thr Ala
 1 5

<210> 121
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 121
 Gly Val Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 122

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

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

<400> 122
Gly Gly Ile Phe Asn Thr Asn Ala
1 5

<210> 123
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 123
Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 124
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 124
Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Pro
1 5

<210> 125
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 125
Ile Ser Pro Met Phe Gly Thr Pro
1 5

<210> 126
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 126
Ile Ile Gly Met Phe Gly Thr Ala
1 5

<210> 127
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 127
Ile Ser Pro Ile Phe Arg Thr Pro
1 5

<210> 128
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 128
Ile Ile Gly Val Phe Gly Val Pro
1 5

<210> 129
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 129

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

Val Ile Pro Leu Phe Arg Thr Ala
1 5

<210> 130
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 130
Ile Asn Pro Met Thr Gly Gly Thr
1 5

<210> 131
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 131
Ala Arg Ser Pro Ser Tyr Ile Cys Ser Gly Gly Thr Cys Val Phe Asp
1 5 10 15

His

<210> 132
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 132
Ala Arg Gly Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 133
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 133
Ala Arg Thr Leu Ser Ser Tyr Gln Pro Asn Asn Asp Ala Phe Ala Ile
1 5 10 15

<210> 134
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 134
Ala Arg Glu Pro Gly Tyr Tyr Val Gly Lys Asn Gly Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 135
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 135
Ala Arg Ser Ser Gly Tyr His Phe Arg Ser His Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 136
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 136
Ala Arg Gly Ala Ser Val Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Gln Pro Glu Ala
Página 31

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

<210> 144
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 144
 Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr
 1 5

<210> 145
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 145
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 146
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 146
 Thr Ser Asn Ile Gly Arg Asn His
 1 5

<210> 147
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 147
 Glu Asp Asp
 1

<210> 148
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 148
 Glu Val Thr
 1

<210> 149
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 149
 Arg Asn Asn
 1

<210> 150
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 150
 Arg Asn Gly
 1

<210> 151
 <211> 3
 <212> PRT

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

<213> Homo sapiens

<400> 151
Asp Asp Lys
1

<210> 152
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 152
Asp Ala Ser
1

<210> 153
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 153
Gly Ala Ser
1

<210> 154
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 154
Ser Asn Asn
1

<210> 155
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 155
Ala Ala Ser
1

<210> 156
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 156
Ser Asn Glu
1

<210> 157
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 157
Gln Thr Tyr Asp Thr Asn Asn His Ala Val
1 5 10

<210> 158
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 158
Cys Ser Tyr Ala Gly His Ser Ala Tyr Val
1 5 10

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

<210> 159
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 159
 Ser Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Val Val
 1 5 10

<210> 160
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 160
 Ser Val Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Val
 1 5 10

<210> 161
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 161
 Gln Val Trp Asp Ser Gly Asn Asp Arg Pro Leu
 1 5 10

<210> 162
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 162
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln
 1 5

<210> 163
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 163
 Gln Gln Tyr Asp Gly Val Pro Arg Thr
 1 5

<210> 164
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 164
 Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Leu Ser Ala Ser Leu
 1 5 10

<210> 165
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 165
 Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 166
 <211> 11
 <212> PRT

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

<213> Homo sapiens

<400> 166

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

<210> 167

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 167

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
1 5 10

<210> 168

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 168

Val Thr Val Ser Ser
1 5

<210> 169

<211> 2

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 169

Ala Arg
1

<210> 170

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence

<400> 170

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 171

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence

<400> 171

Ile Ile Pro Met Phe Gly Thr Pro
1 5

<210> 172

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial sequence: Synthetic
consensus sequence

<400> 172

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

Ala Arg
1

<210> 173
<211> 93
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence

<400> 173
Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly
1 5 10 15

Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
20 25 30

Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Met Phe Gly Thr Pro Asn
35 40 45

Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser
50 55 60

Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
65 70 75 80

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu
85 90

<210> 174
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence

<400> 174
Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser
20 25

<210> 175
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence

<400> 175
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 176

LISTADO SECUENCIAS MOD. - COLO 17756 841 001 9

<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence

<400> 176
Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly
1 5 10 15

Thr Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala
20 25 30

Asp Tyr Tyr Cys
35

<210> 177
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence

<400> 177
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0081420

Bogotá D.C., Agosto 22 de 2011 - 17:01:47

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

***** Soporte del Pago *****

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411764102	22/08/2011	56.093.000.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES EN CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICA		118.000.00	118.000.00
				\$118.000.00

SON: **CIENTO DIECIOCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-081516- 00003-0000

Fecha: 2011-08-29 17:45:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 185

COLO: 17756-841-001-9

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Agosto 22 de 2011 - 17:02:00